



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

Decoloración del colorante rojo ácido 27 utilizando un cultivo mixto de *Trametes versicolor* y *Pseudomonas putida*, diseñado para el tratamiento de efluentes textiles.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS AMBIENTALES

PRESENTA:

M. EN C. ADRIANA CORTAZAR MARTÍNEZ

DIRECTOR:

DR. CÉSAR ABELARDO GONZÁLEZ RAMÍREZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

Dirección

ICBI-D/180/13.

M. en A. Julio César Leines Medécigo
Director de Administración Escolar
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
PRESENTE

Por este conducto le comunico que el Jurado asignado a la alumna del Doctorado en Ciencias Ambientales **Adriana Cortazar Martínez**, con N° de cuenta 090899, quien presenta el trabajo de titulación **"Decoloración del colorante rojo ácido 27 utilizando un cultivo mixto de *Trametes versicolor* y *Pseudomonas putida*, diseñado para el tratamiento de efluentes textiles"**, después de revisar el trabajo en reunión de sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, una vez realizadas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Jurado:

PRESIDENTE: Dr. José Roberto Villagómez Ibarra

SECRETARIO: Dr. José Adelfo Escalante Lozada

VOCAL: Dr. César Abelardo González Ramírez

SUPLENTE: Dra. Claudia Coronel Olivares

Sin otro particular, reitero a Usted la seguridad de mi atenta consideración.

ATENTAMENTE

Amor, Orden y Progreso
Mineral de la Reforma, Hgo., a 7 de febrero de 2013

Dr. Orlando Avila Pozos
Director del ICBI



Ciudad Universitaria Carretera Pachuca – Tulancingo
Km. 4.5. s/n Col. Carboneras C.P. 42184 Mineral de
la Reforma, Hidalgo, México.
Tel: (771)7172000 ext. 2230 . 2231



El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. César A. González Ramírez.

La parte experimental se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, bajo la supervisión del Dr. Javier Castro Rosas.

DEDICATORIA:

Papá, Mamá, Orlando... ustedes son mi motivo para seguir adelante. Los admiro y agradezco su apoyo incondicional y sus enseñanzas.

Familia Cortazar, Familia Martínez. Su confianza y su cariño han sido un gran aliento para mí. Cada uno de ustedes ha dejado algo hermoso en mi vida.

A mis amigos Álvaro, Arge, Gretel, Huicho, Laura, Magaly, Miriam, Orquidea, Rosita, Rufina. En todo este tiempo, su amistad incondicional me ha ayudado a seguir adelante. Ustedes forman una parte importante de mi vida. Los quiero mucho.

Abel, Angélica, Faliana, Rosa, Silvia, Windy. Este proceso no hubiera sido lo mismo sin ustedes. De cada uno de ustedes pude aprender mucho. Los admiro por su dedicación y su trabajo.

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco de todo corazón a cada persona que de alguna manera ha estado conmigo. A mi familia, mis amigos, mis maestros. ¡GRACIAS!

A Dios, por ser quien guía mi camino.

Al Dr. César A. González Ramírez por su apoyo, confianza, paciencia y orientación durante la realización de esta tesis.

Al Dr. Javier Castro Rosas por darme la confianza de realizar la parte experimental en su laboratorio. Gracias por su supervisión y contribución a este trabajo.

Al Dr. Adelfo Escalante Lozada, por su tiempo, su experiencia, su dedicación y sus consejos. Gracias por su apoyo.

A los miembros de mi comité tutorial: Dra. Claudia Coronel Olivares, Dr. Roberto Villagómez Ibarra Gracias por sus consejos, críticas y sugerencias que permitieron llevar a cabo este proyecto.

A la Dra. Claudia Romo, agradezco su apoyo y su gestión.

A mis compañeros y amigos de generación, por los momentos de estudio y de diversión. Muchas gracias por acompañarme en este proceso brindándome sus consejos, su ayuda y por compartir conmigo su entusiasmo y su trabajo.

Índice general

Índice de figuras	3
Índice de tablas	5
Lista de abreviaturas	6
Resumen	8
Abstract	10
CAPÍTULO 1. Introducción	12
1.1. Justificación	15
1.2. Hipótesis	17
1.3. Objetivo general	17
1.4. Objetivos particulares	17
CAPÍTULO 2. Marco Teórico y Antecedentes	18
2.1. Contaminación ambiental debida a la industria textil	18
2.2. Química de los colorantes textiles	20
2.3. Impacto ambiental de los colorantes textiles	23
2.3.1. Contaminación generada por colorantes provenientes de la industria textil.	24
2.3.2. Toxicidad de los colorantes textiles	25
2.4. Procesos empleados en la decoloración de efluentes textiles	26
2.4.1. Tratamientos físicos	31
2.4.2. Tratamientos químicos	32
2.4.3. Tratamientos biológicos	33
2.4.3.1. Biosorción	34
2.4.3.2. Biodegradación	35
2.4.3.3. Métodos enzimáticos	36
2.4.4. Ingeniería genética aplicada a la degradación de colorantes textiles	37
2.5. <i>Trametes versicolor</i> en procesos de decoloración	38
2.6. <i>Pseudomonas putida</i> en procesos de decoloración	39
CAPÍTULO 3. Metodología	40
3.1. Modelos moleculares, enzimáticos y metabólicos	40
3.2. Simulación de un sistema biológico (hongo-bacteria) con la capacidad de degradar el colorante rojo ácido 27	41
3.2.1. Resolución del modelo matemático	44
3.3. Características de las cepas	45
3.4. Condiciones de cultivo y conservación de las cepas	45
3.5. Ensayos cualitativos en placa	46
3.5.1. Evaluación del crecimiento de <i>T. versicolor</i> y <i>P. putida</i> en las condiciones establecidas	46

3.5.2. Evaluación de la inhibición en cultivos mixtos de <i>T. versicolor</i> y <i>P. putida</i>	47
3.5.3. Evaluación de la decoloración en cultivos simples y mixtos de <i>T. versicolor</i> y <i>P. putida</i> .	47
3.5.4. Evaluación de la actividad lacasa en cultivos simples y mixtos de <i>T. versicolor</i> y <i>P. putida</i> .	48
3.6. Ensayos para el establecimiento de los cultivos mixtos	48
3.7. Métodos analíticos	50
CAPÍTULO 4. Análisis y Discusión de Resultados	51
4.1. Análisis teórico del metabolismo de colorante rojo ácido 27	51
4.2. Modelo metabólico de la degradación del colorante rojo ácido 27 a través de <i>T. versicolor</i> y <i>P. putida</i>	54
4.3. Modelo cinético de la degradación del colorante rojo ácido 27, a través de <i>T. versicolor</i> y <i>P. putida</i>	56
4.3.1. Ecuaciones propuestas para las cinéticas de degradación del colorante rojo	56
4.3.2. Parámetros del modelo matemático	60
4.3.3. Resolución del modelo matemático	60
4.4. Análisis de la simulación de la degradación del colorante rojo ácido 27 a través de <i>T. versicolor</i> y <i>P. putida</i>	60
4.4.1. Simulación de las condiciones de crecimiento de <i>T. versicolor</i> y <i>P. putida</i>	61
4.4.2. Simulación de la degradación del colorante rojo ácido 27 por <i>T. versicolor</i> y <i>P. putida</i>	63
4.5. Identificación de las condiciones experimentales de cultivo para <i>T. versicolor</i> y <i>P. putida</i>	65
4.6. Evaluación de la inhibición del crecimiento para el sistema propuesto	66
4.7. Degradación del colorante rojo ácido 27	67
4.8. Pruebas preliminares de la decoloración en cultivos mixtos	70
4.9. Decoloración en cultivos líquidos	75
Conclusiones y recomendaciones	81
Referencias bibliográficas	84
Anexos	99

Índice de figuras

Figura No.	Título	Pág.
1.1.	Estrategias que se siguen en la bioremediación de aguas residuales de la industria textil (modificado de Kandelbauer <i>et Guebitz</i> , 2006).	13
2.1.	Principales contaminantes involucrados en algunos procesos de la industria textil del algodón (Modificado de Dos Santos <i>et al.</i> , 2007)	19
2.2.	Ejemplo de algunos colorantes textiles y sus clases de cromóforos: (a) antraquinona (b) azo (c) triarilmetano (d) nitro y (e) índigo.	21
3.1.	Estructura del colorante rojo ácido 27 (amaranto).	40
3.2.	Modelo conceptual propuesto	41
4.1.	Mecanismo propuesto para la degradación del colorante amaranto por <i>T. versicolor</i> .	52
4.2.	Análisis teórico de los diferentes intermediarios a) Compuesto II b) Compuesto VIII c) Compuesto IX.	53
4.3.	Modelo conceptual de la degradación del colorante utilizando un cultivo mixto.	55
4.4.	Crecimiento de <i>T. versicolor</i> y <i>P. putida</i> en un cultivo mixto a) Crecimiento con 5 g/L de glucosa b) Crecimiento con 10 g/L de glucosa.	61
4.5.	Crecimiento del sistema <i>T. versicolor</i> - <i>P. putida</i> . El cultivo mixto se inicia durante el 2° día de crecimiento del hongo.	62
4.6.	Cinética de producción-consumo de compuestos aromáticos.	63
4.7.	Cinética de producción de la enzima lacasa.	64
4.8.	Degradación del colorante rojo ácido 27.	65
4.9.	Crecimiento de <i>T. versicolor</i> y <i>P. putida</i> en PDA.	66
4.10.	Decoloración del colorante rojo ácido 27 a través de <i>T. versicolor</i> .	67
4.11.	Degradación del colorante rojo ácido 27 a través de <i>T. versicolor</i> en diferentes medios (10 días de cultivo).	68
4.12.	Crecimiento de <i>P. putida</i> en diferentes medios con colorante (2 días de cultivo).	68
4.13.	Modelo conceptual de la degradación del colorante utilizando un cultivo mixto.	69
4.14.	Degradación del colorante rojo ácido 27 en un cultivo de a) <i>T. versicolor</i> y b) Un cultivo mixto de <i>T. versicolor</i> y <i>P. putida</i> .	70
4.15.	Halos de oxidación del ABTS a) Pellet de <i>T. versicolor</i> (12 h); b) Pellet de <i>T. versicolor</i> (48 h); c) Sobrenadante (12 h) y d)	

Sobrenadante(24 h).	72
4.16. Halo de oxidación con respecto al tiempo en cajas de medio Kirk y ABTS, inoculadas con un pellet de <i>T. versicolor</i> .	72
4.17. Cambios de coloración en el halo de oxidación del ABTS a) Pellet de <i>T. versicolor</i> , 5 días; b) Pellet de <i>T. versicolor</i> /cultivo de <i>P. putida</i> /Caldo soya tripticasa (12 hrs); b) Pellet de <i>T. versicolor</i> /cultivo de <i>P. putida</i> /Caldo soya tripticasa (24 hrs).	73
4.18. Mecanismo de acción del sistema lacasa-mediador.	74
4.19. Decoloración en medio sólido, 14 días de cultivo a) Pellet de <i>T. versicolor</i> ; b) Pellet de <i>T. versicolor</i> /cultivo de <i>P. putida</i> (24 hrs)	74
4.20. Decoloración del colorante rojo ácido 27 utilizando pellets de <i>T. versicolor</i> .	75
4.21. Decoloración del colorante rojo ácido 27 durante el crecimiento de <i>T. versicolor</i> .	76
4.22. Pruebas de decoloración a los 10 días 1) Control 2) Hongo 3) Hongo/Bacteria 4) Hongo/Sobrenadante bacteria 5) Bacteria 6) Sobrenadante 7) Hongo/Medio Kirk.	78
4.23. Decoloración usando cultivos mixtos y sencillos 1) Control 2) Hongo 3) Hongo/Bacteria 4) Hongo/Sobrenadante bacteria 5) Bacteria 6) Sobrenadante 7) Hongo/Medio Kirk.	79

Índice de tablas

Tabla No.	Título	Pág.
2.1.	Concentraciones de color y cantidad de agua generada por algunas industrias (modificada de Anjaneyulu <i>et al.</i> , 2005).	18
2.2.	Efecto del efluente de una industria textil sobre la calidad del cuerpo receptor (Modificada de Ademoroti <i>et al.</i> , 1992).	20
2.3.	Grupos cromóforos más comunes.	22
2.4.	Metales típicos encontrados en colorantes (Bae <i>et al.</i> , 2006).	24
2.5.	Métodos convencionales para el tratamiento de las aguas residuales de la industria textil.	28
2.6.	Microorganismos utilizados en el tratamiento de colorantes y su mecanismo de acción propuesto para la decoloración (modificado de Kuhad <i>et al.</i> , 2004).	34
3.1.	Parámetros utilizados para obtener una solución del modelo matemático planteado.	42
3.2.	Combinaciones posibles para evaluar la decoloración en un cultivo mixto.	49
4.1.	Combinaciones utilizadas para evaluar la decoloración en un cultivo mixto.	77

Lista de nomenclatura y abreviaturas

a	Coeficiente estequiométrico de aromáticos a partir del colorante
$\mu_{maxaroB}$	Constante de Monod para <i>P. putida</i> consumiendo aromáticos
μ_{maxB}	Constante de Monod para <i>P. putida</i> consumiendo glucosa
μ_{maxH}	Constante de Monod para <i>T. versicolor</i> consumiendo glucosa
μL	Microlitros
A_{ini}	Absorbancia inicial
A_{obs}	Absorbancia observada
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico)
AN	Agar nutritivo
C_{Glc}	Concentración de glucosa en el medio
C_{col}	Concentración de colorante en el medio
D	Decoloración
DBO	Demanda bioquímica de oxígeno
DQO	Demanda química de oxígeno
g	Gramos
g/L, gL ⁻¹	Gramos/litro
Hongos PB	Hongos de la putrefacción blanca
K_d	Constante de decaimiento de la enzima
K_{saro}	Constante de saturación de aromáticos
K_{sPglc}	Constante de saturación de la glucosa (bacteria)
K_{sTglc}	Constante de saturación de la glucosa (hongo)
mg	Miligramos
mg/L	Miligramos/litro
MnP	Manganeso peroxidasa
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
PDA	Agar papa dextrosa
t	Tiempo al que se realiza la medición
<i>T. versicolor</i>	<i>Trametes versicolor</i>

V_r	Velocidad radial del halo de oxidación
X_B	Biomasa inicial de <i>Pseudomonas putida</i>
X_H	Biomasa inicial de <i>Trametes versicolor</i>
y	Radio del halo de oxidación
$Y_{lacasa-glc}$	Rendimiento lacasa a partir de glucosa
Y_{P-aro}	Rendimiento de <i>P. putida</i> consumiendo aromáticos.
Y_{P-Glc}	Rendimiento de <i>P. putida</i> consumiendo glucosa
Y_{T-Glc}	Rendimiento de <i>T. versicolor</i> consumiendo glucosa

Resumen

El tratamiento de aguas residuales mediante métodos biológicos es de gran interés, ya que se considera una aplicación eficiente de la biotecnología para remediar sus efectos contaminantes. Sin embargo, se ha observado que los mejores rendimientos se obtienen utilizando consorcios microbianos, los cuáles no han sido caracterizados completamente, por lo que sólo se conocen algunas de las especies que pueden degradar colorantes. En este trabajo se estudió la interacción metabólica en cultivos mixtos de *Trametes versicolor* y *Pseudomonas putida*, durante la degradación del colorante rojo ácido 27. Se analizó la estructura del colorante que se pretende degradar a través de métodos computacionales para evaluar, con el fin de analizar los productos metabólicos que resulten de la degradación. Posteriormente se realizó un modelo cinético para evaluar la factibilidad de la degradación y simular algunos escenarios que pudieran presentarse en el sistema. Se realizaron pruebas cualitativas en cajas Petri para determinar la toxicidad del colorante, la capacidad de decoloración y el crecimiento bajo las condiciones utilizadas en los cultivos mixtos. Se encontró que *T. Versicolor* y *P. putida* pueden crecer a 28 °C en los medios de cultivo seleccionados (Agar papa dextrosa, agar nutritivo y medio Kirk modificado). En los cultivos mixtos en caja Petri no se observó un halo de inhibición, lo que sugiere que ambos organismos pueden crecer juntos. Se realizaron pruebas en caja Petri utilizando ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico), como sustrato para evaluar la actividad de la lacasa, que es una de las enzimas extracelulares producidas por *T. versicolor*. Se encontró que hay actividad enzimática en los pellets formados con cultivos de *T. versicolor*, así como en el sobrenadante. La especie monocatión del ABTS es la responsable de la formación de color (verde-azulado). En los cultivos mixtos se observó la desaparición del halo verde azulado y la formación de un halo de color rojizo. La coloración presentada en las cajas cuando se inoculan *T. versicolor* y *P. Putida*, puede deberse a la formación del ABTS dicatión, sugiriendo que en el cultivo de las bacterias está presente un compuesto capaz de oxidar al ABTS. Los experimentos de decoloración en caja Petri mostraron que *T. versicolor* tiene la capacidad de degradar el colorante, pero no puede utilizarlo como fuente de carbono. *P. putida* no tiene la capacidad para degradar el colorante rojo ácido 27, aún así la presencia del colorante no afecta el crecimiento de *P.*

putida. La caja que contenía el cultivo mixto se decolora antes que la que contiene solamente el cultivo de *T. versicolor*. La decoloración inició en la zona donde se inocularon las bacterias, lo que indica que la presencia de *P. putida* induce el proceso de decoloración. Se iniciaron las pruebas en medio líquido para determinar las condiciones a las que se establecieron los cultivos mixtos. Se evaluó la decoloración utilizando *T. versicolor* en fase de crecimiento exponencial y como células libres, en ambas condiciones se logró la decoloración. Se realizó una prueba para establecer los cultivos mixtos utilizando pellets de *T. versicolor* con 7 días de crecimiento y 500 µL de un cultivo de *P. putida*, en medio Kirk suplementado con 1 g/L de glucosa y 30 mg/L de colorante. En estas condiciones no hubo decoloración y solamente se observó crecimiento *P. putida*. A pesar de que *T. versicolor* fue inoculado en mayor proporción (550:1), *P. putida* utilizó la glucosa para crecer, lo cual probablemente impidió que *T. versicolor* produjera las enzimas extracelulares responsables de la decoloración. Para completar las pruebas realizadas en medio sólido, se realizaron cultivos en tubos de ensaye. La combinación *T. versicolor* – *P. putida*, a los 10 días de incubación, presenta un porcentaje de decoloración del 82% con respecto al tubo testigo, el cual contiene únicamente el medio Kirk con el colorante. En el cultivo sencillo de *T. versicolor* se alcanzó un porcentaje de decoloración del 70% hasta los 14 días de incubación. En ese mismo tiempo, en el cultivo sencillo de *P. putida*, se logra un porcentaje de decoloración de alrededor del 30%. Esta decoloración puede deberse a la absorción del colorante en la biomasa del cultivo. Cuando se utilizó el sobrenadante de las bacterias no se observó decoloración.

En este trabajo se diseñó un consorcio microbiano constituido por hongos de la putrefacción blanca (*T. versicolor*) y bacterias (*P. putida*), con el fin de evaluar la decoloración de un colorante de tipo azo. Con estos resultados será posible analizar el diseño de un biocatalizador que acople varias enzimas o varias especies microbianas que realicen la completa mineralización de un colorante a través una red metabólica compleja.

Abstract

Wastewater treatment by biological methods is considered as an efficient application of Biotechnology, in order to remedy pollution and its effects. It has been observed that the best yields are obtained using multispecies microbial consortia, but they have not been fully characterized, so it is only known some of the species that can degrade dyes. This research studied the metabolic interaction in mixed cultures of *Trametes versicolor* and *Pseudomonas putida*, during acid red 27 dye degradation. This dye was analyzed by computational methods for identification of reactive sites in the molecule. Subsequently, it was proposed and solved a kinetic model for evaluating feasibility of degradation and simulating some probable scenarios that can occur within the system. Qualitative tests were performed on Petri dishes to determine dye toxicity, capacity of degradation and cell growth under conditions used for mixed cultures. It was found that *T. Versicolor* and *P. putida* can grow at 28°C, using the following culture media: PDA, Kirk modified medium and nutrient agar. Due to the possibility of inhibition between *T. versicolor* and *P. putida* and the possibility of toxic metabolites production during the degradation, cell growth inhibition was assessed qualitatively on agar cultures. In the mixed cultures, it was not found an inhibition halo between *T. versicolor* and *P. putida*. This suggests that both organisms can grow together. Petri plate tests with ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) as a substrate were conducted to detect laccase enzyme and determine its activity, since this is one of the extracellular enzymes produced by *T. versicolor*. From these experiments it was found that the pellet formed with *T. versicolor* as well as the supernatant of its culture medium present enzymatic activity. The ABTS monocation specie is responsible of color formation (blue-green). In the mixed cultures. The color observed on Petri plates after inoculation of *T. versicolor* and *P. putida*, may be due to the formation of the dication ABTS, this suggests that there is a compound able to oxidize the ABTS in the *P. putida* culture. Discoloration tests in Petri dishes showed that *T. versicolor* has the ability to degrade the dye, but *T. versicolor* could not use the dye as a carbon source. *P. putida* is not able to degrade the acid red 27 dye, even though the colorant did not affect *P. putida* growth.

It was found that the Petri plate with the mixed culture is discolored faster than the culture inoculated only with *T. versicolor*. Discoloration started in the area where bacteria were inoculated; this indicates that the presence of *P. putida* induces the discoloration process. Liquid medium tests were carried out for determining mixed culture conditions. We evaluated discoloration using *T. versicolor* in exponential growth phase as free cells. The dye can be degraded by *T. versicolor* in both conditions. Test was performed to establish the mixed culture conditions, using pellets with 7 days of growth and 500 µl of a *P. putida* culture in Kirk medium supplemented with 1 g/L glucose and 30 mg/L of dye. Under these conditions discoloration was not observed, but only bacterial growth. Although the fungus was inoculated at a higher ratio (550:1), *P. putida* was able to use glucose more efficiently for growing, this phenomenon probably prevented *T. versicolor* to produce extracellular enzymes, which are responsible for discoloration. Additionally, cultures were performed in test tubes, showing that the combination *T. versicolor* –*P. putida*, after 10 days of incubation, exhibits a higher rate of discoloration (82%) when compared with the control tube, which only contained Kirk medium with the dye. The *T. versicolor* culture reached a percentage of 70% of bleaching after 14 days of incubation. At the same time, the liquid culture containing only *P. putida*, achieves about 30% of discoloration. These results can be due to absorption of the dye in the culture biomass. Using the bacteria supernatant it was not observed discoloration

In this work, a microbial consortium was designed using a White rot fungus (*T. versicolor*) and a bacterial culture (*P. putida*) for assessing degradation of an azo dye. With these results it is possible to analyze the design of a biocatalyst by coupling various enzymes and/or fungal species along with several microbial species, in order to achieve full mineralization of a textile dye through a complex metabolic network

CAPÍTULO 1.

Introducción

Dentro de los compuestos xenobióticos, los colorantes tienen suma importancia dado que son ampliamente utilizados en la industria textil, fotográfica, alimenticia, cosmética, farmacéutica entre otras (Rafii *et al.*, 1990; Kuhad *et al.*, 2004 y Couto, 2009). Durante los procesos de teñido de la industria textil se utiliza una gran cantidad de colorantes que son vertidos en las aguas residuales, ocasionando graves problemas debido a que, incluso, concentraciones pequeñas de colorantes provocan una coloración intensa. La presencia de colorantes en el agua no solamente altera su aspecto, sino que también interfiere en el proceso fotosintético que realizan algunos organismos (Días *et al.*, 2004 y Molina *et al.*, 2009), además muchos colorantes son tóxicos y resistentes a los procesos de degradación debido a su estructura compleja (Cripps *et al.*, 1990 y Lu *et al.*, 2009). Existe una amplia variedad de colorantes con diferentes estructuras químicas, entre ellos se encuentran los colorantes de tipo azo, colorantes reactivos, colorantes dispersos, colorantes de tipo antraquinona, colorantes de tipo índigo, etc. Los colorantes de tipo azo son los más utilizados (Stolz, 2001; Kuhad, 2004 y Chengalroyen *et Dabbs*, 2013)

En la Figura 1.1 se muestran las estrategias que se han seguido para la biodegradación de colorantes. Parte del éxito de los procesos biológicos para remover el color se debe al uso de microorganismos que decoloran colorantes sintéticos efectivamente, a pesar de que estos colorantes presentan estructuras químicas diferentes. El empleo de consorcios microbianos en la degradación de colorantes tiene ventajas sobre el uso de cultivos simples, debido a que las especies presentes en el consorcio actúan en diferentes posiciones de la molécula del colorante o bien, degradan los productos metabólicos formados (Banat *et al.*, 1996; Knackmuss, 1996; Nigam, 1996 y Forgacs, *et al.*, 2004)

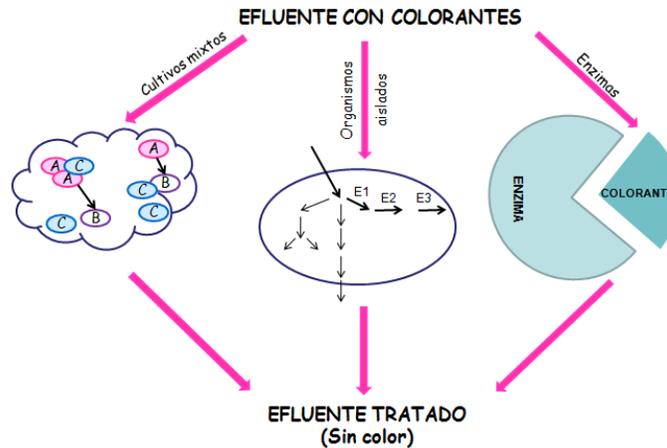


Figura 1.1. Estrategias que se siguen en la biorremediación de aguas residuales de la industria textil (modificado de Kandelbauer et Guebitz, 2006)

Se han utilizado bacterias, levaduras y hongos con la habilidad de remover el color, y en algunos casos, de lograr la mineralización del colorante (Banat *et al.*, 1996). Los microorganismos usados en la decoloración pueden aislarse de algún ambiente contaminado, como un efluente de la industria textil, por adaptación de cepas con el potencial de degradar colorantes o bien, aplicando técnicas de ingeniería genética para obtener microorganismos mejorados (Kandelbauer *et Guebitz*, 2006). Una de las ventajas de trabajar con cultivos de un solo tipo de microorganismo, es que las condiciones y los parámetros determinados son más reproducibles y la interpretación es más sencilla al trabajar con un sistema simple (Pearce *et al.*, 2003).

Se han utilizado bacterias como *Bacillus subtilis* (Horitsu *et al.*, 1977), *Clostridium perfringens* (Semdel *et al.*, 1998), *Pseudomonas spp.* (Hu, 1990; Yatome *et al.*, 1990; Chang *et al.*, 2001 y Hu, 2001), *Proteus vulgaris* (Dubin *et Wright*, 1975), *Streptococcus faecalis* (Gingellet Walker, 1971) entre otras.

Entre los microorganismos eucariontes más estudiados para decolorar colorantes están los hongos de la Putrefacción Blanca (hongos PB). Este tipo de hongos tienen la habilidad de mineralizar la lignina, que es un polímero complejo que forma parte de la madera. Además de la lignina, como sustrato natural, los hongos PB son capaces de mineralizar diversos compuestos orgánicos recalcitrantes, ya que las enzimas responsables de este proceso no son específicas y presentan afinidad por otros sustratos (Reddy, 1995). La

lignina peroxidasa (LiP) cataliza la oxidación de compuestos aromáticos no fenólicos, mientras que a manganeso peroxidasa (MnP) es capaz de oxidar numerosos compuestos fenólicos (Glen *et al.*, 1986). La lacasa es una enzima que contiene cobre y cataliza la oxidación de compuestos fenólicos, acoplado este proceso a la reducción de oxígeno a agua (Edens *et al.*, 1999).

La biodegradación de colorantes en un entorno contaminado es un proceso que involucra distintos metabolismos de una comunidad. En el trabajo de Knackmuss (1996) se evalúa la degradación de sulfonatos de naftaleno por un cultivo mixto de organismos de dos especies. La cepa BN6 de *Sphingomonas* es capaz de degradar el naftaleno-2-sulfonato, obteniendo como metabolito el ion salicilato, el cual es tóxico para la cepa BN6, por lo que es necesario integrar un organismo que complemente la red metabólica para lograr la completa degradación del naftaleno-2-sulfonato.

El presente trabajo se enfoca al diseño de biocatalizadores multiespecies, utilizando el acoplamiento de metabolismos celulares de distintos organismos. Para ello, se evaluó la capacidad de decoloración de *Trametes versicolor* y de *Pseudomonas putida*. Con el análisis metabólico, el modelo cinético y los datos obtenidos se diseñó un cultivo mixto con la capacidad de llevar a cabo la decoloración del colorante rojo ácido 27.

1.1. Justificación

Los efluentes de la industria textil tienen el problema de estar altamente contaminados con sustancias como colorantes, sales, metales, surfactantes, desinfectantes, insecticidas, grasas, solventes, entre otras, provenientes de cada uno de los procesos que lleva a cabo esta industria (Dos Santos *et al.*, 2006 y Ramesh *et al.*, 2007), además de que requiere de grandes volúmenes de agua para su funcionamiento, por lo que generan una gran cantidad de aguas residuales (Rakmi, 1993 y Chavan, 2001). Uno de los principales contaminantes de esta industria son los colorantes, estimándose que más del 30% de los colorantes se pierden y se desechan a través de los efluentes (Easton, 1995; O' Neall *et al.*, 1999; McMullan *et al.*, 2001). Aun cuando los colorantes se encuentren presentes en bajas concentraciones, estos son visibles y hacen evidente la contaminación ambiental que generan los efluentes de la industria textil. Por lo tanto, su eliminación de los efluentes de esta industria, representa un reto tecnológico en los procesos de tratamiento de aguas residuales. A pesar de que muchos de los colorantes no son tóxicos, los productos resultantes de su degradación pueden ser nocivos para la vida (Chung *et al.*, 1992; Chung *et Stevens*, 1993 y Weisburger, 2002). Muchos de los colorantes son estables a la luz, temperatura y degradación microbiana, estas características hacen de los colorantes moléculas recalcitrantes (Banat, 1996). Además las estructuras químicas de los colorantes resultan, a menudo, demasiado complejas y no pueden eliminarse de los efluentes usando tecnologías convencionales (Shaul *et al.*, 1991). Algunos de los métodos efectivos que se han usado para remover colorantes son la adsorción, transformación química, incineración, ozonación y fotocátalisis, aunque estas tecnologías resultan costosas (DeMoraes *et al.*, 2000). Los sistemas biológicos aplicados a la degradación de colorantes se consideran como una alternativa menos costosa y menos agresiva con el ambiente (Robinson *et al.*, 2001).

Para el tratamiento de efluentes contaminados se han obtenido cepas aisladas de entornos contaminados que, por adaptación natural, han desarrollado la capacidad de biodegradar los contaminantes presentes. En el trabajo de Yu *et al.*, 1991 se logró aislar de un reactor usado en una planta de tratamiento de aguas residuales domésticas, cepas de *Pseudomonas spp.* con una capacidad de decolorar colorantes de tipo azo de manera

efectiva. Sin embargo, al compararlo con la capacidad de decoloración que tiene el lodo activado del cual se aislaron las cepas, se encontró que el consorcio tiene una capacidad de degradar colorantes diversos.

Es necesario considerar que la actividad biodegradativa de un consorcio microbiano no depende de un solo tipo de microorganismo, sino que generalmente es resultado de la acción conjunta de la diversidad metabólica presente en el medio.

En este estudio se buscó analizar la biodecoloración de un colorante, integrando los conocimientos generados con la simulación y los cálculos teóricos de química computacional, así como el análisis de los metabolismos involucrados en la degradación de dicho colorante. De esta manera fue posible reducir el tiempo en el que ocurre el proceso de biodecoloración, lo que constituye una variable importante en el tratamiento de aguas residuales de la industria textil, además, esto permite suponer que es posible incrementar la eficiencia en la degradación de colorantes, respecto de las plantas de tratamiento convencionales.

El análisis funcional del consorcio microbiano, la simulación molecular de colorantes así como el modelo metabólico podrían extenderse a otro tipo de colorantes o de moléculas xenobióticas, aplicando los principios y el modelo cinético desarrollado en este trabajo de investigación.

1.2. Hipótesis

Es posible diseñar un cultivo mixto que lleve a cabo la decoloración del colorante rojo ácido 27, integrando el análisis metabólico y cinético de los microorganismos involucrados en el proceso. Este sistema representa un modelo simple de la decoloración que podría realizar una comunidad microbiana, donde el metabolismo de una especie complementa el de la otra.

1.3. Objetivo general

Diseñar, mediante un modelo cinético, un cultivo mixto de *Trametes versicolor* y *Pseudomonas putida* que pueda ser utilizado para la decoloración de efluentes textiles

1.4. Objetivos particulares

- Mediante estudios de química computacional, desarrollar el análisis molecular del colorante para evaluar la factibilidad del mecanismo de biodegradación propuesto.
- A través de ecuaciones cinéticas y los datos reportados en la literatura, proponer un modelo que permita simular el proceso de degradación del colorante en un sistema biológico formado por *T. versicolor* y *P. putida*.
- Comprobar y corregir el modelo propuesto utilizando los parámetros experimentales obtenidos a partir de cultivos individuales y mixtos de *T. versicolor* y *P. putida*.
- En base a los resultados de los cultivos de las especies individuales, establecer las condiciones experimentales para realizar el estudio de la decoloración del colorante rojo ácido 27 por un cultivo mixto (hongo-bacteria).
- Por medio de cultivos mixtos, analizar las interacciones metabólicas de inhibición que se presentan entre *T. versicolor* y *P. putida*.

CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

2.1. Contaminación ambiental debida a la industria textil

Muchas actividades industriales son caracterizadas por tasas de consumo de agua intensivo, además de que liberan grandes cantidades de efluentes, contaminadas con colorantes, al ambiente (ver Tabla 2.1). La principal fuente emisora de colorantes es la industria textil (Anjaneyulu *et al.*, 2005 y Días, *et al.*, 2007).

Tabla 2.1 Concentraciones de color y cantidad de agua generada por algunas industrias (modificada de Anjaneyulu *et al.*, 2005)

Industria	Cantidad de agua generada (m ³ /Ton)	Concentración de color (unidades Hazen)
Azucarera	0.4 m ³ /Ton caña triturada	150-200
Cervecería	0.25 m ³ /Ton de cerveza producida	200-300
Destilería	12 m ³ /Ton de alcohol producido	200-300
Curtido	28 m ³ /Ton de piel	400-500
Pulpa y papel	175 m ³ /Ton de papel	100-600
Textil	120 m ³ /Ton de fibra	1100-1300

Los efluentes de la industria textil se caracterizan por fluctuaciones extremas en parámetros, tales como: la demanda química de oxígeno (DQO), la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), pH, color y salinidad. La composición de contaminantes en el agua residual dependerá de las sustancias químicas y colorantes que se usen durante el proceso. Algunos de los parámetros característicos de estos efluentes son los siguientes (Kuhad, *et al.*, 2004; Dos Santos, *et al.*, 2007 y Ranganathan *et al.*, 2007):

- Color visible (1100-4500 unidades)

- Demanda química de oxígeno (800-1600 mg/L)
- pH alcalino (9-11)
- Sólidos totales (6000-7000 mg/L)

La composición del agua residual de una industria textil dependerá de las sustancias químicas que se usen durante el proceso (Manu *et al.*, 2002; Kuhad, *et al.*, 2004; Dos Santos, *et al.*, 2007 y Ranganathan *et al.*, 2007).

En la Figura 2.1 se muestra parte del proceso que se lleva a cabo en la industria textil y los contaminantes que se generan (Dos Santos *et al.*, 2007). En el proceso de teñido se generan una gran cantidad de efluentes con colorantes ya que alrededor del 30% de estos compuestos se pierden debido a las ineficiencias del proceso de teñido y son descargados a los efluentes. El uso de una amplia variedad de colorantes químicos da origen, en periodos cortos de tiempo, a efluentes extremadamente variados en su composición, que requieren de un tratamiento de aguas muy complejo (Nigam *et al.*, 1996; Kandelbauer *et al.*, 2005 y Días *et al.*, 2007).

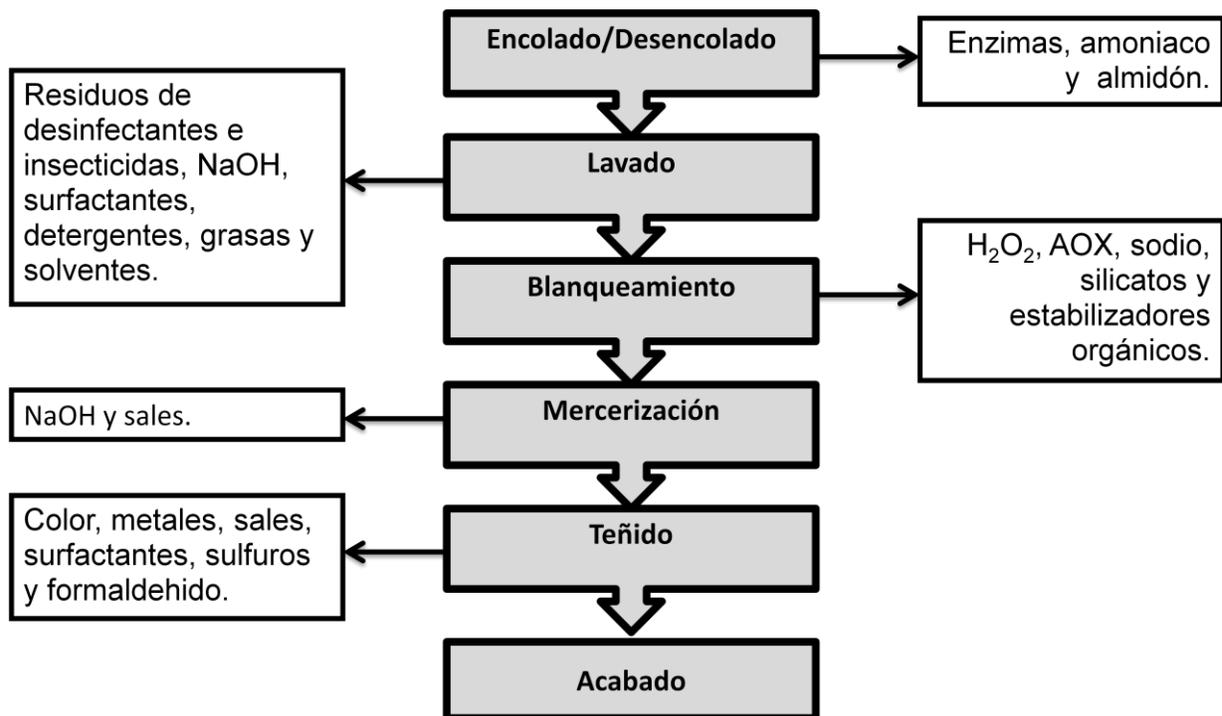


Figura 2.1. Principales contaminantes involucrados en algunos procesos de la industria textil del algodón (Modificado de Dos Santos *et al.*, 2007)

Ademoroti *et al.*, (1992) realizaron un estudio de las descargas de efluentes textiles en Nigeria y encontraron que el blanqueado, el calentamiento y el teñido; son tres de los procesos que tienen el mayor consumo de agua. Además, evaluaron la calidad del cuerpo receptor antes y después de las descargas (ver Tabla 2.2), con lo que pudieron evidenciar que la calidad del agua en el cuerpo receptor se afecta considerablemente.

Tabla 2.2. Efecto del efluente de una industria textil sobre la calidad del cuerpo receptor (Modificada de Ademoroti *et al.*, 1992).

Parámetro	Agua residual proveniente de diferentes procesos de una fábrica textil	Calidad del cuerpo de agua	
		Antes de la descarga del efluente	Después de la descarga del efluente
Color	Azul	Claro	Azul cielo
pH	8.4 – 10.0	7.2	7.7
Sólidos Suspendidos (mg/L)	185.0 - 294.0	11.3	67.6
Sólidos Totales (mg/L)	1,500 – 2,470	23.4	298.3
Oxígeno Disuelto (mgO ₂ /L)	***	8.3	1.3
DBO (mgO ₂ /L)	420.0 – 674.0	2.0	98.7
DQO (mgO ₂ /L)	843.5 – 1,171	***	***

Caudal de descarga: 258 L/min. *** No se menciona

2.2. Química de los colorantes textiles

Más de diez mil diferentes tipos de pigmentos y colorantes sintéticos son usados en diferentes industrias como la textil, papelera, cosmética y farmacéutica, entre otras. Dependiendo del tipo de colorante, se estima que del 2 al 50% de estos compuestos se desechan en las aguas residuales y se consideran como contaminantes persistentes que no pueden removerse con los métodos convencionales de tratamiento de aguas, debido a su origen y las estructuras complejas que presentan (Kuhad *et al.*, 2004; Días *et al.*, 2007 y Dos Santos *et al.*, 2007). En la Figura 2.2 se muestran las estructuras químicas de algunos colorantes que son comúnmente empleados en la industria textil.

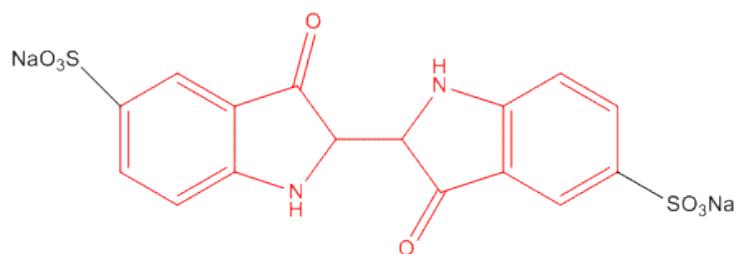
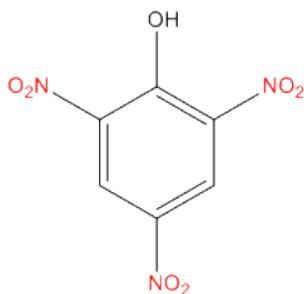
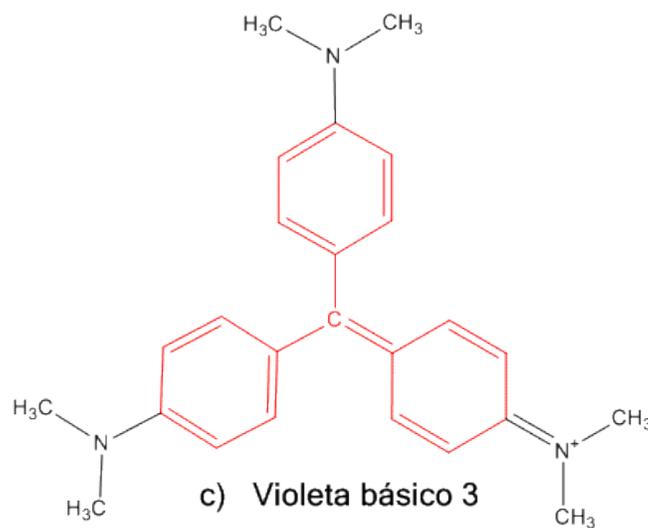
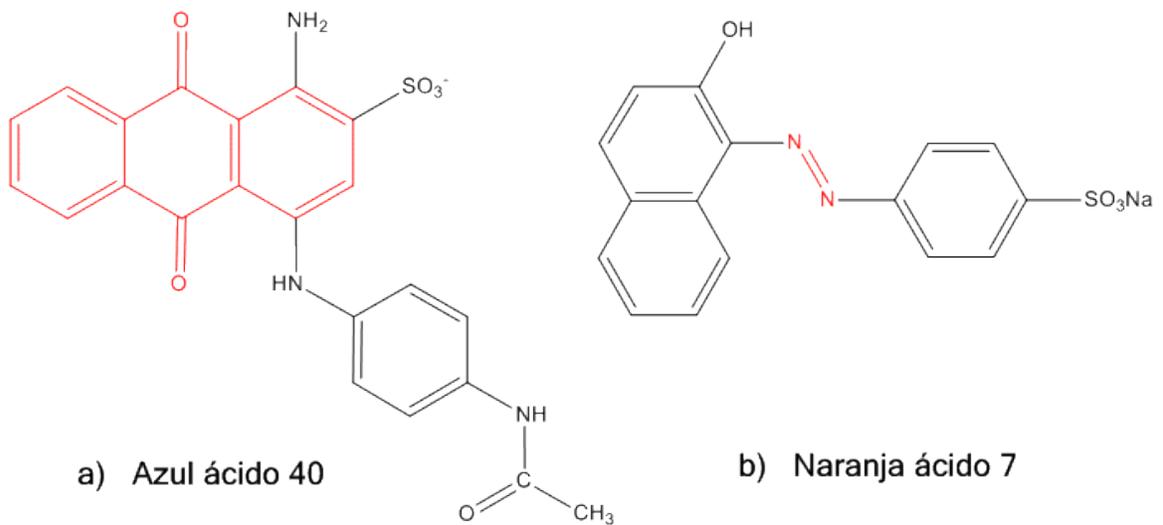
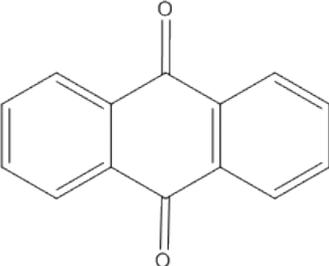
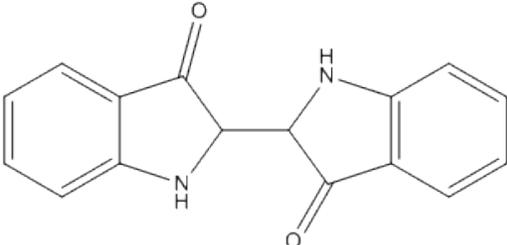
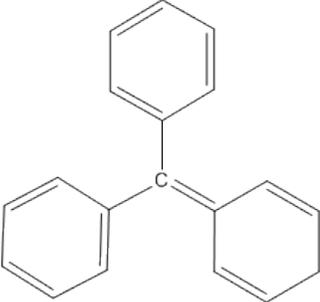


Figura 2.2. Ejemplo de algunos colorantes textiles y sus clases de cromóforos (en color rojo): (a) antraquinona (b) azo (c) triarilmetano (d) nitro y (e) índigo (modificado de Días *et al.*, 2007).

Los colorantes están formados por un grupo de átomos responsables del color (cromóforos). Los grupos cromóforos más comunes son los azo (-N=N-), carbonilo (C=O), metilo (-CH₃), nitro y grupos quinoides (Ver Tabla 2.3). Además de clasificarse por su grupo cromóforo, los colorantes también se clasifican de acuerdo a su aplicación: directos, reactivos, dispersos, entre otros (Christie, 2001 y Días *et al.*, 2007).

Tabla 2.3. Grupos cromóforos más comunes

Familia	Grupo cromóforo	Gama de colores
Azóicos	-N=N-	Amarillo-Azul
Antraquinonas		Amarillo-Violeta
Indólicos		Azul-Violeta
Triarilmetano		Naranja-Violeta

2.3. Impacto ambiental de los colorantes textiles

Se ha reportado que el tiempo de vida media del colorante azul 19 es de 46 años a 25°C y pH 7.0 (Hao *et al.*, 2000). Adicionalmente, los colorantes tienen una pobre fijación sobre las telas y en el líquido que se descargan, se pueden encontrar concentraciones de colorante arriba de 1,500 mg/L. Más del 90% de los colorantes persisten después de los tratamientos con lodos activados y son recalcitrantes a la acción de depuración con dichos tratamientos (Días *et al.*, 2007). Las estructuras químicas de las moléculas de colorantes resisten la exposición solar o el ataque químico, por lo que, en la mayoría de los casos, resultan también resistentes a la degradación microbiana. Por ejemplo, los colorantes azo causan efectos adversos sobre el crecimiento de los cultivos de bacterias metanogénicas, esta toxicidad puede deberse a los grupos funcionales de tipo azo o a los productos que se generan a partir del rompimiento de su enlace. Las aminas aromáticas que se generan de la ruptura del enlace azo son comúnmente conocidas por su potencial carcinógeno (Chung *et al.*, 1992; Chung *et Stevens*, 1993 y Weisburger, 2002). Una amplia variedad de microorganismos en el ambiente han demostrado que son capaces de degradar colorantes (Chung *et Stevens*, 1993).

Los colorantes, aún a bajas concentraciones, son altamente visibles y, dependiendo del proceso usado y de la normatividad vigente (por ejemplo, 1 ppm como concentración límite permisible en ríos para el caso del Reino Unido), es posible requerir de una reducción hasta del 98% de la concentración del colorante presente en el efluente industrial. Por esta razón, existe una fuerte demanda de tecnologías que permitan eliminar el color en estos efluentes y así hacer posible reciclar el importante volumen de agua que se consume durante el proceso. La degradación microbiana o enzimática podría permitir el reuso del agua tratada, ya que las enzimas solo atacan las moléculas del colorante, debido a su alta especificidad y dejan intactas los aditivos y las fibras (Kandelbauer *et Guebitz*, 2005).

2.3.1. Contaminación generada por colorantes provenientes de la industria textil

Los efluentes de la industria textil contienen una gran variedad de contaminantes provenientes de los diferentes procesos involucrados en la fabricación de fibras. Algunas causas de la toxicidad acuática son las sales como NaCl y Na₂SO₄ (provenientes del teñido), agentes surfactantes como fenoles, metales pesados que están presentes en los colorantes, compuestos orgánicos como solventes clorados (provenientes del lavado y la limpieza de máquinas), biocidas como el pentaclorofenol (proveniente de fibra de lana contaminada) y aniones tóxicos como el sulfuro (presente en algunos colorantes), entre otros (Bae *et al.*, 2005)

Aproximadamente del 10 al 15% de los colorantes son desechados en el ambiente durante el proceso de teñido de diferentes fibras (naturales y sintéticas), plásticos, piel, papel, aceites minerales, ceras e incluso en alimentos y cosméticos. Se ha demostrado que ciertos colorantes azo pueden ser carcinogénicos y mutagénicos, además de que sus productos de degradación pueden resultar más tóxicos (Brown *et DeVito*, 1993; Ramsay *et Nguyen*, 2002 y Gavril *et Hodson*, 2007b).

En los efluentes textiles se pueden encontrar metales como: arsénico, cadmio, cromo, cobalto, cobre, manganeso, mercurio, níquel, plata, titanio, zinc, estaño y plomo. Muchos de esos metales se generan durante el proceso de teñido. En la Tabla 2.4 se muestran algunos metales presentes en diferentes clases de colorantes.

Tabla 2.4. Metales típicos encontrados en colorantes (Bae *et al.*, 2006).

Clase de colorante	Metales
Directo	Cobre
Reactivo	Cobre y níquel
Ácidos	Cobre, cromo, cobalto
Premetalizados	Cobre, cromo, cobalto
Mordante	Cromo

Como puede observarse, uno de los metales más comunes en los colorantes es el cobre, este elemento es conocido por sus efectos negativos en cultivos vegetales y microorganismos, lo cual trae como consecuencia una disminución de la fertilidad del suelo. Los metales pesados en general tienen una baja solubilidad en agua, por lo que la concentración de metales en el agua depende de parámetros como el pH, potencial REDOX, contenido de materia orgánica y cantidad de metal presente. Para los colorantes que contienen metales como parte integral de la molécula, el contenido metálico es esencial para su rendimiento como colorante textil (Bae *et al.*, 2005).

2.3.2. Toxicidad de los colorantes

La toxicidad aguda de colorantes se puede evaluar utilizando *Daphnia magna*, *Salmonella thyphimurium*, peces, ensayos en ratas e incluso monitoreos biológicos a trabajadores de la industria textil (Mathur *et al.*, 2003; Bae *et al.*, 2005; Chhaya *et al.*, 2007; Dönbak *et al.*, 2007 y Kwon *et al.*, 2008).

Otra manera de evaluar la toxicidad es mediante ensayos de Microtox®, donde se calcula la EC₂₀ (concentración necesaria para reducir 20% de la luminiscencia) de una cepa modificada de *Vibrio fischeri* después de 5 min de incubación. Se evaluó la EC₂₀ para determinar la toxicidad de dosis menores de colorante, encontrando que no solamente algunos colorantes pueden ser tóxicos sino también sus productos de degradación (Ramsay *et al.*, 2002). Por lo tanto, no solamente es necesario evaluar la toxicidad sino también la de los subproductos generados durante la degradación del colorante. Las pruebas de toxicidad pueden verificar la eficiencia de enzimas o microorganismos no sólo para remover el color sino para disminuir la toxicidad. La pérdida de toxicidad junto con la pérdida de color permitirán que el efluente pueda ser descargado al ambiente de manera segura (Gavril *et al.*, 2007b y Ulson de Souza *et al.*, 2007).

Las aguas residuales textiles generalmente son poco biodegradables y exhiben cinéticas de degradación lentas. Los lodos activados son muy sensibles a numerosos compuestos tóxicos, con lo que, la medición de la inhibición del crecimiento de la biomasa nitrificante, que es causada por diferentes efluentes textiles, es una manera efectiva para medir el

potencial de inactivación del sistema de tratamiento biológico del efluente (Giordano *et al.*, 2005).

El trabajo de Kwon *et al.* (2008) mostró la actividad mutagénica del agua de un río cercana a una zona industrial textil, aun cuando no reporta la identificación química de los agentes mutagénicos. También se ha reportado el efecto tóxico de efluentes textiles en hígado y testículos de ratas albinas, encontrando cambios en el contenido total de lípidos y colesterol; lo que revela una disminución en la función testicular, además de alteraciones sobre la síntesis de proteínas sobre las células espermatozógenas. Así mismo se encontró la disminución de las proteínas en el hígado como resultado de la acción necrótica del efluente con colorantes. Dichos resultados fueron sustentados analizando los daños morfológicos observados en las células del hígado (Mathur *et al.*, 2003).

Los efluentes textiles son conocidos por ser inhibidores de algunas enzimas, incluyendo las ATPasas unidas a membrana. Estas enzimas son responsables, entre otras cosas, del movimiento de iones a través de la membrana. En el trabajo de Chhaya *et al.* (2007) se hicieron experimentos utilizando peces del fango del género *Periophthalmus*. Estos peces son capaces de vivir al aire libre alimentándose de insectos y pequeños crustáceos, forman parte de la cadena alimenticia costera y, además, se consumen ocasionalmente por los pescadores locales. En su estudio, los autores realizaron ensayos para determinar la toxicidad de los efluentes de industrias textiles y cómo afectan algunas ATPasas, encontrando una inhibición de la actividad enzimática en el hígado, el músculo y el cerebro. La disminución de la actividad enzimática de la ATPasa en el cerebro podría sugerir un efecto neurotóxico causado por los efluentes.

La mayoría de las poblaciones humanas están expuestas a una variedad considerable de sustancias tóxicas. Los monitoreos biológicos han llevado a estudiar diferentes ocupaciones para explorar sus riesgos en la salud. Dönbak *et al.* (2007) evaluaron el posible riesgo genotóxico para los trabajadores de la industria textil, quienes se exponen a una amplia variedad de químicos como colorantes textiles, agentes blanqueadores, ácidos, álcalis y sales. En los resultados de su estudio, los autores revelan que existe un riesgo de genotoxicidad en dichos trabajadores.

Por otro lado, algunos compuestos químicos orgánicos pueden ser absorbidos y utilizados por algunas plantas, tales como: el melón, el rábano y la papa. Los efluentes textiles

pueden reducir la germinación de las semillas y el crecimiento temprano de algunos vegetales (Zhou, 2001 y Rehman *et al.*, 2008).

2.4. Procesos empleados en la decoloración de efluentes textiles

Existen muchos métodos que se utilizan en el tratamiento de aguas residuales con colorantes. En la Tabla 2.5 se resumen los métodos más utilizados para los efluentes de la industria textil. Estos métodos se aplican de manera eficiente y se encuentran disponibles comercialmente. Algunas tecnologías son altamente específicas y con costos elevados, por lo que no se aplican para una amplia variedad de colorantes y no resuelven totalmente el problema de la decoloración (Kuhad *et al.*, 2004 y Anjaneyulu *et al.*, 2005).

Tabla 2.5. Métodos convencionales para el tratamiento de las aguas residuales de la industria textil.

Métodos Físicos			
Método	Ventajas	Desventajas	Referencias
Adsorción	Remueve eficientemente varios colorantes. Como adsorbentes se han usado sílica y, recientemente, materiales celulósicos obtenidos de residuos agroindustriales (maíz, cebada, entre otros). Además de su eficiencia es una tecnología económicamente atractiva.	Algunos de los materiales utilizados, como el carbón activado, tienen costos elevados y pérdidas en la regeneración. Por otro lado, los materiales menos costosos como las virutas de madera, requieren más tiempo de contacto y generan residuos.	Raghavacharyulu, 1997; Nigam <i>et al.</i> , 2000 y Chandran <i>et al.</i> , 2002.
Filtración por membrana	Se utiliza para remover colorantes a bajas concentraciones. Es un sistema resistente a temperatura y ataques microbianos.	Tiene altos costos y es ineficiente para la remoción de sólidos disueltos, por lo que se requieren tratamientos adicionales.	Fersi <i>et Dhahbi</i> , 2008 y Xu <i>et al.</i> , 1999.
Métodos Químicos			
Método	Ventajas	Desventajas	Referencias
Fotoquímico	Se puede utilizar para degradar moléculas orgánicas en CO ₂ y agua, ya sea en lote o en un sistema continuo con cortos tiempos de exposición. No se generan lodos.	Se pueden generar subproductos como halogenuros, metales, ácidos y aldehídos. Sólo es efectivo si las concentraciones de colorantes son bajas. Presenta altos costos.	Yang <i>et al.</i> , 1998 y Kositzki <i>et al.</i> , 2007.
Coagulación	Presenta buena eficiencia de remoción, se realiza en un periodo corto de tiempo y tiene bajos costos de inversión.	Se obtienen resultados pobres con colorantes ácidos y hay un alto costo de disposición por los volúmenes de lodos que resultan de este método.	Slokar <i>et Le Marechal</i> , 1998.

Métodos Químicos			
Método	Ventajas	Desventajas	Referencias
Electro-químico	Es un proceso relativamente nuevo que un gran potencial debido a que presente una alta tasa de remoción de colorantes. La mayoría de los subproductos que se presentan no son tóxicos.	Los costos de la electricidad son altos.	Pelegriani <i>et al.</i> , 1999: Vlyssides <i>et al.</i> , 1999 y Vlyssides <i>et al.</i> , 2000.
Oxidación	Es uno de los métodos más usados. Involucra el rompimiento de los anillos aromáticos. La oxidación con el reactivo de Fenton (Peróxido de Hidrógeno, activado con sales de Fe (II)) es un método adecuado para el tratamiento de aguas residuales resistentes a un tratamiento biológico. El hipoclorito de sodio (NaOCl) al igual que el ozono, son efectivos en el rompimiento de enlaces azo.	El reactivo de Fenton tiene como desventaja la formación de lodos. El uso de hipoclorito de sodio (NaOCl) genera subproductos tóxicos y carcinógenos. El ozono no resulta tan eficiente en la oxidación de colorantes dispersos.	Raghavacharyulu, 1997 y Pak <i>et Chang</i> , 1999.
Intercambio iónico	Es un método muy efectivo para remover colorantes catiónicos y aniónicos. No hay mucha pérdida del adsorbente en la regeneración.	Altos costos de operación. Sólo tiene aplicaciones específicas. Este método no es eficiente para colorantes de tipo disperso.	Slokar <i>et Le Marechal</i> , 1998; Mishra <i>et Tripathy</i> , 1993 y Robinson <i>et al.</i> , 2001.

Métodos Biológicos			
Método	Ventajas	Desventajas	Referencias
Bioabsorción	La biomasa microbiana puede usarse para absorber y remover colorantes de las aguas residuales. El proceso de absorción puede ir acompañado de una biodegradación.	Este método aún está en etapa de investigación, por lo que no se ha utilizado para tratar grandes volúmenes de agua. También ocasiona problemas en cuanto a la disposición de la biomasa que contiene colorantes adsorbidos.	Knapp <i>et al.</i> , 1997 y Chen <i>et al.</i> , 1999.
Bio-degradación	Se han aislado microorganismos con la capacidad de degradar diversos colorantes. Se han utilizado consorcios mixtos en sistemas combinados aeróbicos/anaeróbicos para remover colorantes, así como sistemas con células inmovilizadas.	Es necesaria más información fisiológica y genética. Se requiere una larga fase de aclimatación y se presenta resistencia a compuestos recalcitrantes.	Nigam <i>et al.</i> , 1996; Supaka <i>et al.</i> , 2004 y Dafale <i>et al.</i> , 2008.
Enzimático	Las preparaciones de lacasas y peroxidasas ofrecen un método para la decoloración de aguas residuales. Requiere tiempos cortos de contacto. Es muy eficiente para ciertos compuestos.	Es necesario un mayor análisis sobre los subproductos que se generan, estudios de escalamiento y una evaluación económica para poder aplicarse comercialmente. El aislamiento y purificación de las enzimas es difícil. Las enzimas se ven afectadas por variables como pH, temperatura, sales, metales, entre otros factores.	Shaffique <i>et al.</i> , 2002; Chhabra <i>et al.</i> , 2008 y Cristovao <i>et al.</i> , 2008.

2.4.1. Tratamientos físicos

La adsorción es uno de los métodos físicos más comunes para la remoción de colorantes, pero resulta ser una tecnología que se ve afectada por un gran número de factores, tales como: el área superficial del sorbente, el tamaño de partícula, el tipo de colorante, el pH y la temperatura, entre otros (Kumar *et al.*, 1998 y Anjaneyulu, 2005). Para seleccionar un adsorbente debe tener una alta afinidad, capacidad de adsorber compuestos diversos y presentar la posibilidad de regenerarse (Karcher *et al.*, 2001).

El carbón activado ha resultado efectivo para remover colorantes catiónicos y ácidos, aunque la remoción es moderada para colorantes dispersos, reactivos y directos (Raghavacharya, 1997). Las características del agua residual, así como el tipo de colorante presente influye en la eficiencia de remoción. El carbón activado es relativamente costoso y hay pérdidas del adsorbente del 10 al 15% durante el proceso de activación, por lo cual debe ser regenerado (Robinson *et al.*, 2001).

Para remover colorantes se han utilizado adsorbentes de bajo costo, obtenidos de materiales de desecho (Bousher *et al.*, 1997). Se ha comparado la habilidad de materiales de bajo costo (arcilla, corteza, cáscara de arroz, residuos de algodón, carbón) para adsorber moléculas de colorantes (McKay *et al.*, 1986). Además se han utilizado sustratos como mazorca de maíz (Gupta *et al.*, 1992), quitina (Annadurai *et al.*, 1997), residuos agrícolas (Nigam *et al.*, 2000), lodos residuales (Chaudhary *et al.*, 2002) entre otros materiales, con el fin de utilizarlos para remover colorantes debido a su bajo costo y disponibilidad. Estos materiales son muy baratos, no necesitan regeneración y tienen el potencial de remover el color, por lo que constituyen una alternativa al uso de carbón activado (Nigam *et al.*, 2000).

Otro método empleado para el tratamiento de efluentes de la industria textil es la filtración (ultrafiltración, nanofiltración y ósmosis reversa). La temperatura y composición del efluente determina el tipo y porosidad del filtro que se utiliza (Porter, 1997). La filtración por membrana permite el reciclaje del agua residual si los colorantes se encuentran a bajas concentraciones (Xu *et al.*, 1999 y Fersi *et al.*, 2008). Es ineficiente para la remoción de sólidos disueltos, por lo que son necesarios tratamientos adicionales (Slokar *et al.*, 1998). En el trabajo de Mutlu *et al.* (1992) se alcanzó una eficiencia del

89% utilizando la filtración por membrana como un pretratamiento, antes de llevar a cabo la nanofiltración.

La decoloración de una mezcla de colorantes en una muestra de agua, se puede llevar a cabo a través de un sistema de intercambio iónico, con el inconveniente de que el colorante se adsorbe irreversiblemente a la resina (Mock *et Hamodua*, 1998). La remoción de color mediante la técnica de intercambio iónico no se ha utilizado ampliamente debido a que solo es eficiente para algunos tipos de colorantes (Slokar *et Le Marechal*, 1998). Las ventajas de usar esta técnica es que no hay pérdida del adsorbente durante su regeneración y se pueden recuperar los solventes después de utilizarlos, sin embargo el costo de operación es alto (Mishra *et Tripathy*, 1993).

2.4.2. Tratamientos químicos

Los procesos avanzados de oxidación son procesos que involucran la generación y uso de radicales hidroxilos en cantidades suficientes para oxidar la mayoría de los compuestos químicos que se encuentran en el efluente (Gogate *et Pandit*, 2004). Los radicales hidroxilo tienen un alto potencial de oxidación. El mecanismo de acción en estos procesos se puede definir en dos pasos: a) La generación de los radicales hidroxilo y b) La reacción de oxidación de estos radicales con las moléculas presentes (Azbar *et al.*, 2005).

El uso de ozono para el tratamiento de efluentes textiles, parece ser una alternativa con un gran potencial, ya que este compuesto es un agente oxidante fuerte, comparado con otros como el peróxido de hidrógeno. El ozono puede degradar los colorantes, ya que puede romper los grupos cromóforos (Oguz *et Keskinler*, 2006).

La reacción entre el ión ferroso (Fe (II)) con peróxido de hidrógeno se conoce como reacción de Fenton. La oxidación con el reactivo de Fenton es un método adecuado para el tratamiento de aguas residuales resistentes a un tratamiento biológico, este método puede ser usado para tratar colorantes solubles e insolubles (Pak *et Chang*, 1999). En comparación con la ozonación, este método es relativamente barato y presenta una alta eficiencia de remoción de la demanda química de oxígeno (DQO) y del color (Van der Zee, 2002). Una desventaja de este método es la formación de lodos residuales debido al uso de agentes para la floculación (Robinson, 2001).

Los métodos fotoquímicos (UV/H₂O₂) pueden utilizarse para degradar moléculas orgánicas en CO₂ y agua, ya sea en lote o en un sistema continuo con tiempos cortos de exposición (Yang *et al.*, 1998).

El tratamiento electroquímico es un proceso relativamente nuevo que tiene una eficiente remoción de colorantes y la degradación de contaminantes (Pelegriani *et al.*, 1999). Este proceso requiere temperaturas más bajas comparadas con los tratamientos no electroquímicos, además de que no requiere la adición de otros compuestos químicos (Kim *et al.*, 2002). Vlyssides *et al.*, (2000) reportó una reducción del color del 100% en un tiempo de 6 minutos usando un proceso de electrólisis.

2.4.3. Tratamientos biológicos

Entre los microorganismos con capacidad de degradar colorantes se encuentran bacterias como *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas mendocina*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces sp*, *Shewanella decolorationis*, así como hongos de las especies *Funalia trogii*, *Aspergillus niger*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor*, entre otros. Los microorganismos utilizan una amplia variedad de mecanismos como la bioabsorción, la biodegradación (aerobia o anaerobia) y la producción de enzimas extracelulares (Kuhad *et al.*, 2004). Los métodos biológicos se consideran como: efectivos, específicos y menos nocivos al ambiente (Baker *et Herson*, 1994).

Para la decoloración, los sistemas biológicos de tratamiento de aguas residuales pueden contener cultivos mixtos, organismos aislados o enzimas aisladas (Kandelbauer *et Guebitz*, 2005). En la Tabla 2.6 se muestran ejemplos de algunos microorganismos utilizados en el tratamiento biológico de colorantes, así como su mecanismo de acción (Kuhad *et al.*, 2004).

Tabla 2.6. Microorganismos utilizados en el tratamiento de colorantes y su mecanismo de acción para la decoloración.

Especie	Mecanismo	Referencia
Bacterias		
<i>Citrobacter</i> sp.	Biodegradación- bioabsorción	An <i>et al.</i> , 2002.
<i>Proteus mirabilis</i>	Biodegradación- bioabsorción	Chen <i>et al.</i> , 1999.
<i>Streptomyces</i> sp.	Peroxidasa	Ball <i>et al.</i> , 1989.
<i>S. chromofuscus</i> ,	Peroxidasa	Goszczyński <i>et al.</i> , 1994.
<i>Shewanella decolorationis</i>	Reducción anaeróbica	Hong <i>et al.</i> , 2007.
<i>Proteus vulgaris</i>	Reducción anaeróbica	Dubin <i>et Wright</i> , 1975.
<i>Pseudomonas mendocina</i>	Biodegradación aerobia	Sarnaik <i>et Kanekar</i> , 1999.
<i>Bacillus subtilis</i>	Biodegradación aerobia	Horitsu <i>et al.</i> , 1977.
Hongos		
<i>Funalia trogii</i>	Adsorción- biodegradación	Yesilada <i>et al.</i> , 2002 y Park <i>et al.</i> , 2007.
<i>Aspergillus niger</i>	Adsorción- biodegradación	Fu <i>et Viraraghavan</i> 2002 y Bhole <i>et al.</i> 2004.
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Lignina peroxidasa	Glen <i>et Gold</i> , 1983 y Goszczyński <i>et al.</i> , 1994.
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Peroxidasa	Novotny <i>et al.</i> , 2001.
<i>Trametes versicolor</i>	Biosorción Ligninasa	Wang <i>et Yu</i> , 1998 y Toh <i>et al.</i> , 2003.

2.4.3.1. Biosorción

Un método novedoso para la remoción del color de efluentes es la adsorción o absorción de las sustancias coloridas en varios materiales, tales como: aserrín, carbón activado, arcillas, suelos, composta, lodos activados, comunidades vegetales, polímeros sintéticos o sales inorgánicas coagulantes (Chandran *et al.*, 2002). Al proceso que utiliza la biomasa, generalmente se le llama biosorción, donde la remoción del color se alcanza por la adsorción de las células con o sin biodegradación. Algunas especies de bacterias y hongos han sido reportadas por su capacidad para remover colorantes utilizando el proceso de adsorción. El trabajo de Chen *et al.* (1999), reportan un alto porcentaje de decoloración de una solución del colorante azo (rojo RBN) utilizando una cepa de *Proteus mirabilis*, aislada de un lodo proveniente de una planta de tratamiento de aguas residuales. Un porcentaje de la decoloración (13-17) se debe al proceso de biosorción de las células

bacterianas. También se puede lograr la eliminación del color a través del proceso de biosorción usando células de hongos (Fu *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003 y Bhole *et al.*, 2004). En algunos casos, el mecanismo de decoloración implica no solamente la adsorción, sino que también un proceso de degradación enzimática (Knapp *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2007 y Yesilada *et al.*, 2010). Estos métodos no se han aplicado en grandes volúmenes de aguas residuales, debido a los problemas asociados con la biomasa que se obtiene después de la biosorción (Kuhad *et al.*, 2004).

2.4.3.2. Biodegradación.

Como se puede apreciar en la Tabla 2.6, existe una amplia variedad de microorganismos que pueden emplearse para la decoloración de efluentes. La habilidad de las actinobacterias, principalmente especies de *Streptomyces*, para decolorar y mineralizar colorantes textiles se ha comprobado en diferentes estudios (Ball *et al.*, 1989; Goszczynski *et al.*, 1994 y Ball *et al.*, 1996). Diversas especies de bacterias reducen los enlaces azo de los colorantes textiles, este proceso es el paso inicial en la degradación bacteriana de este tipo de moléculas (Stolz, 2001 y Pandey *et al.*, 2007).

La decoloración puede realizarse de manera aerobia o anaerobia, dependiendo del tipo de bacteria que se utilice. Hay otros reportes sobre el metabolismo aerobio de colorantes azo utilizando diferentes cepas de bacterias, por ejemplo *Aeromonas* sp., *Bacillus subtilis*, *Proetus mirabilis* y *Pseudomonas luteola* (Horitsu *et al.*, 1977; Chen *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2000; Hayase *et al.*, 2000). La azoreducción puede ser estimulada por la adición de inductores como el CaCl_2 (Dawkar *et al.*, 2009) o co-sustratos como la glucosa (Haug *et al.*, 1991). Además de colorantes azo, también está reportada la degradación bacteriana de otro tipo de colorantes. *Citrobacter* sp. tiene la capacidad de decolorar diversos colorantes recalcitrantes de tipo azo y trifenilmetano, utilizando mecanismos de biosorción y biodegradación (An *et al.*, 2002). El cristal violeta (colorante trifenilmetano) puede ser degradado a través de una mineralización aeróbica por bacterias como *Pseudomonas mendocina* (Sarnaik *et al.*, 1999) y *Pseudomonas putida* (Chen *et al.*, 2007). Se han reportado que algunas bacterias pueden romper el enlace azo de algunos colorantes bajo condiciones anaerobias, dando lugar a la decoloración y formación de aminas aromáticas

(Chung *et al.*, 1992). En algunos casos, la decoloración puede ir acompañada no sólo de la degradación del colorante, sino de la producción de aminas aromáticas. Se ha reportado la completa mineralización de colorantes en condiciones anaerobias utilizando cultivos mixtos de lodos activados o cultivos enriquecidos (Nigam *et al.*, 1996 y González-Gutierrez *et al.*, 2009). Es posible utilizar sistemas capaces de mineralizar completamente colorantes en sistemas aerobios-anaerobios o bien bajo condiciones anóxicas. Haug *et al.* (1991), lograron la completa mineralización de un colorante azo bajo condiciones anaerobias utilizando un consorcio bacteriano crecido en condiciones aeróbicas. En el trabajo de Yu *et al.* (2001), se aislaron cepas de un lodo activado de un sistema aerobio-anaerobio, logrando la degradación en condiciones anóxicas de colorantes azo con diferentes estructuras químicas utilizando cepas de *Pseudomonas*. La velocidad de degradación depende de variables como: el pH, la temperatura, los nutrientes, entre otros. Los hongos PB son los organismos más estudiados en la degradación de colorantes debido a que son capaces de degradar sustratos complejos a través de un sistema enzimático no específico (Knapp *et al.*, 2001). La decoloración de colorantes por un hongo PB fue reportada por primera vez por Glenn *et al.* en 1983, quienes evaluaron la decoloración de colorantes poliméricos sulfonados utilizando *Phanerochaete chrysosporium*. A partir de entonces se han publicado numerosos trabajos donde se evalúa la capacidad de *P. chrysosporium* y de otros hongos como *Cyathus bulleri*, *Trametes versicolor*, *Phlebia tremellosa* y *Thelephora* sp., usados para degradar colorantes (Goszczyński *et al.*, 1994; Vasdev *et al.*, 1994; Swamy *et al.*, 1999; Kirby *et al.*, 2000; Selvam *et al.*, 2003 y Toh *et al.*, 2003). Novotny (2001), seleccionó entre 103 especies de hongos a las especies *Irpex lacteus* y *Pleurotus ostreatus* por su capacidad de degradar colorantes de diferente tipo (azo, diazo, antraquinona, trifenilmetano y ftalocianina).

2.4.3.3. Métodos enzimáticos

Las células vivas se consideran como un reactor de decoloración en miniatura. Esta decoloración puede ser resultado de la retención física del colorante en la biomasa (Chandran *et al.*, 2002). Por otro lado, la transformación bioquímica del colorante puede

ocurrir fuera de las células si las enzimas son excretadas al medio o dentro de la célula si el colorante puede ser transportado al interior de ésta. Algunas de las enzimas que se utilizan en la degradación de colorantes son: lacasas, peroxidasas, monooxigenasas y dioxigenasas, entre otras (Kandelbauer *et Guebitz*, 2005). Las enzimas extracelulares como las lacasas y peroxidasas, generalmente, se producen por hongos cuya función natural es degradar la lignina (polímero presente en la madera). La habilidad de los hongos PB para degradar colorantes y otros compuestos xenobióticos se debe a la naturaleza, no específica, de su sistema enzimático. El uso de lacasas y peroxidasas para la degradación de compuestos xenobióticos resulta muy prometedor (Harvey *et Thurston*, 2001).

Se ha reportado la decoloración de una mezcla de colorantes, simulando un efluente real, a través de una lacasa comercial, además se obtuvo el modelo cinético de esta degradación (Cristóvão *et al.*, 2008). También hay numerosos reportes de la degradación de colorantes azo, trifenilmetano y antraquinona utilizando la lacasa de *Pyricularia oryzae*, *Trametes hirsuta*, *Pycnoporous sanguineus* y *Sclerotium rolfsii* (Muralikrishna *et Renganathan*, 1995; Abadulla *et al.*, 2000; Pointing *et Vrijmoed*, 2000 y Ryan *et al.*, 2003)

2.4.4. Ingeniería genética aplicada a la degradación de colorantes

Los microorganismos empleados en la remoción de colorantes se pueden obtener de entornos donde existan colorantes, como ocurre con los efluentes de la industria textil. Usualmente no se trata de aislar las cepas que por adaptación natural son capaces de degradar colorantes, sino de aprovechar los beneficios de su presencia, por ejemplo, en una planta de tratamiento municipal. Se ha reportado la obtención de bacterias o consorcios microbianos capaces de degradar colorantes, como resultado de la adaptación que desarrollan dichos organismos, en respuesta al estrés ambiental y a la presión evolutiva que les causan las condiciones del efluente (Yu *et al.*, 2001; Dafale *et al.*, 2008 y Kalyani *et al.*, 2008).

Mediante técnicas de ingeniería genética se pueden obtener cepas híbridas con la capacidad de degradar colorantes. Aplicando dichas técnicas se han identificado diversos genes que confieren la habilidad de degradar colorantes y se ha reportado la decoloración

de un colorante azo usando una cepa de *Escherichia coli* con los genes de una azoreductasa de una cepa silvestre de *Pseudomonas luteola*. Esta metodología permite acortar los tiempos que se utilizarían para adaptar un cultivo apropiado y luego aislar las cepas (Chang *et al.*, 2000). Chang *et al.* (2001), clonaron y expresaron un fragmento de DNA genómico de *Rhodococcus* sp. en *E. coli*. La cepa recombinante contiene un fragmento de 6.3 kb con los genes responsables de la decoloración de colorantes azo.

Ghoropade *et al.* (1993), demostraron que una cepa de *P. putida* modificada genéticamente, puede degradar colorantes en condiciones aerobias. Wang *et al.* en el 2012, modificaron una cepa de *P. putida*, incorporando una lacasa en la superficie celular, para que la bacteria pudiera degradar colorantes de tipo antraquinona.

2.5. *Trametes versicolor* en procesos de decoloración

Uno de los organismos más estudiados para la decoloración de colorantes son los hongos PB, debido a su habilidad para mineralizar la lignina como sustrato natural, además de un amplio rango de contaminantes. La habilidad de degradar diferentes sustratos se debe a la naturaleza no específica de las enzimas lignolíticas que producen (Reddy, 1995 y McMullan *et al.*, 2001).

Trametes versicolor es un hongo PB que ha sido utilizado en investigaciones sobre bioremediación de aguas residuales. Las enzimas lignolíticas que produce *T. versicolor* se expresan desde la fase de crecimiento, lo que le confiere una ventaja sobre otros hongos del mismo tipo (Keharia *et al.*, 2002). Este hongo ha sido utilizado para degradar la lignina (Reid, 1998 y Kolb *et al.*, 2012), pesticidas (Hai *et al.*, 2011), hidrocarburos aromáticos (Johanes *et al.*, 2000; Ullah *et al.*, 2000 y Demir, 2004), colorantes (Ramsay *et al.*, 2004 y Kaushik *et al.*, 2009) y otros compuestos xenobióticos (Rodríguez *et al.*, 2012).

Se han utilizado pellets de carbón activado y micelio de *T. versicolor* para absorber colorantes textiles y de esta manera eliminar el color (Zhang *et al.*, 2000).

Además de llevar a cabo el proceso de adsorción, *T. versicolor* puede llevar a cabo la degradación de colorantes sintéticos a través de las enzimas extracelulares que produce (Wang *et al.*, 1998).

Se ha evaluado la degradación de colorantes industriales utilizando cultivos de *T. versicolor*. Durante la decoloración se ha detectado la actividad de las enzimas lacasa y manganeso peroxidasa (Keharia *et Madamwar*, 2002 y Toh *et al.*, 2003).

2.6. *Pseudomonas putida* en procesos de decoloración

P. putida es una bacteria aerobia Gram-negativa, que ha mostrado una gran versatilidad metabólica, por lo que se ha adaptado a entornos variados como suelos, sistemas acuáticos, rizósfera, entre otros. (Timmis, 2002 y Dos Santos *et al.*, 2004). *P. putida* se ha usado como un modelo experimental y se han encontrado numerosas aplicaciones en agricultura, biocatálisis, producción de bioplásticos y bioremediación (Molina *et al.*, 2000; Schmid *et al.*, 2001; Dos Santos *et al.*, 2004; Pieper *et al.*, 2004 y Cheung *et Gu*, 2007).

La degradación de compuestos aromáticos por *P. putida* se lleva a través de vías metabólicas establecidas, lo que facilita la manipulación de esta cepa para incrementar estos procesos de biodegradación (Jiménez *et al.*, 2002). Se ha estudiado la biodegradación, a través de *P. putida*, de compuestos aromáticos como fenol (Hill *et Robinson*, 1975; Monteiro *et al.*, 2000 y Chen *et al.*, 2007), 2,4-diclorofenol (Kargi *et Eker*, 2005), mezclas de fenol y catecol (Kumar *et al.*, 2005), mezclas de benceno, tolueno y fenol (Reardon *et al.*, 2000), entre otros.

Algunos microorganismos, como bacterias, hongos y algas, pueden degradar o absorber colorantes (Robinson *et al.*, 2001). Tripathi *et Srivastava* (2011), reportaron una cepa de *P. putida* que tiene la capacidad de decolorar el naranja ácido 10, un colorante de tipo azo. *P. putida* tiene la capacidad de producir una enzima azoreductasa en condiciones anaerobias, la cual puede ser la encargada del proceso de decoloración (Mendes *et al.*, 2011 y Yang *et al.*, 2011). El paso básico en la decoloración de colorantes de tipo azo, es el rompimiento del grupo cromóforo (grupo azo), lo cual trae como consecuencia la remoción del color. Las aminas aromáticas resultantes se pueden metabolizar bajo condiciones aerobias (Kapdan *et al.*, 2003).

CAPÍTULO 3. Metodología

3.1. Modelos moleculares, enzimáticos y metabólicos

En este trabajo se utilizó la teoría de funcionales de la densidad (DFT) para analizar los metabolitos que se generan en el mecanismo de biodegradación de el colorante azo rojo ácido 27 (amaranto, $C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$; 3-oxo-4-[(4-sulfonatoftalen-1-il)hidraziniliden]naftalen-2,7-disulfonato; Figura 3.1).

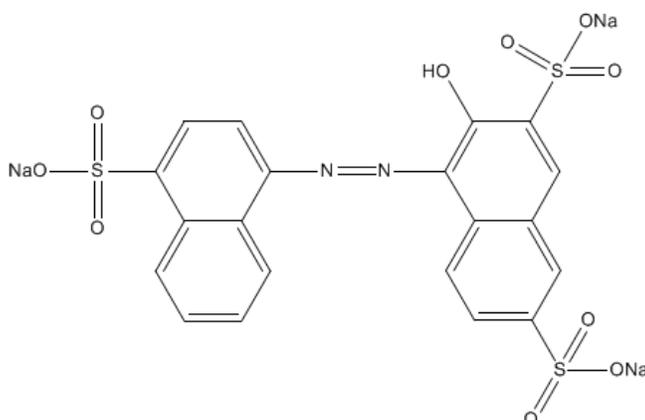


Figura 3.1. Estructura del colorante rojo ácido 27 (amaranto).

Las propiedades estructurales, electrónicas de los metabolitos generados en la degradación del colorante se describieron utilizando el programa Gaussian 03, con el funcional híbrido de intercambio y correlación B3LYP y la base 6-31G** para todos los átomos.

3.2. Simulación de un sistema biológico (hongo-bacteria) con la capacidad de degradar el colorante rojo ácido 27

El mecanismo propuesto para la degradación del colorante azo rojo ácido 27 utilizando *Trametes versicolor* se reportó en el 2006 (Gavril et Hodson, 2007a). De acuerdo a Gavril et Hodson (2007a), durante la degradación del colorante se producen metabolitos aromáticos, por lo que en este trabajo de investigación se propuso un sistema de dos especies donde el hongo (*T. versicolor*) se encarga de empezar a degradar el colorante y una bacteria (*Pseudomonas putida*) degrada los productos aromáticos que se generan durante la degradación. El modelo conceptual que representa el cultivo mixto propuesto se muestra en la Figura 3.2.

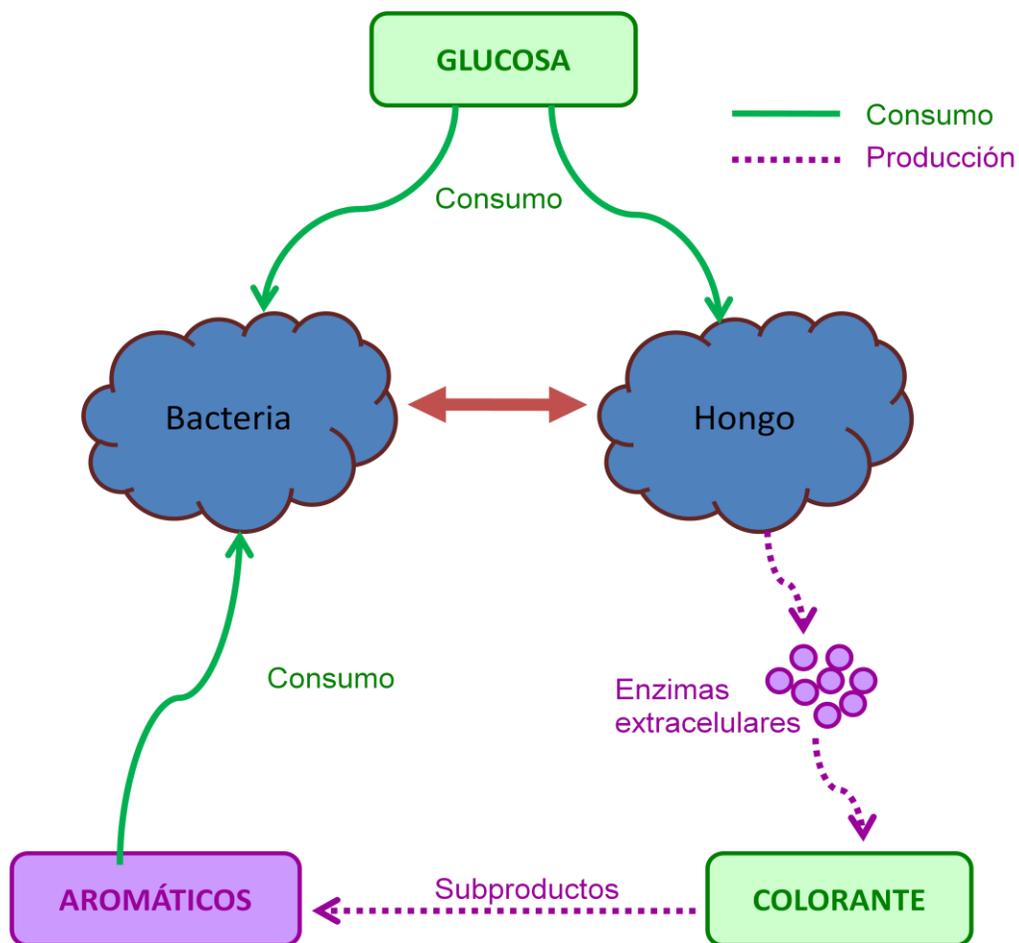


Figura 3.2. Modelo conceptual propuesto

Se plantearon ecuaciones para simular el comportamiento de un cultivo mixto formado entre *T. versicolor* y *P. putida*. Para resolver las ecuaciones se consideraron los datos cinéticos reportados en la literatura (Tabla 3.1)

Tabla 3.1. Parámetros utilizados para obtener una solución del modelo matemático planteado.

Condiciones iniciales				
Parámetro	Símbolo	Valor	Unidades	Referencia
Biomasa inicial de <i>T. versicolor</i>	X_H	0.01	$g_T L^{-1}$	Parámetros experimentales propuestos para este trabajo.
Biomasa inicial <i>P. putida</i>	X_B	0.01	$g_P L^{-1}$	
Concentración de glucosa en el medio	C_{Glc}	11	$g_{Glc} L^{-1}$	
Concentración de colorante en el medio	C_{col}	0.1	$g_{col} L^{-1}$	Ramsay <i>et al.</i> , 2006
Concentración de la enzima	C_{enz}	0	$U_{enzima} L^{-1}$	Tavares <i>et al.</i> , 2006
Parámetros cinéticos de <i>T. versicolor</i>.				
Parámetro	Símbolo	Valor	Unidades	Referencia
Constante de saturación de la glucosa(hongo)	K_{sTglc}	4.21	$g_{Glc} L^{-1}$	Tavares <i>et al.</i> , 2006
Constante de Monod para <i>T. versicolor</i> consumiendo glucosa	$(\mu_{max})_H$	0.87	d^{-1}	Tavares <i>et al.</i> , 2006
Rendimiento lacasa a partir de glucosa	$Y_{lacasa -glc}$	48.63	$U g_{Glc}^{-1}$	Thiruchelvam <i>et al.</i> , 2007.
Rendimiento de <i>T. versicolor</i> consumiendo glucosa	Y_{T-Glc}	0.17	$g_T g_{glc}^{-1}$	Tavares <i>et al.</i> , 2006
Constante de decaimiento de la enzima	K_d	0.667	d^{-1}	Tavares <i>et al.</i> , 2006
Constante de decoloración del colorante por la enzima	k_{dec}	0.125	d^{-1}	Ramsay <i>et al.</i> , 2006

Constante de producción de la enzima	k_{enz}	1932	$U_{enzima} g_T^{-1} d^{-1}$	Tavares <i>et al.</i> , 2006
Constante de decaimiento celular para el hongo	k_{dT}	0.0921	d^{-1}	Tavares <i>et al.</i> 2006
Coeficiente de mantenimiento de <i>T. versicolor</i> a partir de glucosa	k_{mT}	0		Se consideró como no significativo.
Parámetros cinéticos de <i>P. putida</i>.				
Parámetro	Símbolo	Valor	Unidades	Referencia
Constante de saturación de la glucosa (bacteria)	K_{sPglc}	0.06	$g_{Glc} L^{-1}$	Choi <i>et al.</i> , 2008
Constante de saturación de aromáticos	K_{saro}	0.032	$g_{aro} L^{-1}$	Reardon <i>et al.</i> , 2002
Constante de Monod para <i>P. putida</i> consumiendo glucosa	$(\mu_{max})_B$	3.84	d^{-1}	Choi <i>et al.</i> , 2008
Constante de Monod para <i>P. putida</i> consumiendo aromáticos	$(\mu_{max})_{aroB}$	2.64	d^{-1}	Reardon <i>et al.</i> , 2002
Rendimiento de <i>P. putida</i> consumiendo glucosa	Y_{P-Glc}	0.44	$g_P g_{glc}^{-1}$	Del Castillo <i>et al.</i> , 2007
Rendimiento de <i>P. putida</i> consumiendo aromáticos	Y_{P-aro}	0.80	$g_P g_{aro}^{-1}$	Reardon <i>et al.</i> , 2002
Constante de decaimiento celular para la bacteria	k_{dP}	0.0921	d^{-1}	Estimado
Coeficiente de mantenimiento de <i>P. putida</i> a partir de glucosa	k_{mP}	0		Se consideró como no significativo.
Coeficiente estequiométrico de aromáticos a partir del colorante	a	2.3476	$g_{aro} g_{col}^{-1}$	Cálculo aproximado.

3.2.1. Resolución del modelo matemático

Se utilizó el método numérico de Runge-Kutta de cuarto orden (Chapra *et* Canale, 2003), para resolver el sistema de ecuaciones propuestas. La fórmula del método es:

$$y_{n+1} = y_n + \Delta y_n \quad (3.1)$$

$$\Delta y_n = \frac{\Delta t}{6} (k_0 + 2k_1 + 2k_2 + k_3) \quad (3.2)$$

donde

$$k_0 = f(t_n, y_n) \quad (3.3)$$

$$k_1 = f\left(t_n + \frac{\Delta t}{2}, y_n + \frac{k_0}{2} \Delta t\right) \quad (3.4)$$

$$k_2 = f\left(t_n + \frac{\Delta t}{2}, y_n + \frac{k_1}{2} \Delta t\right) \quad (3.5)$$

$$k_3 = f(t_n + \Delta t, y_n + k_2 \Delta t) \quad (3.6)$$

Las cantidades de k representan las pendientes en varios puntos:

- k_0 es la pendiente en el punto inicial del intervalo
- k_3 es la pendiente en el punto final del intervalo
- k_2 es una de las pendientes a mitad del intervalo con ordenada $\left(y_n + \frac{1}{2} k_1 \Delta t\right)$
- k_1 es la 2ª pendiente a mitad del intervalo con ordenada $\left(y_n + \frac{1}{2} k_0 \Delta t\right)$

Las ecuaciones planteadas describen el crecimiento a partir de glucosa de los cultivos del hongo (*T. versicolor*) y la bacteria (*P. putida*). En el caso de la bacteria, también se consideró su crecimiento a partir de los productos aromáticos que se generen durante la degradación del colorante. Se evaluaron los gradientes de concentración de la glucosa y el colorante, así como la producción de compuestos aromáticos y de enzimas extracelulares. Los cálculos se programaron en una hoja de Excel.

3.3. Características de las cepas

Las cepas utilizadas en este trabajo fueron:

- *Trametes versicolor* ATCC 20869. Es un hongo White rot que, entre otras aplicaciones, ha sido utilizada para producir lacasa y manganeso peroxidasa. Estas enzimas son las que llevan a cabo la degradación del colorante azo rojo ácido 27.
- *Pseudomonas putida* ATCC 12633. Cepa que puede degradar algunos ácidos aromáticos así como metabolizar el mandelato.

3.4. Condiciones de cultivo y conservación de las cepas

Conservación: La cepa de *T. versicolor* se mantuvo en placas de agar papa dextrosa (PDA), las cuales se resembraron cada dos meses. La cepa de *P. putida* se almacenó en tubos eppendorf a -40 °C en leche estéril con glicerol al 20%.

Inóculos: El inóculo de *P. putida* se preparó creciendo los microorganismos en matraces Erlenmeyer con 40 ml de caldo soya tripticasa (28°C, 150 rpm). Para el caso de *T. versicolor* se utilizó un inóculo estandarizado que consiste en lo siguiente:

- a) Preinóculo.** Se utilizaron 50 mL de agua estéril a la que se le agregó micelio que previamente había crecido durante 7 días en una caja de PDA. El micelio se agregó en trozos de 1-2 cm² y se dejó en agitación 24 h a 27 °C con el fin de que el micelio se separara del agar.
- b) Obtención del pellet.** Se utilizó medio Kirk suplementado con 10 g/L de glucosa y tartrato de amonio como fuente de nitrógeno. A este medio se le agregó 10% de preinóculo y se dejó en incubación de 5-7 días hasta la formación de los pellets (27 °C). Estos pellets se utilizaron para los ensayos cualitativos en placa y para las pruebas de decoloración en medio líquido.

Medios de crecimiento y decoloración. Para los cultivos se utilizaron los siguientes medios:

- a) **Medio Kirk modificado** (Kirk *et al.*, 1986), que contenía por litro: 10.1 g glucosa, 11 g tartrato de amonio, 0.2 g KH_2PO_4 , 0.05 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 μg tiamina, y 0.1 mL de solución de elementos traza. La solución de elementos traza por litro contiene: 30 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 g NaCl, 5 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1 g CoSO_4 , 1 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.82 g CaCl_2 , 100 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 100 mg $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 mg H_3BO_3 y 1 g EDTA.
- b) **Medio de decoloración.** El medio de decoloración fue medio Kirk, suplementado con 1 g de glucosa y de 30 a 55 mg de colorante rojo ácido 27 (obtenido de Sigma Aldrich).
- c) **PDA**, cuya composición por litro fue: 200 g de infusión de papa, 20 g de dextrosa y 15 g de agar.
- d) **Agar nutritivo (NA)**, el cual contiene por litro: 5 g de pluripectona, 3 g de extracto de carne, 8 g de cloruro de sodio y 15 g de agar.

3.5. Ensayos cualitativos en placa

Para los ensayos en medio sólido se utilizaron cajas Petri (diámetro de 9 cm), donde se depositaban aproximadamente 20 mL de agar, obteniendo una profundidad del medio de aproximadamente 0.5 cm.

3.5.1. Evaluación del crecimiento de *T. versicolor* y *P. putida* en las condiciones establecidas

Se realizaron pruebas de crecimiento de *T. versicolor* y *P. putida* en cultivos individuales. Las pruebas se realizaron por triplicado en cajas Petri utilizando, para ambas especies, los siguientes medios de cultivo: medio Kirk suplementado con glucosa, agar nutritivo y agar papa dextrosa.

Las placas de los medios anteriores fueron inoculadas en la zona central con pellets de *T. versicolor*, obtenidos a partir de un inóculo estandarizado. El tiempo de incubación fue de

7-10 días, a una temperatura de 28 °C. *P. putida* se sembró por la técnica de estría en caja Petri. El tiempo de incubación fue de 2 días, a una temperatura de 28 °C.

3.5.2. Evaluación de la inhibición en cultivos mixtos de *T. versicolor* y *P. putida*

Se realizaron pruebas de crecimiento de *T. versicolor* y *P. putida* en cultivos mixtos para evaluar la inhibición que pudiera presentarse entre ambas especies. Las pruebas se realizaron por triplicado en cajas Petri utilizando como medio PDA.

Las placas fueron inoculadas en la zona central con un cuadrado (1 cm. de lado) de micelio de *T. versicolor*, obtenido de un cultivo previo de 10 días en PDA (28 °C).

A los tres días de crecimiento del hongo, se inoculó *P. putida* sembrándola por la técnica de estría en caja Petri.

El tiempo de incubación fue de 10 días, a una temperatura de 28 °C.

3.5.3. Evaluación de la decoloración en cultivos simples y mixtos de *T. versicolor* y *P. putida*

Se realizaron pruebas de crecimiento y decoloración de *T. versicolor* y *P. putida* en cultivos individuales y mixtos para evaluar si el colorante resulta tóxico para los organismos que se utilizaron. Las placas fueron inoculadas en la zona central con un cuadrado de micelio de 1 cm de lado de *T. versicolor*, obtenido de un cultivo previo de 10 días en PDA (28 °C).

La bacteria se sembró por estría, utilizando 100 µl de un cultivo líquido de un día, en AN.

Para los cultivos mixtos, la bacteria se inoculó a los tres días de crecimiento del hongo, colocando en 4 puntos distintos, 10 µL tomados de un cultivo líquido previo de 24 h, en AN. El tiempo de incubación fue de 10-14 días, a una temperatura de 28 °C.

3.5.4. Evaluación de la actividad lacasa en cultivos simples y mixtos de *T. versicolor* y *P. putida*

Se realizaron pruebas por triplicado en cajas Petri utilizando el medio Kirk y ABTS (2,2' azino-bis(ácido 3-etilbenzo-tiazolino-6-sulfónico)) a una concentración de 20 mg/L. el cual se utilizó para observar los halos de oxidación debido a la actividad de las enzimas extracelulares. Las placas fueron inoculadas en la zona central con pellets obtenidos a partir de un inóculo estandarizado de *T. versicolor*. Para los cultivos mixtos se utilizaron las mismas condiciones de incubación. *P. putida* se inoculó a los 5 días de crecimiento del hongo. Se inocularon 100 µL de un cultivo de 24 h de *P. putida*.

El tiempo de incubación fue de 7-10 días, a una temperatura de 28 °C. Se realizaron mediciones de los radios de crecimiento para determinar su velocidad radial, así como los halos de coloración formados por la actividad de la enzima lacasa.

La velocidad radial es la pendiente que se obtiene al realizar una regresión lineal, la cual se determina al graficar el crecimiento del halo de oxidación en cada tiempo de la medición

$$y = V_r * t + b \quad (3.7)$$

donde:

V_r es la velocidad radial del halo de oxidación (mm/d).

y es el radio del halo de oxidación (mm).

t es el tiempo al que se realiza la medición (d).

3.6. Ensayos para el establecimiento de los cultivos mixtos

Se realizaron las pruebas de decoloración utilizando una concentración de colorante de 30 mg/L y pellets obtenidos de un inóculo estandarizado de *T. versicolor*.

Los cultivos del hongo *T. versicolor* se crecieron en frascos de 200 mL, con 40 mL de medio Kirk suplementado con 10 g/L de glucosa. Se evaluó la decoloración utilizando pellets provenientes de un cultivo del hongo *T. versicolor* de 7 días. Estos pellets se

transfirieron a un frasco de 200 mL con 50 mL de medio de decoloración (1g/L glucosa; 30 mg/L colorante), para los cultivos mixtos se inocularon 500 µL de un cultivo de *P. putida*. Se realizaron pruebas de decoloración en tubos de ensayo. El volumen total del experimento fue de 4 mL. Se evaluó la decoloración a los 10 días y a los 14 días de cultivo. En la tabla 3.2 se muestran las combinaciones posibles y los experimentos que se seleccionaron. No se consideró evaluar la decoloración utilizando el sobrenadante del cultivo de *T. versicolor* porque en el modelo cinético se consideró que el hongo estaba en crecimiento, además se ha reportado una mayor eficiencia de decoloración cuando se utiliza la biomasa del hongo, que cuando se utiliza únicamente el sobrenadante (Thiruchelvam *et* Ramsay, 2007). Como controles positivos se seleccionó el cultivo del hongo y como control negativo (blanco) el medio de decoloración.

Tabla 3. 2. Combinaciones posibles para evaluar la decoloración en un cultivo mixto.

No. Experimento	<i>T. versicolor</i> 7 días de cultivo	Cultivo de 24 h de <i>P. putida</i>	Sobrenadante del cultivo bacteriano	Medio Kirk	Experimento seleccionado
1.	✓	X	X	X	✓
2.	X	✓	X	X	✓
3.	X	X	✓	X	✓
4.	X	X	X	✓	✓
5.	✓	✓	X	X	✓
6.	✓	X	✓	X	✓
7.	✓	X	X	✓	✓
8.	X	✓	X	✓	X
9.	X	X	✓	✓	X

Volumen final: 4 mL; Concentración colorante: 30 mg/L

Se seleccionaron los experimentos de decoloración que consideran a cada una de las especies individuales (hongo, bacteria, sobrenadante del cultivo bacteriano) y en cultivo mixto (hongo-bacteria). Además se evaluó la influencia del sobrenadante de un cultivo bacteriano de 24 h sobre la decoloración llevada a cabo por *T. versicolor*. Este experimento se seleccionó por la posibilidad de que el incremento de la decoloración se deba a un metabolito producido por *P. putida*.

3.7. Métodos analíticos

La biomasa se determinó por absorbancia en el caso de *P. putida* y por peso seco para *T. versicolor*. Previamente se realizaron curvas de calibración para el peso seco y la densidad óptica. Los cambios en el color se determinaron utilizando un espectrofotómetro UV/Visible para medir la absorbancia a 523 nm (rango leíble DO= 0.05-0.8). En todos los experimentos en medio líquido, el grado de decoloración se calculó de acuerdo a Sani *et al.* (1998), utilizando la siguiente fórmula:

$$\%D = \frac{A_{ini} - A_{obs}}{A_{ini}} * 100 \quad (3.8)$$

donde

- D es la Decoloración (%)
- A_{ini} es la absorbancia inicial
- A_{obs} es la absorbancia observada

CAPÍTULO 4.

Análisis y Discusión de Resultados

4.1. Análisis teórico del metabolismo de colorante azo rojo ácido 27

Recientemente, la química computacional ha permitido predecir procesos y reacciones químicas en diferentes campos, en este trabajo se utilizó la teoría de funcionales de la densidad (DFT) para evaluar los metabolitos generados durante el mecanismo de biodegradación del colorante tipo azo denominado rojo ácido 27 utilizando *T. versicolor*, propuesto por Gavril *et* Hodson, en el 2007 (Ver Figura 4.1).

Las propiedades estructurales, electrónicas y los espectros teóricos de IR para los intermediarios de la ruta de degradación del colorante, se describieron utilizando el programa Gaussian 03, con el funcional híbrido de intercambio y correlación B3LYP y la base 6-31G** para todos los átomos.

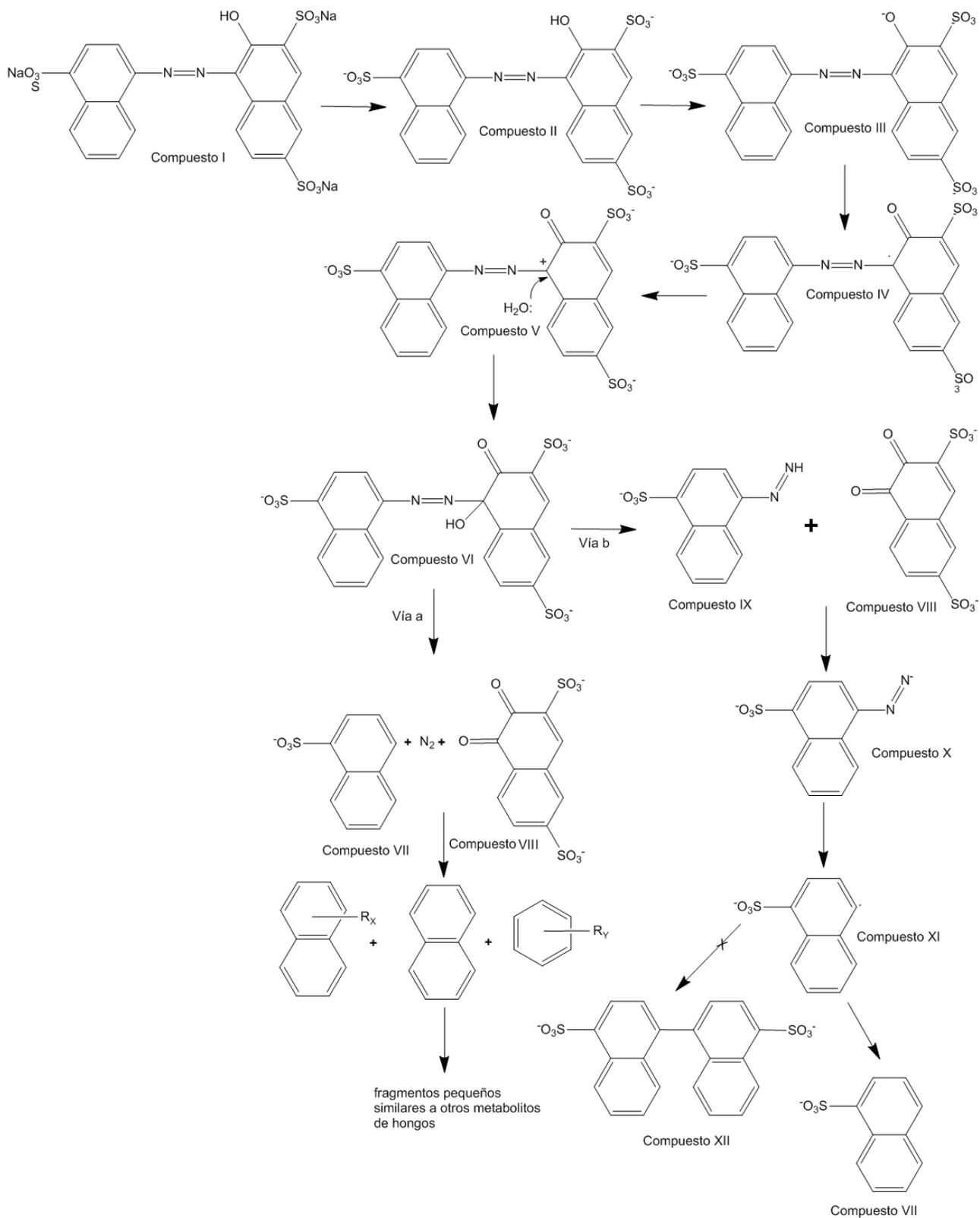


Figura 4.1. Mecanismo propuesto para la degradación del colorante amaranto por *T. versicolor*.

Las moléculas de los diferentes intermediarios en este mecanismo se optimizaron para calcular sus propiedades fisicoquímicas, así como su espectro teórico de IR. Los resultados se muestran en la figura 4.2.

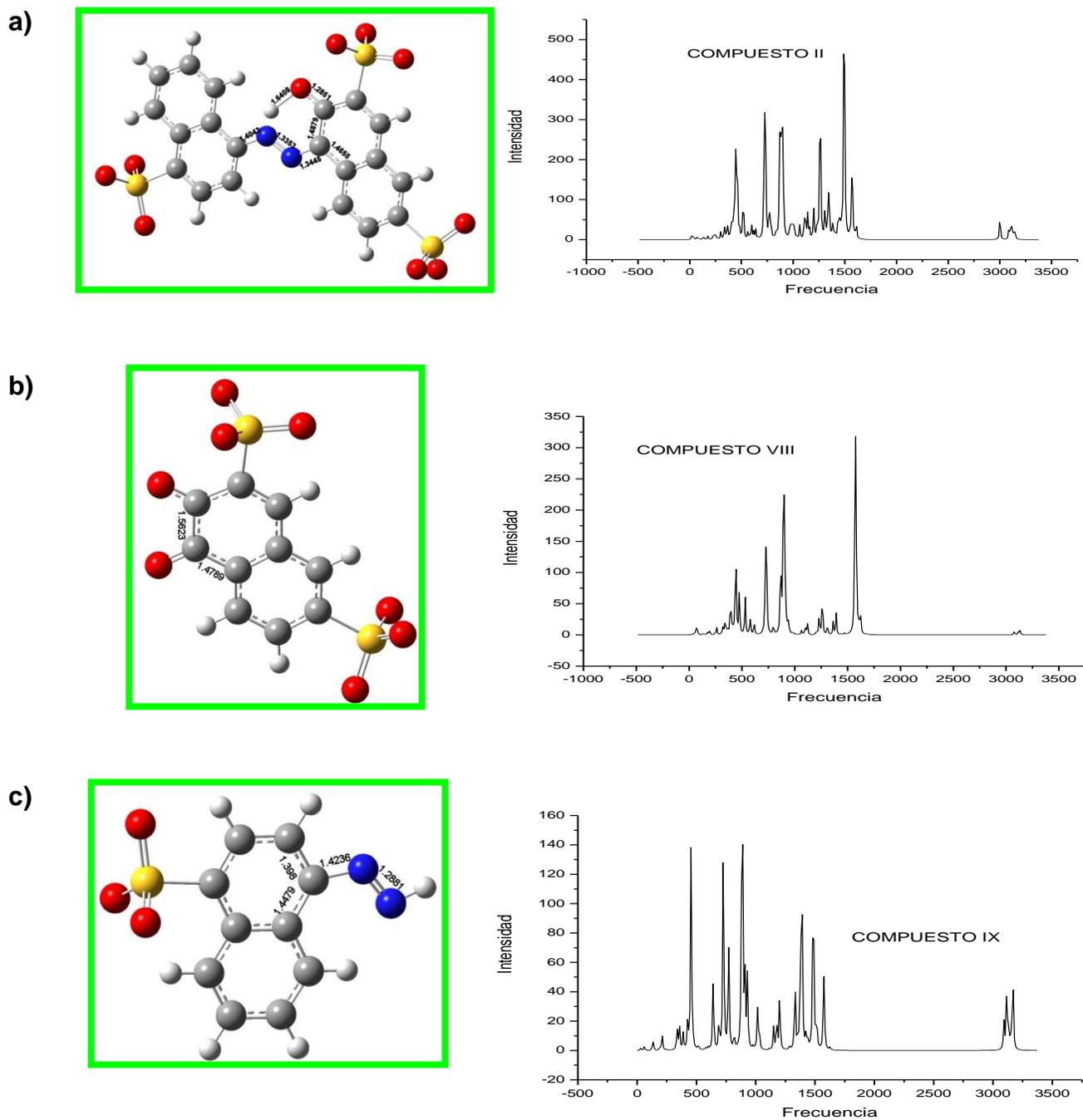


Figura 4.2. Análisis teórico de los diferentes intermediarios a) Compuesto II b) Compuesto VIII c) Compuesto IX.

Los espectros teóricos de IR se pueden utilizar para comparar con los espectros experimentales que se realicen posteriormente

4.2. Modelo metabólico de la degradación del colorante rojo ácido 27 a través de *T. versicolor* y *P. putida*

Para modelar el ingreso de un colorante azo en un cultivo mixto de *T. versicolor* y *P. putida*, y los efectos que ocasiona en el sistema, fue necesario establecer el modelo conceptual con los aspectos a considerar. El sistema propuesto está formado por:

- Una cepa de *T. versicolor*, la cual produce enzimas lignolíticas como la lacasa y la peroxidasa. Estas enzimas no son específicas y pueden ser usadas para degradar colorantes de tipo azo.
- Una cepa de *P. putida*, la cual puede inducir la producción de lacasa en *T. versicolor*, como un efecto del estrés en cultivos mixtos. Además, *P. putida* podría utilizar los compuestos aromáticos producidos durante la degradación del colorante (Ver Figura 4.1).

El objetivo del modelo matemático fue evaluar los efectos y la respuesta de los cultivos mixtos calculando el crecimiento y consumo de sustrato de ambas especies, a través del tiempo, así como la decoloración de un colorante.

En el medio de cultivo se consideraron dos compuestos que pueden ser utilizados como fuente de carbono (glucosa y colorante). Además los productos que se generen por la degradación del colorante también podrían servir como fuente de carbono para ambas especies.

En la figura 4.3 se muestra el modelo conceptual para la degradación del colorante rojo ácido 27 por un cultivo mixto (*T. versicolor* – *P. putida*).

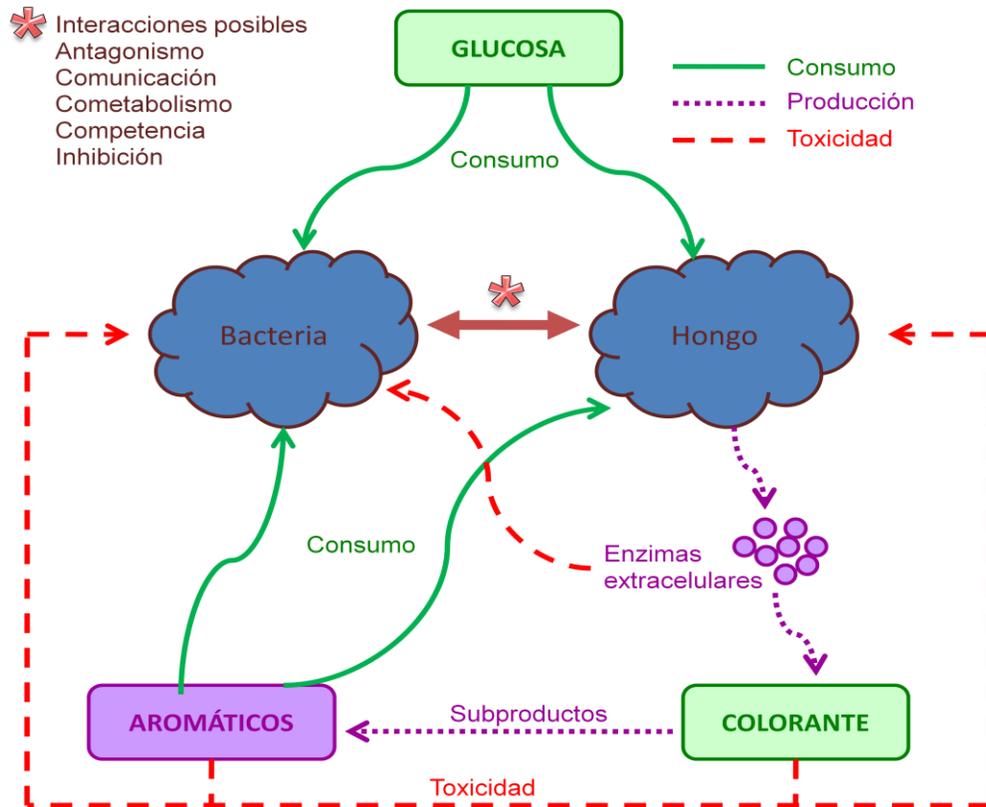


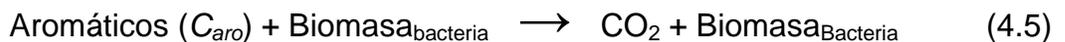
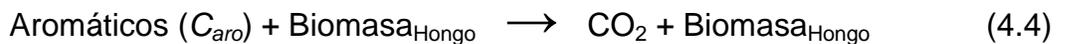
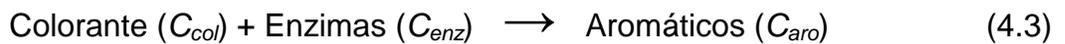
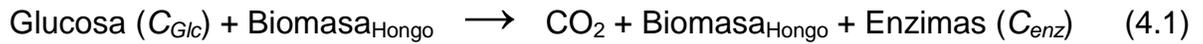
Figura 4.3 Modelo conceptual de la degradación del colorante utilizando un cultivo mixto.

T. versicolor tiene la capacidad de producir enzimas extracelulares, como la lacasa y la peroxidasa (Swamy *et al.*, 1999a; Swamy *et al.*, 1999b y Champagne *et al.*, 2005) necesarias para llevar a cabo la degradación del colorante. Estas enzimas extracelulares son un mecanismo que utiliza el hongo al colonizar un ambiente nuevo (Boddy, 2000; Folman *et al.*, 2008 y De Boeret *et al.*, 2010), por lo que se consideró la posibilidad de que estas enzimas inhiban el crecimiento de *P. putida*.

El colorante rojo ácido 27 fue la molécula que se eligió para la modelación. Se ha reportado que el hongo *T. versicolor* alcanza una mayor eficiencia de decoloración del colorante rojo ácido 27, al utilizar la biomasa del hongo, que al utilizar únicamente las enzimas presentes en el sobrenadante (Champagne *et al.*, 2005), por lo tanto en el modelo matemático se asumió que el proceso de decoloración se lleva a cabo durante el crecimiento del hongo.

Otro efecto considerado fue la toxicidad que pueda ejercer el colorante sobre las cepas, o la toxicidad por algún producto metabólico generado durante el proceso.

En base a los aspectos revisados en la literatura y a las posibles interacciones que se pueden presentar en el cultivo mixto (*T. versicolor* – *P. putida*), las reacciones a considerar fueron las siguientes:



4.3. Modelo cinético de la degradación del colorante rojo ácido 27, a través de *T. versicolor* y *P. putida*

4.3.1. Ecuaciones propuestas para las cinéticas de degradación del colorante azo

El mecanismo de biodegradación sigue un proceso cinético, el cuál puede ser modelado para simular el funcionamiento metabólico básico para cada especie, definiendo las ecuaciones que describan el crecimiento, mantenimiento, muerte y formación de producto.

El crecimiento celular puede describirse utilizando la ecuación de Monod. En el sistema propuesto (hongo-bacteria) podrían presentarse las siguientes interacciones:

1. Cometabolismo. Si *P. putida* consumiera preferentemente los metabolitos que produce *T. versicolor* en la degradación del colorante.
2. Competencia. Si *P. putida* y *T. versicolor* compiten por el mismo sustrato.
3. Inhibición. Si las enzimas o metabolitos producidos por *T. versicolor* inhiben el crecimiento de *P. putida*.

Está reportado que el colorante rojo ácido 27 no es tóxico para el hongo y que tampoco tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento (Ramsay *et* Nguyen, 2002). Los experimentos realizados posteriormente demostraron que el colorante tampoco inhibe el crecimiento de *P. putida*, lo cual permitió simplificar el modelo propuesto. La ecuación seleccionada para representar el crecimiento del hongo está dada por:

$$\mu_{hongo} = \frac{\mu_{\max hongo} C_{Glc}}{k_{sglc} + C_{Glc}} \quad (4.6)$$

donde:

μ_{hongo} es el término de crecimiento de Monod para *T. versicolor* (d^{-1})

$\mu_{\max hongo}$ es la velocidad máxima de crecimiento para *T. versicolor* (d^{-1})

C_{Glc} es la concentración de glucosa ($g_{Glc} L^{-1}$)

K_{sglc} es la constante de saturación de glucosa ($g_{Glc} L^{-1}$).

En el caso de *P. putida* se utilizó una ecuación de Monod para describir su crecimiento en glucosa y en presencia de compuestos aromáticos (Ecuación 4.7).

$$\mu_{bacteria} = \frac{\mu_{\max Bacteria} C_{Glc}}{k_{sPglc} + C_{Glc}} + \frac{\mu_{\max bacteriaaro} C_{aro}}{k_{saro} + C_{aro}} \quad (4.7)$$

donde

$\mu_{bacteria}$ es el término de crecimiento de Monod para *P. putida* (d^{-1})

$\mu_{\max bacteria}$ es la velocidad máxima de crecimiento para *P. putida* en glucosa (d^{-1})

C_{Glc} es la concentración de glucosa ($g_{Glc} L^{-1}$)

K_{sPglc} es la constante de saturación de glucosa para *P. putida* ($g_{Glc} L^{-1}$).

$\mu_{\max bacteriaaro}$ es la velocidad máxima de crecimiento para *P. putida* a partir de aromáticos (d^{-1})

C_{aro} es la concentración de aromáticos ($g_{aro} L^{-1}$)

K_{saro} es la constante de saturación de aromáticos ($g_{aro} L^{-1}$).

El consumo de glucosa se expresa en la siguiente ecuación (Ecuación 4.8):

$$-r_{Glc} = -\frac{dGlc}{dt} = \left[\frac{\mu_{honggo} X_H}{Y_{T-Glc}} + k_{mT} + \left(\frac{X_H K_{dec}}{Y_{enz.Glc}} \right) \right] + \left[\frac{X_B \mu_{bacteria}}{Y_{P-Glc}} + k_{mP} \right] \quad (4.8)$$

donde:

- r_{Glc} es la tasa de consumo de glucosa ($g_{glc} L^{-1} d^{-1}$)
- μ_{honggo} es el término de crecimiento de Monod para *T. versicolor* (d^{-1}).
- X_H es la biomasa inicial de *T. versicolor* ($g_T L^{-1}$).
- Y_{T-Glc} es el rendimiento de biomasa (*T. versicolor*) a partir de glucosa ($g_T g_{glc}^{-1}$)
- k_{mT} es el coeficiente de mantenimiento de *T. versicolor* a partir de glucosa
- X_B es la concentración de biomasa de *P. putida* ($g_P L^{-1}$)
- k_{dec} es la constante de decoloración del colorante rojo ácido 27 por la enzima ($U_{enzima} g_T^{-1} día^{-1}$)
- $Y_{enz-Glc}$ es el rendimiento de enzima (lacasa) a partir de glucosa ($U_{enzima} g_{glc}^{-1}$)
- $\mu_{bacteria}$ es el término de crecimiento de Monod para *P. putida* (d^{-1})
- Y_{P-Glc} es el rendimiento de biomasa (*P. putida*) a partir de glucosa ($g_P g_{glc}^{-1}$)

T. versicolor excreta enzimas extracelulares como una respuesta de las limitaciones de nutrientes en el medio y del estrés ocasionado por la presencia de otros microorganismos. Una molécula del colorante es degradada por las enzimas extracelulares o por la biomasa. Está reportado que la degradación del colorante rojo ácido 27 no está asociado a la absorción por la biomasa, por lo que no se considerará un término para la absorción del colorante por la biomasa (Ramsay et Nguyen, 2002). El proceso puede representarse con la ecuación (9):

$$r_{enz} = \frac{d_{enz}}{dt} = k_{enz} X_0 e^{\mu_{honggo} t} - k_d C_{enz} \quad (4.9)$$

donde:

- r_{enz} es la tasa de degradación de la enzima ($U_{enzima} L^{-1} d^{-1}$)
- k_{enz} es la constante de producción de la enzima ($U_{enzima} g_T^{-1} día^{-1}$)
- X_0 es la biomasa inicial de *T. versicolor* ($g_T L^{-1}$)
- μ_{honggo} es el término de crecimiento de Monod para *T. versicolor* (d^{-1}).

t es el tiempo
 k_d es la constante de decaimiento de la enzima (d^{-1})
 C_{enz} es la concentración de las enzimas extracelulares ($U_{enzima} L^{-1}$)

Para calcular la tasa de remoción del colorante (r_{col}) por la degradación de las enzimas extracelulares se utilizó la siguiente ecuación:

$$-r_{col} = \frac{dcol}{dt} = k_{dec} C_{col} \quad (4.10)$$

donde:

r_{col} es la tasa de degradación del colorante ($g_{col} L^{-1} d^{-1}$)
 k_{dec} es la constante de degradación del colorante ($día^{-1}$)
 C_{col} es la concentración del colorante ($g_{col} L^{-1}$)

La concentración de compuestos aromáticos en el sistema está en función de la degradación del colorante (Ecuación 4.10) y el consumo de aromáticos por *P. putida* y se expresa en la siguiente ecuación:

$$r_{aro} = \frac{daro}{dt} = ak_{dec} C_{col} - \left[\frac{X_{bacteria} a \mu_{bacteria}}{Y_{P-aro}} + k_{maroP} \right] \quad (4.11)$$

donde

r_{aro} es la tasa de consumo de compuestos aromáticos
 a es el coeficiente estequiométrico de aromáticos a partir del colorante ($g_{aro} g_{col}^{-1}$)
 k_{dec} es la constante de degradación del colorante ($día^{-1}$)
 C_{col} es la concentración del colorante ($g_{col} L^{-1}$)
 $X_{bacteria}$ es la concentración de biomasa de *P. putida* ($g_P L^{-1}$)
 $\mu_{bacteria}$ es el término de crecimiento de Monod para *P. putida* (d^{-1})
 Y_{P-aro} es el rendimiento de *P. putida* consumiendo aromáticos ($g_P g_{aro}^{-1}$)
 k_{maroP} es el coeficiente de mantenimiento de *P. putida* a partir de aromáticos

4.3.2. Parámetros del modelo matemático

Los parámetros cinéticos incluidos en el modelo matemático se definieron en base a lo reportado en la literatura. Algunos de los valores se consideraron como la mejor estimación para poder obtener una solución estable del modelo matemático. En la Tabla 3.1 (Metodología) se muestran las condiciones iniciales y los parámetros que se utilizaron para resolver el modelo matemático.

4.3.3. Resolución del modelo matemático

El sistema de ecuaciones diferenciales generado se pudo resolver mediante métodos numéricos. Para este modelo se seleccionó el método de integración Runge Kutta de cuarto orden, para resolver el sistema y simular el comportamiento cinético de un cultivo mixto de *T. versicolor* y *P. putida* en presencia de glucosa y el colorante rojo ácido 27.

4.4. Análisis de la simulación de la degradación del colorante rojo ácido 27 a través de *T. versicolor* y *P. putida*

Para la resolución del modelo matemático se consideraron los parámetros reportados en la literatura para cultivos individuales de *T. versicolor* y *P. putida*, así como las condiciones en las que se llevó a cabo el sistema. Con los parámetros utilizados, el modelo permitió la simulación de los cultivos mixtos. El modelo se mantuvo estable hasta el día 5, cuando la glucosa se termina en el medio. Este tiempo fue suficiente para modelar el comportamiento del sistema, ya que corresponde al reportado con otros autores (Tavares *et al.*, 2006).

4.4.1. Simulación de las condiciones de crecimiento de *T. versicolor* y *P. putida*

En la Figura 4.4 se muestra el crecimiento de *T. versicolor* y *P. putida* en un cultivo mixto, a diferentes concentraciones de glucosa. Como puede observarse, *P. putida* crece más rápido que *T. versicolor* y para que ambos organismos puedan crecer es necesario que la glucosa este en altas concentraciones.

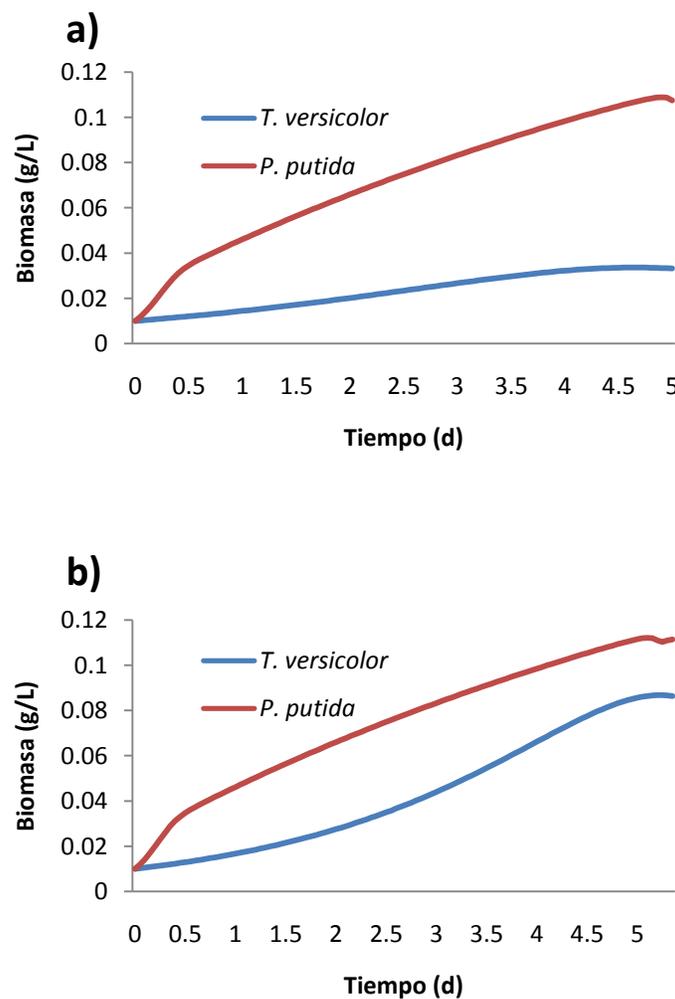


Figura 4.4. Crecimiento de *T. versicolor* y *P. putida* en un cultivo mixto a) Crecimiento con 5 g/L de glucosa b) Crecimiento con 10 g/L de glucosa.

Con el fin de obtener la biomasa de *T. versicolor* suficiente para llevar a cabo los experimentos de decoloración se decidió dejar crecer primero el hongo e inocular a *P. putida* en el día dos de crecimiento del hongo, tal como se observa en la Figura 4.5.

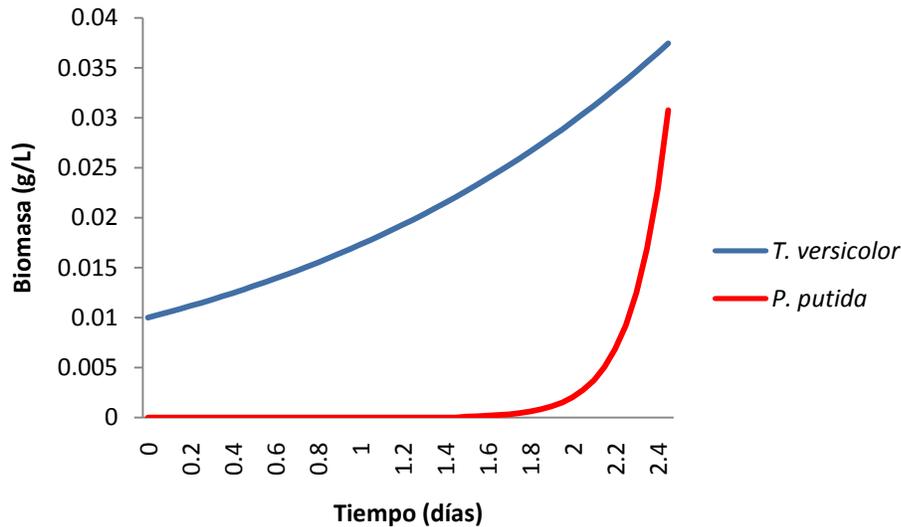


Figura 4.5. Crecimiento del sistema *T. versicolor*-*P. putida*. El cultivo mixto se inicia durante el 2° día de crecimiento del hongo.

En el modelo matemático no se incluyó un término por la inhibición de una especie hacia la otra, ya que no hay reportes de este fenómeno, aunque si hay estudios donde utilizan cultivos mixtos para inducir la producción de lacasa en *T. versicolor*, ya que la producción de enzimas extracelulares es un mecanismo natural que utiliza el hongo al colonizar un suelo (Baldrian 2004). Aunque si se observó el crecimiento en ambas especies, el rendimiento de biomasa que se obtuvo fue muy bajo, en comparación con los datos reportados. En el caso de la simulación para *P. putida* se consideró, la utilización como sustrato, de los compuestos aromáticos generados durante la degradación del colorante. Durante la simulación únicamente se observó la acumulación de compuestos aromáticos en el cultivo simple de *T. versicolor* (Ver Figura 4.5). *P. putida* puede crecer utilizando compuestos aromáticos como benceno, fenol, tolueno, naftaleno, entre otros (Choi *et al.*,

2008 y Reardon *et al.*, 2012). A partir del día 2, cuando se inicia el cultivo mixto con *P. putida* se observa el consumo de compuestos aromáticos.

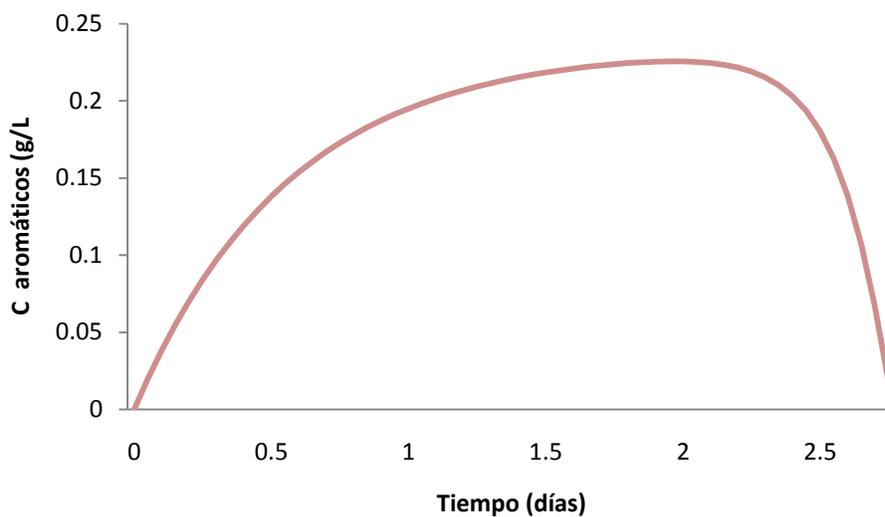


Figura 4.6. Cinética de producción-consumo de compuestos aromáticos.

4.4.2. Simulación de la degradación del colorante rojo ácido 27 por *T. versicolor* y *P. putida*

La figura 4.7 muestra la cinética de producción-decaimiento de la enzima lacasa. La cinética de producción de enzima se ajusta a lo reportado matemática y experimentalmente por Tavares *et al.*, en el 2006.

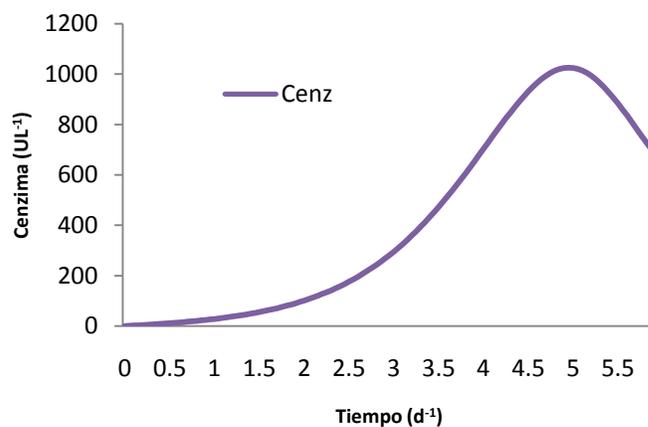


Figura 4.7. Cinética de producción de la enzima lacasa.

T. versicolor puede producir enzimas extracelulares que participan en la degradación de moléculas orgánicas como los colorantes textiles. Durante la decoloración del rojo ácido 27 se ha demostrado la presencia de las enzimas manganeso peroxidasa y lacasa. En las condiciones analizadas no se detectó la producción de la enzima lignina peroxidasa (Swamy *et al.*, 1999b; Champagne *et al.*, 2005). En la figura 4.8 se muestra la degradación del colorante rojo ácido 27 por la enzima lacasa. Se consideró esta enzima, ya que en la literatura están reportados los parámetros cinéticos de la producción de esta enzima por *T. versicolor* (Tavares *et al.*, 2006 y Thiruchelvam *et al.*, 2007).

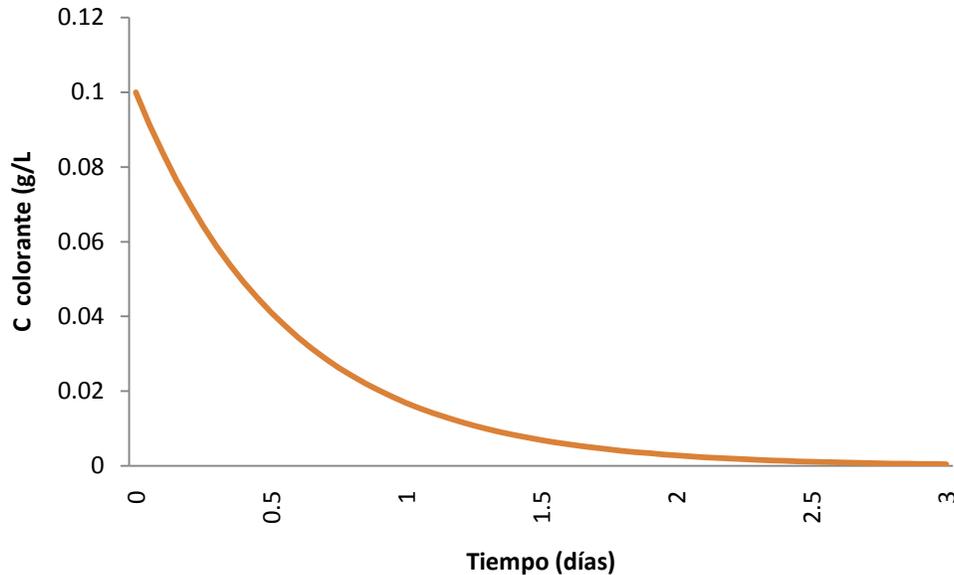


Figura 4.8. Degradación del colorante rojo ácido 27.

Para el proceso de decoloración se consideró una cinética de degradación de primer orden de acuerdo a lo reportado por Ramsay *et al.*, en el 2006.

Durante la simulación únicamente se consideró una de las enzimas extracelulares que produce *T. versicolor*. El modelo puede corregirse y contemplar la acción de las dos enzimas involucradas en la decoloración del rojo ácido 27: la lacasa y la manganoso peroxidasa. También se podría evaluar la absorción del colorante por la biomasa de *P. putida*.

4.5. Identificación de las condiciones experimentales de cultivo para *T. versicolor* y *P. putida*

Un problema que puede presentarse al trabajar con cultivos mixtos, es que las diferentes especies tienen requerimientos nutricionales específicos y condiciones de crecimiento diferentes. Por ejemplo, las temperaturas óptimas de crecimiento para *T. versicolor* es de 26 °C y para *P. putida* es de 30°C, por lo que se decidió realizar los experimentos a 28 °C. Para el crecimiento de las especies individuales en medio sólido se utilizó PDA para *T. versicolor* y agar nutritivo para *P. putida*. Durante los cultivos mixtos fue necesario contar

con medios diferenciales para determinar algunos parámetros de las especies individuales, tales como la biomasa o la producción de alguna enzima. Tanto el *T. versicolor* como *P. putida* pueden crecer en PDA, pero el tiempo de crecimiento, de 7 días y 1 día respectivamente, permiten hacer algunas cuantificaciones. Para el caso de *T. versicolor* se utilizó PDA acidificado con ácido tartárico al 10%. Bajo estas condiciones, las bacterias son incapaces de crecer, mientras que *T. versicolor* presenta un crecimiento normal.

4.6. Evaluación de la inhibición para el sistema propuesto

Debido a la posibilidad de que las especies se inhiban o a que durante la degradación, los productos metabólicos resulten tóxicos para una o ambos tipos de microorganismos, se realizaron cultivos en caja a una temperatura de 28°C. Para evaluar la inhibición se sembraron los hongos por impronta en una caja con PDA. A los 3 días de crecimiento, se sembraron las bacterias por estrías. En la figura 4.9 se observa el crecimiento de ambos microorganismos.

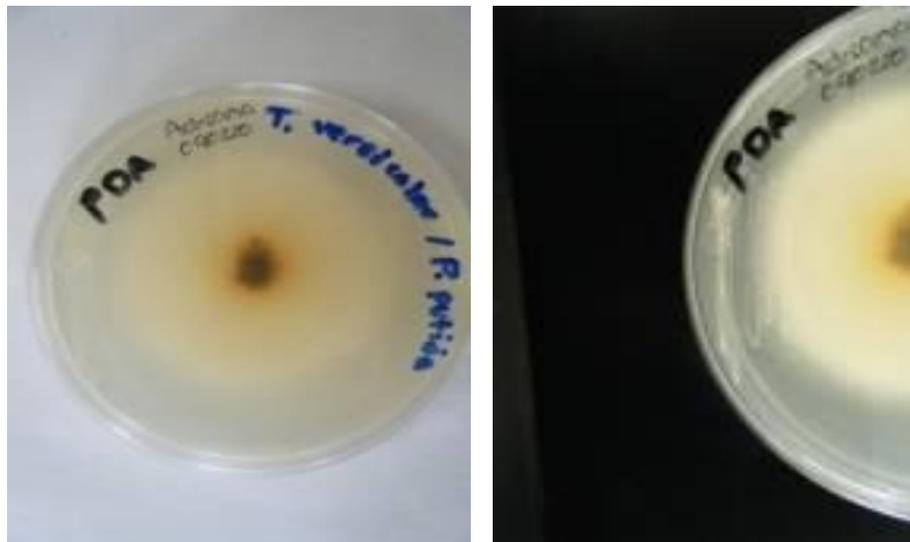


Figura 4.9. Crecimiento de *T. versicolor* y *P. putida* en PDA.

Como puede observarse los dos tipos de organismos pueden coexistir, sin que haya la formación de un halo de inhibición. *T. versicolor* continúa creciendo sobre las bacterias, por lo que podría haber una competencia por el espacio.

4.7. Degradación del colorante rojo ácido 27

Se evaluó la capacidad de *T. versicolor* y *P. putida* para degradar el colorante rojo ácido 27. Se utilizaron cultivos en caja Petri con PDA y una concentración de 30 mg/L de colorante. En la Figura 4.10 se muestra la decoloración a los días 3, 5 y 7 para la cepa de *T. versicolor*.

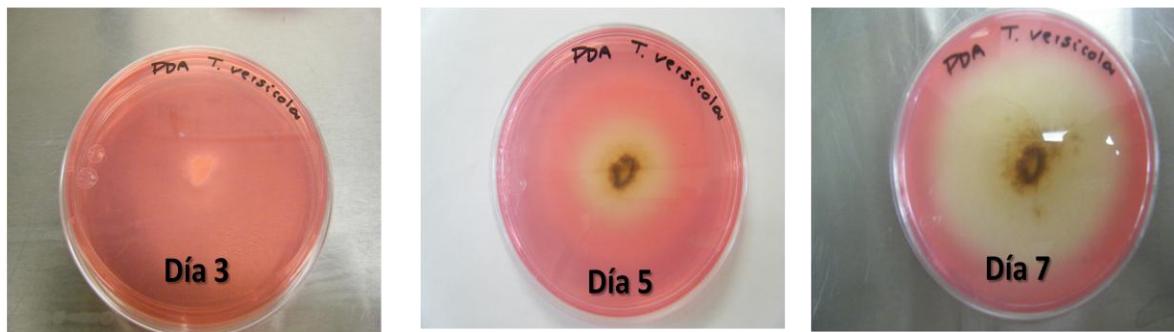


Figura 4.10. Decoloración del colorante rojo ácido 27 a través de *T. versicolor*.

En la Figura 4.11 se muestra la degradación del colorante por *T. versicolor* en diferentes medios de cultivo. En una caja con PDA y colorante, la cepa de *T. versicolor* degrada totalmente el colorante en un tiempo aproximado de 10 días. También se hicieron pruebas en cajas con medio Kirk modificado con y sin glucosa (30 mg/L de colorante), El hongo tiene la capacidad de degradar el colorante, pero no puede utilizarlo como fuente de carbono, ya que en ausencia de glucosa el hongo es incapaz de crecer. Se puede observar que la decoloración está asociada al crecimiento y la cantidad de biomasa alcanzada, ya que en un medio mineral (Medio Kirk suplementado con glucosa) la decoloración se lleva a cabo más lentamente, debido a que el crecimiento es menor. En el caso del medio Kirk sin suplementar, no hay crecimiento del hongo y por lo tanto, no hay decoloración.

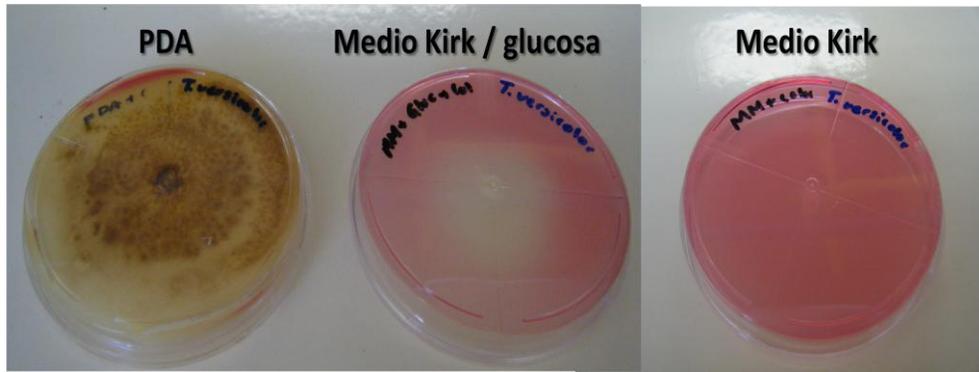


Figura 4.11. Degradación del colorante rojo ácido 27 a través de *T. versicolor* en diferentes medios (10 días de cultivo).

En el caso de *P. putida* se evaluó la capacidad de decoloración en cajas con PDA y agar nutritivo, con la misma concentración del colorante que en los experimentos anteriores (30 mg/L). Como puede observarse en la Figura 4.12 no hubo decoloración, aunque si hay crecimiento, lo que indica que el colorante no inhibe el crecimiento.

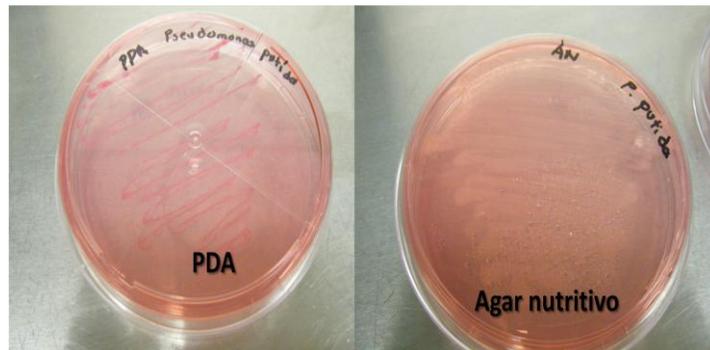


Figura 4.12. Crecimiento de *P. putida* en diferentes medios con colorante (2 días de cultivo).

En los cultivos de *P. putida* en PDA con colorante, se observa que la biomasa adquiere una tonalidad rojiza, lo que pudiera indicar que el colorante puede ser absorbido por la biomasa. Este efecto no se observa en las cajas con agar nutritivo, por lo que pudiera ser un fenómeno que se presenta cuando el medio de cultivo no es favorable.

Tanto *P. putida* como *T. versicolor* pueden crecer en presencia del colorante, lo que indica que el colorante no es tóxico para ninguna de las dos especies.

Con los datos experimentales obtenidos, el modelo conceptual puede simplificarse tal como se muestra en la Figura 4.13

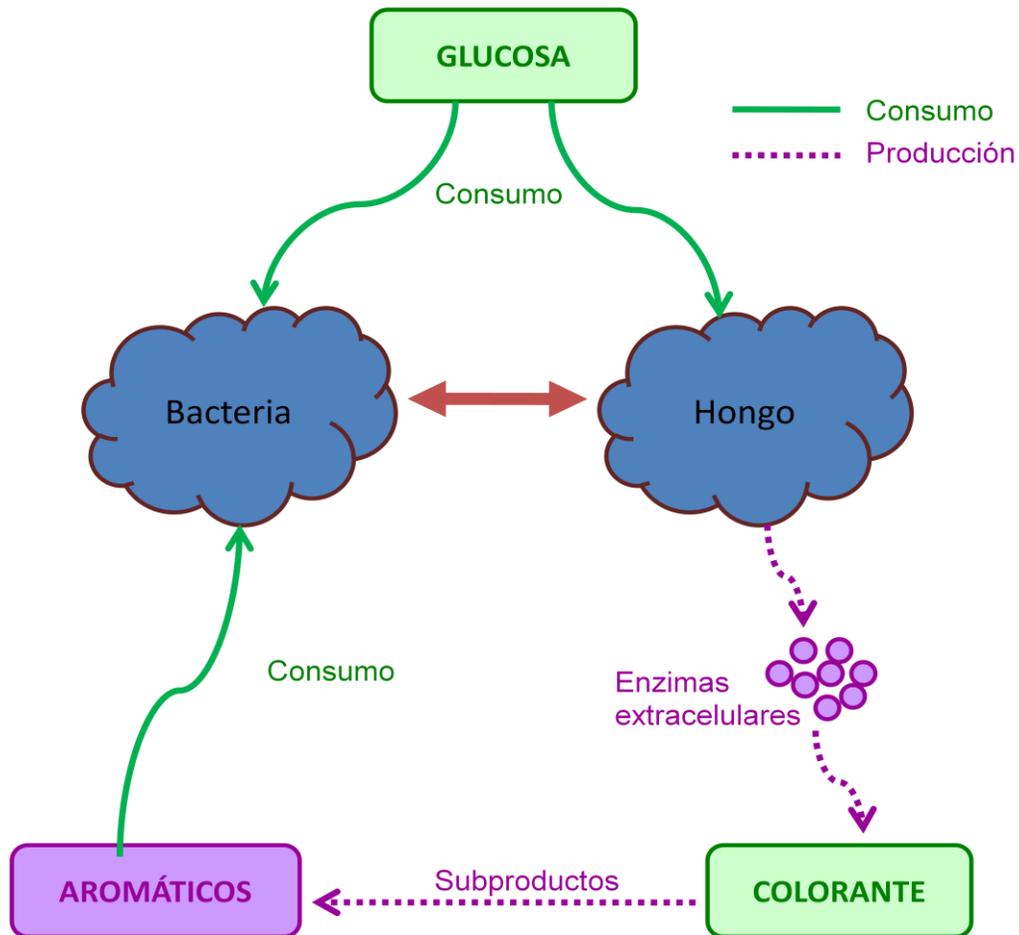


Figura 4.13. Modelo conceptual de la degradación del colorante utilizando un cultivo mixto.

El modelo considera que ambos organismos pueden consumir glucosa. El consumo de aromáticos sólo se considera para *P. putida*. No se presenta inhibición entre los dos organismos. *T. versicolor* produce enzimas extracelulares que logran la decoloración del colorante rojo ácido 27. La producción de las enzimas está en función del crecimiento de *T. versicolor*.

4.8. Pruebas preliminares de la decoloración en cultivos mixtos

Se evaluó el efecto sobre la decoloración en un cultivo mixto de *T. versicolor* y *P. putida*. Para ello se inoculó *T. versicolor* en una placa de medio Kirk con colorante (30 mg/l). Después de 5 días de crecimiento, se sembró *P. putida* alrededor del micelio. Como se puede ver en la Figura 4.14, en la placa donde se sembraron ambos organismos, la decoloración inicia en la zona de contacto entre las especies.

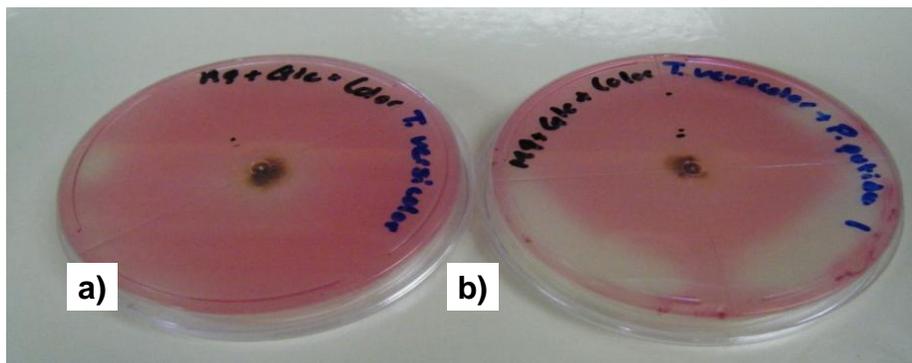


Figura 4.14. Degradación del colorante rojo ácido en un cultivo de a) *T. versicolor* y b) un cultivo mixto de *T. versicolor* y *P. putida*.

En las pruebas de decoloración en caja Petri, usando un cultivo mixto de *T. versicolor* y *P. putida*, la decoloración de la placa inicia a las 24 h de haber inoculado las bacterias. La decoloración a los 5 días de haber iniciado el cultivo (10 días de crecimiento de *T. versicolor*) es más evidente en la caja con el cultivo mixto que en un cultivo sencillo. La caja con el cultivo mixto alcanza la decoloración a los 7 días de haber iniciado el cultivo mixto (12 días de cultivo de *T. versicolor*), mientras que en la caja con el cultivo de *T. versicolor* la decoloración se alcanza 5 días después. El incremento en la decoloración puede deberse al incremento en la actividad de las enzimas extracelulares responsables de la degradación del colorante (lacasa, Li-peroxidasa, Mn-peroxidasa). Baldrian (2004) describe el efecto de las interacciones entre *T. versicolor* y otros microorganismos sobre la actividad de la lacasa. La actividad de esta enzima se incrementó al adicionar otras especies de hongos (*Trichoderma harzianum*, *Acremonium sphaerospermum*, *Fusarium reticulatum* y *Penicillium rugulosum*), bacterias (*Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*) y suelo

no esterilizado. Los cultivos mixtos se establecieron a partir de un cultivo líquido de 10 ó 14 días de *T. Versicolor* y 500 µL de un cultivo microbiano de 24 h. En el estudio de Baldrian (2004) se concluye que solamente la actividad de la lacasa cambia después del contacto de *T. versicolor* con otros microorganismos. Ya que la lacasa participa en la degradación del colorante rojo ácido 27, la interacción de *T. versicolor* con *P. putida* afecta la biodegradación. La inducción de la lacasa es una respuesta típica de *T. versicolor* ante interacciones interespecíficas.

Con el objetivo de estandarizar las condiciones de los cultivos en placa se utilizaron pellets (1 cm de diámetro) de *T. versicolor*. Se evaluó la producción de la enzima lacasa en placas con medio Kirk suplementado con glucosa (10g/L) y ABTS (30 mg/L). El ABTS es uno de los mediadores de la lacasa más estudiado. Un mediador es un compuesto de bajo peso molecular que puede incrementar el número de sustratos de una enzima (Collins *et al.*, 1998). Potthast *et al.*, en 1996, explican que el ABTS transfiere un electrón a la enzima para activarla, actuando más como un co-oxidante. Debe de haber un mecanismo para su reciclamiento, regresando a su forma reducida y quedando disponible para un nuevo ciclo catalítico. El ABTS también se utiliza para medir la actividad enzimática de la lacasa.

En la Figura 4.15, se muestra una placa inoculada con un pellet de *T. versicolor* con 7 días de crecimiento. Los halos de oxidación son los halos de coloración que se forman cuando la lacasa reacciona con el ABTS y éste es oxidado. La coloración del ABTS está relacionada con la actividad de las enzimas producidas por el hongo, por lo que este experimento permitió detectar la actividad enzimática de lacasa en las condiciones de trabajo.

Como puede observarse en la Figura 4.15 (c y d) en el sobrenadante del cultivo donde se obtuvo el pellet (obtenido de un cultivo de 7 días a 28 °C), también hay actividad enzimática, aunque su halo de oxidación tiene menor tamaño e intensidad que la obtenida en las cajas inoculadas directamente con *T. versicolor* (a y b).

En caso de que las condiciones no sean adecuadas para el establecimiento de los cultivos mixtos, se podría evaluar la decoloración usando el sobrenadante de un cultivo de *T. versicolor*, debido a que la enzima se libera al medio de cultivo, y que en éste se observa actividad enzimática.

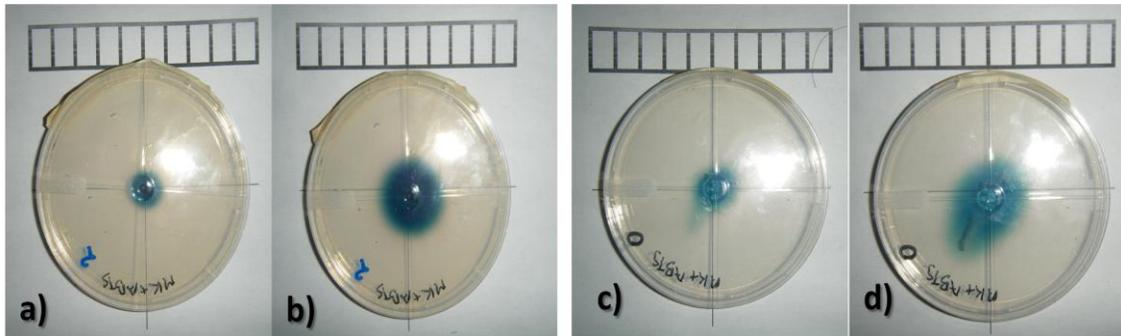


Figura 4.15. Halos de oxidación del ABTS a) Pellet de *T. versicolor* (12 h); b) Pellet de *T. versicolor* (48 h); c) Sobrenadante (12 h) y d) Sobrenadante(24 h)

En la Figura 4.16 se muestra el incremento del diámetro del halo de oxidación que se forma. La gráfica se obtuvo a partir de las mediciones del halo de oxidación de cinco cajas inoculadas con un pellet de *T. versicolor* (1 cm de diámetro, 7 días de cultivo a 28 °C).

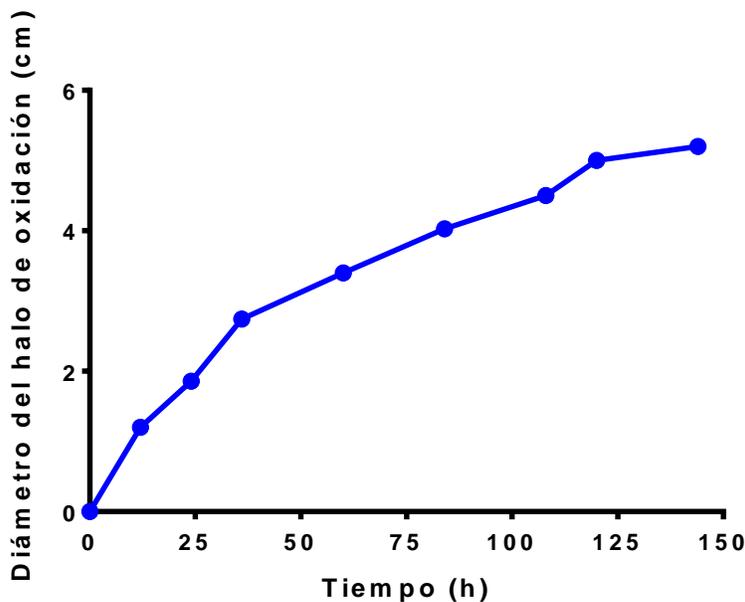


Figura 4.16. Halo de oxidación con respecto al tiempo en cajas de medio Kirk y ABTS, inoculadas con un pellet de *T. versicolor*.

Con esta gráfica se obtuvo la velocidad radial, la cual es la pendiente que se obtiene al realizar una regresión lineal. La velocidad de oxidación que se obtuvo fue de 0.02692 cm/h \pm 0.002418, la cual es similar a la reportada por Solís *et al.*, en el 2005 (0.02336 cm/h \pm 0.002044).

Estas mismas cajas se utilizaron para evaluar el efecto en la actividad enzimática de la lacasa durante los cultivos mixtos. Para ello se inocularon cajas de 5 días de crecimiento, con 20 μ L de un cultivo de *P. putida*. Se observó la desaparición del color verde-azulado correspondiente a la oxidación del ABTS. A las 24 horas se observa la aparición de un color rojizo. Este color puede deberse a la oxidación del ABTS monocatión, lo que da como resultado la especie dicatiónica que está reportada que presenta una coloración rojiza. La oxidación del ABTS monocatión podría deberse a los metabolitos producidos por la bacteria o bien, a algún componente del medio de cultivo. Para tratar de verificar esto, se inocularon 20 μ L del cultivo bacteriano en un lado de la caja y del otro lado, se colocaron 20 μ L del medio de cultivo (caldo soya tripticasa). Se observó inicialmente la formación de un color azul-violeta y la posterior desaparición del color verde en toda la caja (Figura 4.17).

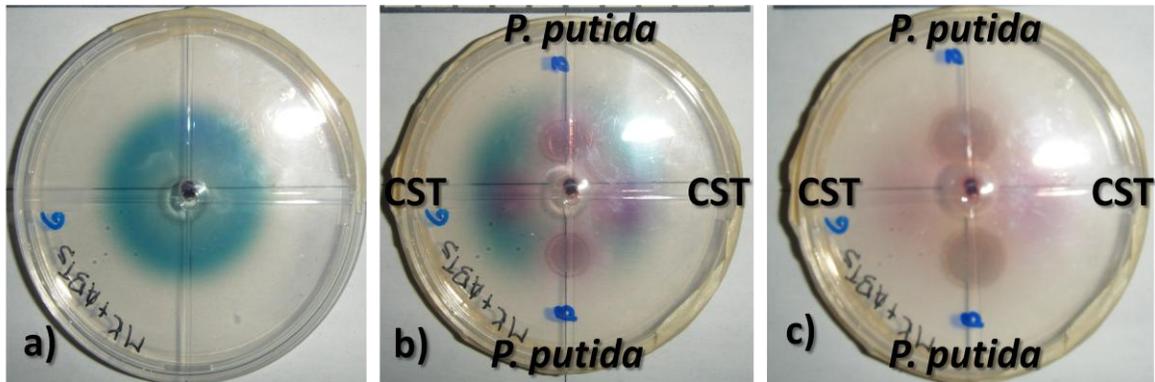


Figura 4.17. Cambios de coloración en el halo de oxidación del ABTS a) Pellet de *T. versicolor*, 5 días; b) Pellet de *T. versicolor* /cultivo de *P. putida*/Caldo soya tripticasa (12 hrs); b) Pellet de *T. versicolor* /cultivo de *P. putida*/Caldo soya tripticasa (24 hrs)

La lacasa es una de las enzimas de los hongos PB, involucradas en la degradación de la lignina. El rango de sustratos que puede utilizar se puede extender en presencia de un compuesto cooxidante como el ABTS. De acuerdo al trabajo de Collins *et al.*, en 1998, el ABTS oxidado puede ser reducido a ABTS por algunos ácidos orgánicos como el oxalato, el glioxilato y el malonato (Ver Figura 4.18). Estos ácidos orgánicos pueden ser producidos por *P. putida* durante su metabolismo.

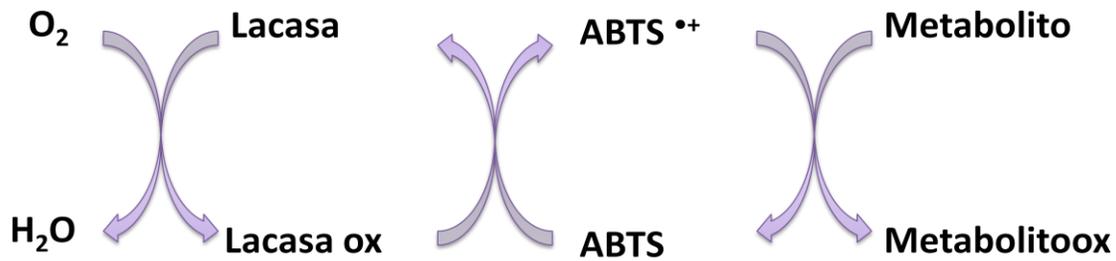


Figura 4.18. Mecanismo de acción del sistema lacasa-mediador.

Para determinar si estos cambios en el color de los halos de oxidación, los cuales indican un cambio en la actividad enzimática, tenían un efecto sobre la decoloración se realizaron cultivos en medio sólido en placas con medio Kirk, glucosa (10 g/L) y colorante (30 mg/L). El ABTS actúa como mediador, lo que también podría incrementar la decoloración. Como puede observarse en la Figura 4.19, la decoloración se lleva a cabo más rápidamente en la placa que contiene el cultivo mixto de *T. versicolor* y *P. putida*. En la caja con el cultivo mixto, a los 14 días se observa una decoloración de la caja, mientras que en el cultivo simple de *T. versicolor* aún está presente el color. Al igual que en las placas inoculadas con micelio, la decoloración inicia en la zona donde se inocula la bacteria.

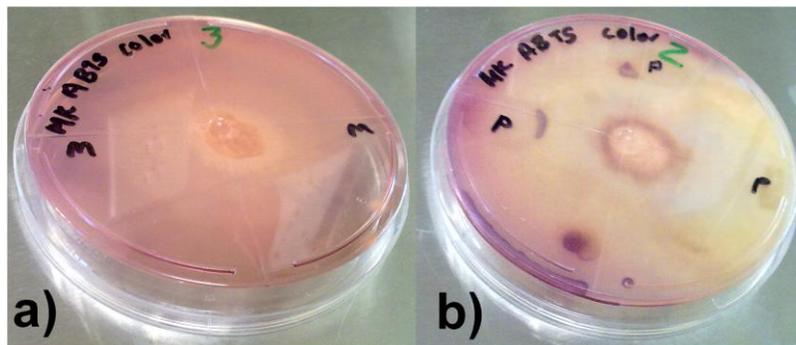


Figura 4.19. Decoloración en medio sólido, 14 días de cultivo a) Pellet de *T. versicolor*; b) Pellet de *T. versicolor* /cultivo de *P. putida* (24 hrs)

De manera natural, los hongos PB interactúan con un gran número de microorganismos y compiten con ellos por los recursos y el espacio. Se ha observado que la enzima lacasa se produce durante estas interacciones interespecíficas (White et Boddy, 1992) y que la enzima se localiza en las zonas de interacción (Iakovlev et Stenlid, 2000), lo cual explica

que la decoloración empiece en la zona de contacto entre *T. Versicolor* y *P. putida*, ya que en esta zona es donde se produciría la enzima, como respuesta.

4.9. Decoloración en cultivos líquidos

En todos los experimentos en medio líquido, el grado de decoloración se calculó en base a la absorbancia medida (Saniet *al.*, 1998).

Se realizaron pruebas en medio líquido para evaluar la decoloración en cultivos mixtos de *T. versicolor* y *P. putida*. Se utilizó un inóculo estandarizado tomado a partir de un cultivo en medio sólido en agar PDA de 7 días de crecimiento. Se inocularon 5 mL en 50 mL de medio Kirk suplementado con 10 g/L de glucosa y tartrato de amonio (10 g/L) como fuente de nitrógeno. Los pellets de *T. versicolor*, formados a los 7 días de incubación en medio líquido, se utilizaron para evaluar la desaparición de color. El medio de decoloración consistió en medio Kirk modificado con 1 g/L de glucosa y 30 mg/L de colorante (rojo ácido 27). En la Figura 4.20 se observa la decoloración llevada a cabo por los pellets de *T. versicolor*, la cual se lleva a cabo en 48 horas aproximadamente.

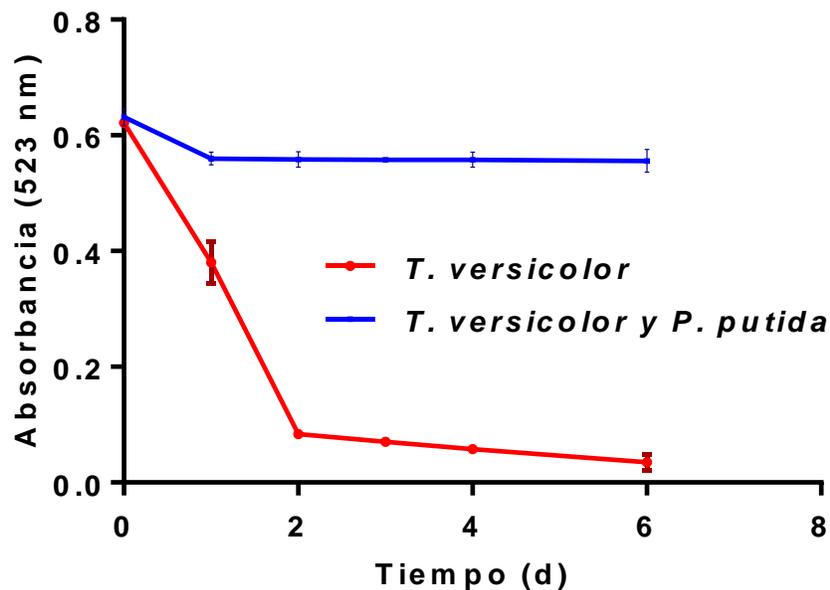


Figura 4.20. Decoloración del colorante rojo ácido 27 utilizando pellets de *T. versicolor*.

En la Figura 4.20 también se muestran los resultados obtenidos con un cultivo mixto, que se obtuvo inoculando pellets de 7 días de crecimiento con 500 μL de un cultivo de *P. putida* (DO=0.608; 0.24 g/L). Se utilizó medio Kirk suplementado con 1 g/L de glucosa y 30 mg/L de colorante. A pesar de que el hongo estaba presente en mayor cantidad (550:1), no hubo decoloración y se observó crecimiento de la bacteria, lo cual sugiere que bacteria utilizó la glucosa para crecer impidiendo que el hongo produjera las enzimas extracelulares responsables de la decoloración.

También se evaluó la decoloración que lleva a cabo *T. Versicolor* durante su crecimiento (Ver Figura 4.21). Se tomaron discos de agar (1 cm) de un cultivo en caja de *T. versicolor* de 7 días de crecimiento y se disolvieron en agua esterilizada. Se tomaron 5 ml de ese inóculo para iniciar los cultivos de crecimiento. Se encontró que *T. versicolor* puede degradar el colorante durante su crecimiento, aunque el tiempo de degradación es de 8 días, el cual es un tiempo mayor en comparación con el que se logra cuando se utilizan pellets ya formados (2 días).

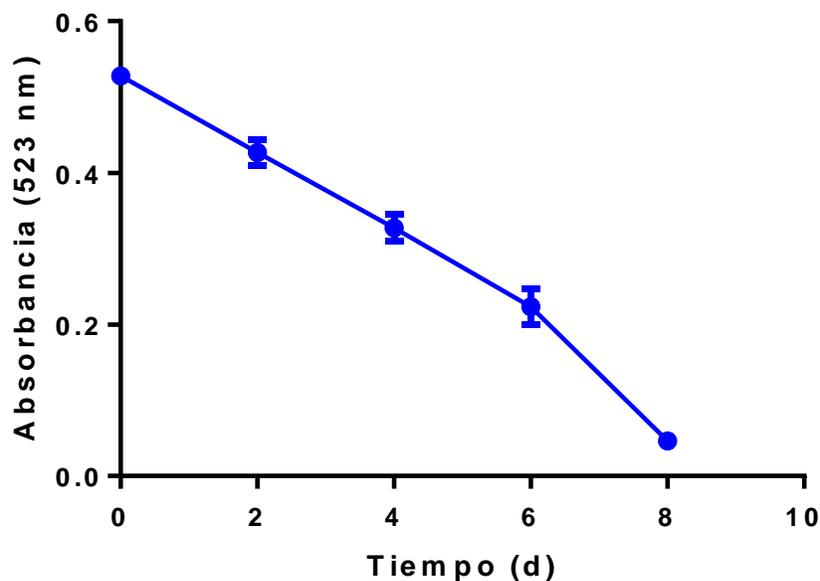


Figura 4.21. Decoloración del colorante rojo ácido 27 durante el crecimiento de *T. versicolor*.

En los cultivos en medio sólido se observa que hay un incremento en la eficiencia de decoloración al utilizar cultivos mixtos, aunque no se determinó si este efecto se debe a la presencia de la bacteria o a la producción de un metabolito secundario que actúe como un co oxidante similar al ABTS.

Para ello, se realizaron cultivos sencillos y mixtos en medio líquido utilizando diferentes proporciones de cultivos de *T. versicolor* (7 días) y *P. putida* (24 hrs). En la Tabla 4.1 se muestran las combinaciones realizadas.

Tabla 4.1. Combinaciones utilizadas para evaluar la decoloración en un cultivo mixto.

Tubo	Hongos 7 días de cultivo	Bacterias 24 hrs de cultivo	Sobrenadante cultivo bacteria	Medio Kirk
1	X	X	X	✓
2	✓	X	X	X
3	✓	✓	X	X
4	✓	X	✓	X
5	X	✓	X	X
6	X	X	✓	X
7	✓	X	X	✓

Volumen final: 4 mL; Concentración colorante: 30 mg/L

✓ Indica que contiene la sustancia.

Como blanco se utilizó el tubo 1, que contiene únicamente el medio de decoloración (medio Kirk y 30 mg/L de colorante). Como control negativo se utilizó un cultivo de *T. versicolor* al cual se le adicionó el medio Kirk sin inocular, con el fin de descartar que el incremento en la decoloración se deba a la adición de las sales minerales presentes en el medio. También se evaluó el efecto del sobrenadante y de las células de un cultivo de *P. putida*, para determinar si el incremento en la decoloración se debe a la presencia de un metabolito o a una respuesta debido a la interacción entre *T. versicolor* y *P. putida*. En la Figura 4.22 se observan los tubos después de 10 días.

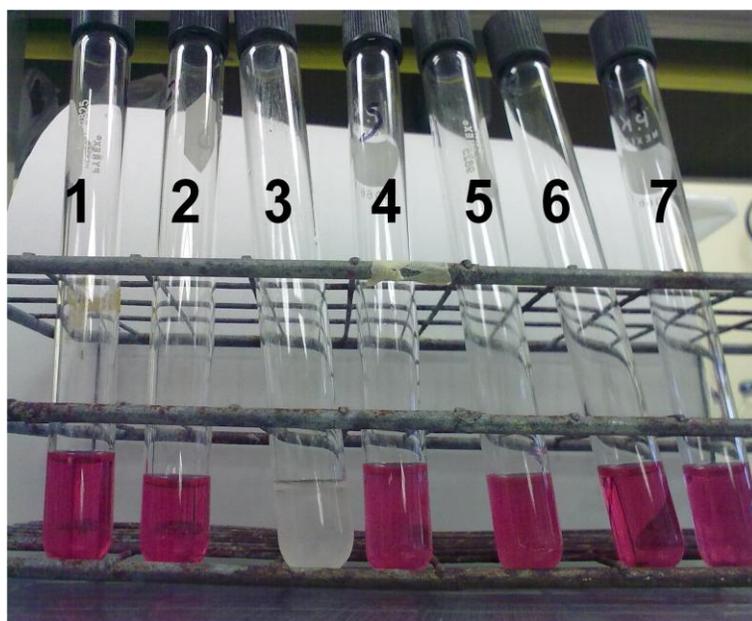


Figura 4.22. Pruebas de decoloración a los 10 días 1) Control 2) Hongo 3) Hongo/Bacteria 4) Hongo/Sobrenadante bacteria 5) Bacteria 6) Sobrenadante 7) Hongo/Medio Kirk.

Como puede observarse en la figura 4.22, el tubo 3, que contiene el cultivo mixto *T. versicolor* – *P. putida* es el que presenta una mayor decoloración después de 10 días de incubación (cualitativamente). En la Figura 4.23 se muestra la absorbancia a 523 nm de los sobrenadantes obtenidos en el experimento anterior. Los experimentos se realizaron por triplicado.

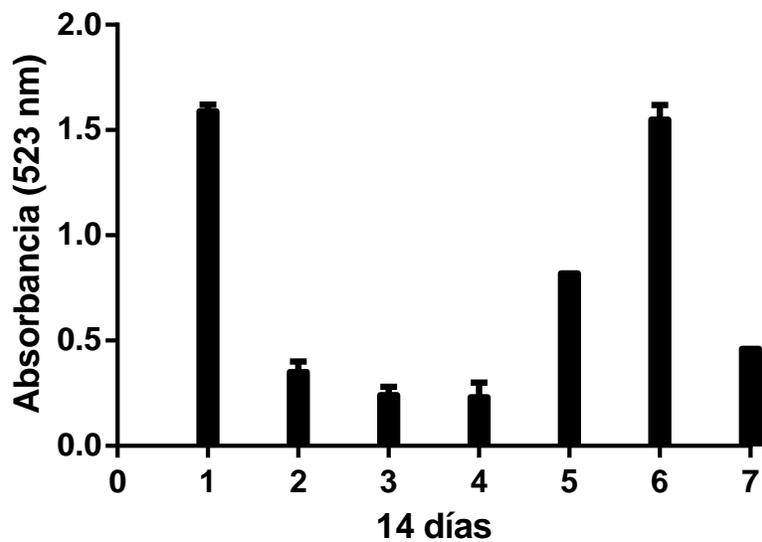
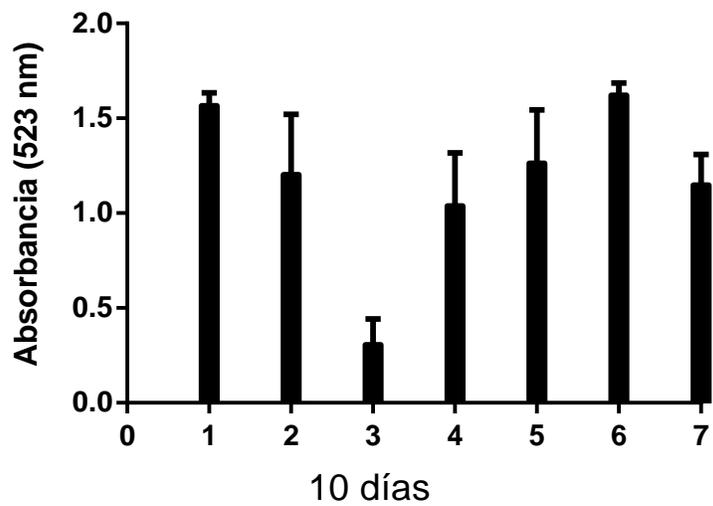


Figura 4.23. Decoloración usando cultivos mixtos y sencillos 1) Control 2) Hongo 3) Hongo/Bacteria 4)Hongo/Sobrenadante bacteria 5) Bacteria 6) Sobrenadante 7) Hongo/Medio Kirk

En el cultivo mixto (*T. versicolor*–*P. putida*) se observa el mayor porcentaje de decoloración a los 10 días (80.52%) con respecto al blanco, lo cual demuestra que los metabolismos combinados ambos organismos logran una mayor eficiencia en la decoloración que si se utilizaran cultivos sencillos. A los 10 días de cultivo se obtiene un

26% de decoloración con el cultivo de *P. putida*. En este caso, la decoloración puede deberse a la absorción del colorante a partir de la biomasa, aunque se tendría que evaluar el proceso de adsorción. A los 14 días, la decoloración llevada a cabo por *P. putida* no muestra un incremento con respecto a la obtenida al día 10. Para el caso de *T. versicolor* (tubos 2 y 7) el porcentaje de decoloración aumenta de un 23-26% (10 días) a un 70-78% (14 días), el cual es un porcentaje menor del que se alcanza con el cultivo mixto. Esto indica el cultivo mixto resulta más eficiente para lograr la decoloración que el cultivo simple.

También se evaluó el efecto del sobrenadante de un cultivo de 24 hrs de *P. putida*. El sobrenadante no presentó un efecto de decoloración, lo que descarta la presencia de alguna enzima o metabolito que pudiera interactuar directamente con el colorante, aunque en el sobrenadante puede estar presente algún metabolito que interactúe con la enzima y que tenga un efecto positivo sobre la decoloración. Cuando se combina *T. versicolor* con el sobrenadante de un cultivo de *P. putida* se obtiene un porcentaje de decoloración del 36%, el cual es mayor que el porcentaje obtenido con un cultivo sencillo de *T. versicolor* (23%). Esto sugiere que *P. putida* produce un metabolito que se acumula en el medio y que puede interactuar con *T. versicolor* o con la enzima que produce, produciendo un incremento en la decoloración. Sin embargo, a los 14 días ambos cultivos (tubo 2 y 4) alcanzan un porcentaje similar de decoloración, esto puede deberse a que el metabolito responsable del incremento en la decoloración se agota, por lo que los porcentajes de decoloración que alcanza a los 14 días es similar al que se obtiene en un cultivo simple de *T. versicolor*.

5. Conclusiones y Recomendaciones

El análisis teórico (DFT) de colorantes constituye una herramienta para analizar el mecanismo de degradación de un compuesto. El análisis teórico (DFT) de las moléculas resultantes de la degradación de colorantes permite confirmar y proponer mecanismos para una ruta metabólica. Los espectros de IR teóricos que se obtuvieron se pueden comparar con espectros obtenidos experimentalmente para verificar el mecanismo propuesto por Gavril *et* Hodson (2007a), o bien para proponer otro mecanismo que se ajuste a los datos obtenidos.

Se encontró que no se forma un halo de inhibición cuando *T. versicolor* y *P. putida* están presentes en un cultivo en medio sólido, por lo que ambas especies pueden crecer juntas cuando hay suficiente fuente de carbono para ambas.

T. versicolor es capaz de llevar a cabo la decoloración del rojo ácido 27, aunque no puede utilizar este colorante como fuente de carbono. La decoloración se lleva a cabo una vez que hay crecimiento del hongo

P. putida no tiene la capacidad de decolorar el colorante rojo ácido 27, aunque aún falta por evaluar si es capaz de metabolizar los subproductos que se formen durante la degradación y si es capaz de absorber el colorante bajo determinadas condiciones.

El modelo conceptual considera los aspectos reportados en la literatura e integra los datos experimentales obtenidos, con lo que se simplifica el modelo propuesto inicialmente. A partir de este nuevo modelo conceptual, se plantearon las ecuaciones cinéticas que representarían al sistema propuesto (*T. versicolor* - *P. putida*).

A partir de las ecuaciones cinéticas propuestas y los parámetros reportados en la literatura se resolvió el modelo matemático, con lo que se logró la simulación de la degradación del colorante rojo ácido 27 por *T. versicolor* y *P. putida*. En el modelo se asumió que *P. putida*

utiliza simultáneamente compuestos aromáticos y glucosa como fuente de carbono. Es necesario determinar el tipo de compuestos aromáticos presentes en los cultivos para poder evaluar la inhibición por sustrato que pudiera presentarse, además de la utilización preferente de alguno de estos dos sustratos.

Por otro lado, el modelo asume que la enzima lacasa es la que se encarga de la decoloración del rojo ácido 27. La lacasa y la manganeso peroxidasa son las enzimas principales involucradas en el proceso de degradación del colorante, por lo que se podría simular la acción conjunta de las enzimas en la decoloración.

En las placas donde se evaluó la decoloración en cultivos mixtos se observó que la decoloración inicia en la zona de contacto entre las especies. Las pruebas realizadas con pellets obtenidos de un inóculo estandarizado presentaron el mismo comportamiento. En ambos casos, las cajas donde se inocularon ambos organismos se decoloraron más rápidamente que en las cajas con el hongo solo. Estos datos indican que el proceso de decoloración se lleva a cabo más rápido cuando se utiliza el sistema propuesto: un cultivo mixto de *T. versicolor* y *P. putida*

En los ensayos cualitativos en cajas con medio Kirk y ABTS como sustrato, se encontró actividad enzimática en los pellets y el sobrenadante, es posible utilizar ambos en el proceso de decoloración. Las pruebas en tubo de ensayo indican que aunque el sobrenadante presenta la capacidad de decolorar al colorante rojo ácido 27, el proceso de decoloración no se ve afectado por la adición de un cultivo de *P. putida*.

Al evaluar los cultivos mixtos en cajas con medio KIRK y ABTS, se observó un cambio en los halos de oxidación formados inicialmente por la actividad de la enzima lacasa (producida por *T. versicolor*). Este cambio en la coloración puede deberse a un metabolito presente en el cultivo de *P. putida*.

Se iniciaron las pruebas en medio líquido para determinar las condiciones en las que se establecerán los cultivos mixtos. *T. versicolor* puede llevar a cabo la decoloración mientras

está creciendo y también cuando está en forma de pellets. Aún es necesario evaluar la actividad enzimática y la cantidad de proteína presente en los cultivos para poder compararlos con los cultivos mixtos.

Se encontró que en los cultivos mixtos realizados en medio líquido, la presencia de la bacteria incrementa la velocidad de decoloración. A los 10 días, el cultivo mixto presenta una decoloración del 80.52%, mientras que los cultivos simples de *T. versicolor* y *P. putida* presentan una decoloración del 20%. En el cultivo de *T. versicolor* se alcanza una decoloración del 78% a los 14 días de cultivo.

La decoloración que se logra con un cultivo de *P. putida*, puede deberse a la absorción del colorante por la biomasa. El porcentaje total de decoloración que se alcanza es del 30%.

Aún es necesario realizar cinéticas de crecimiento y de degradación del colorante rojo ácido 27 utilizando *T. versicolor* y para *P. putida* para determinar los parámetros cinéticos que permitan cuantificar la eficiencia de decoloración en cultivos sencillos y mixtos. También se debe evaluar la absorción de colorante a través de la biomasa de *T. versicolor* y *P. putida*, ya que este podría ser un factor que mejore la decoloración en el cultivo mixto.

Referencias

1. Abadulla E., Jzanov T., Costa S., Robra K. H., Caracto-Paulo A. y Gubitz G.M., 2000. Decolourization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsutus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 3357–3362.
2. An S.Y., Min S.K., Cha I.H., Choi Y.K., Cho Y.S., Kim C.H. y Lee Y.C., 2002. Decolorization of triphenylamine and azo dyes by *Citrobacter* sp. *Biotechnol. Lett.*, **24**, 1037–1040.
3. Anjaneyulu Y., Sreedhara-Chary N. y Suman-Raj S., 2005. Decolourization of industrial effluents – available methods and emerging technologies – a review. *Rev. Environ. Sci. Technol.*, **4**, 245–273.
4. Annadurai G. y Krishnan M.R.V., 1997. Adsorption of acid dye from aqueous solution by Chitin: Equilibrium studies. *Indian J. Chem. Technol.*, **4**, 217–222
5. Azbar N., Kestioğlu K. y Yonar T., 2005. Application of Advanced Oxidation Processes (AOPs) to Wastewater Treatment. Case Studies: Decolourization of Textile Effluents, Detoxification of Olive Mill Effluent, Treatment of Domestic Wastewater. En *Water Pollution: New Research*, New York, Nova Science Publishers, Ed. A.R. Burk, 99-118.
6. Bae S.J., Freeman S.H. y Kim D.S., 2006. Influences of new azo dyes to the aquatic ecosystem. *Fiber Polymer.*, **7**, 30-35.
7. Baker K.H. y Herson D.S., 1994. Introduction and overview of bioremediation. En “Bioremediation” (K. H. Baker et D. S. Herson, eds.), McGraw Hill, New York, 1–7
8. Ball A.S., Betts W.B. y McCarthy A.J., 1989. Degradation of lignin related compounds by actinomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1642–1644.
9. Ball A.S., Cotton J., 1996. Decolourization of two polymeric dye Poly R by *Streptomyces viridosporus* T7A. *J. Basic Microbiol.*, **36**, 13–18.
10. Banat I.M., Nigam P., Singh D. y Marchant R., 1996. Microbial decolorization of textile dye containing effluents: a review. *Biores. Tech.*, **58**, 217–227.

11. Bhole B.D., Ganguly B., Madhuram A., Deshpande D. y Joshi J., 2004. Biosorption of methyl violet, basic fuchsin and their mixture using dead fungal biomass. *Curr. Sci.*, **86**, 1641–1645.
12. Boddy L., 2000. Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **31**, 185-194.
13. Bousher A., Shen X. y Edyvean R.G.J., 1997. Removal of coloured organic matter by adsorption onto low cost waste materials. *Water Res.*, **31**, 2084–2092
14. Brown M.A. y De Vito S.C., 1993. Predicting azo dye toxicity. *Crit. Rev. Environ.Sci. Technol.*,**23**, 249–324
15. Champagne P.P. y Ramsay J.A., 2005. Contribution of manganese peroxidase and laccase to dye decoloration by *Trametes versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **69**, 276–285.
16. Chandran C.B., Singh D. y Nigam P., 2002. Remediation of textile effluent using agricultural residues. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **102-103**, 207-212.
17. Chang J.S. y Lin Y.C., 2000. Fed-batch bioreactor strategies for microbial decolorization of azo dye using a *Pseudomonas luteola* strain. *Biotechnol. Prog.*, **16**, 979–985.
18. Chang J.S. y Lin Y.C., 2001. Decolorization kinetics of a recombinant *Escherichia coli* strain harboring azo-dye-decolorizing determinants from *Rhodococcus* sp. *Biotechnol. Lett.*, **23**, 631–636.
19. Chang J.S., Chou C. y Chen S.Y., 2001. Decolorization of azo dyes with immobilized *Pseudomonas luteola*. *Proc. Biochem.*, **36**,757–63.
20. Chang J.S., Kuo T.S., Chao Y.P., Ho J.Y. y Lin P.J., 2000. Azo dye decolorization with a mutant *Escherichia coli* strain. *Biotechnol. Lett.*, **22**, 807–812.
21. Chapra R. y Canale P., 2003. Métodos numéricos para ingenieros. Ed. McGraw Hill, México, 4a Edición, 713-758.
22. Chaudhary A.J., Ganguli B. y Grimes M.S., 2002. The use of Chromium waste sludge for the adsorption of colour from dye effluent streams. *J. Chem. Technol.Biotechnol.*,**77**, 767–770
23. Chavan R.B., 2001. Indian textile industry-environmental issues. *Indian J. FibreText. Res.*, **26**, 11–21.

24. Chen C.C., Liao H.J., Cheng C.Y., Yen C.Y. y Chung Y.C., 2007. Biodegradation of crystal violet by *Pseudomonas putida*. *Biotechnol. Lett.*, **29**, 391-396.
25. Chen K.C., Huang W.T., Wu Y. y Houng J.Y., 1999. Microbial decolourization of azo dyes by *Proteus mirabilis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 686–690.
26. Chen Y.M., Lin T.F., Huang C., Lin J.C. y Hsieh F.M., 2007. Degradation of phenol and TCE using suspended and chitosan-bead immobilized *Pseudomonas putida*. *J. Hazard. Mater.*, **148**, 660-670.
27. Chengalroyen M. D. y Dabbs E. R., 2013. The microbial degradation of azo dyes: minireview. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **29**, 389-399.
28. Cheung K. H. y Gu J. D., 2007. Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganism and bioremediation application potential: a review. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **59**, 8-15.
29. Chhabra M., Mishra S. y Sreekrishnan T., 2008. Mediator-assisted decolorization and detoxification of textile dyes/dye mixture by *Cyathobulleri laccase*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **151**, 587-598.
30. Chhaya J., Thaker J., Mittal R., Nuzhat S., Mansuri A.P. y Kundu R., 2007. Influence of textile dyeing and printing industry effluent on ATPases in liver, brain, and muscle of mudskipper, *Periophthalmus dipes*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **58**, 793-800.
31. Choi N., Choi J., Kim S. y Kim D., 2008. Modeling of growth kinetics for *Pseudomonas putida* during toluene degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **81**, 135–141
32. Christie R., 2001. Colour Chemistry. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, United Kingdom.
33. Chung K.T. y Stevens S.E.J., 1993. Decolourisation of azo dyes by environmental microorganisms and helminthes. *Environ. Toxicol. Chem.*, **12**, 2121–2132
34. Chung K.T., Steven S.E.J. y Cerniglia C. E., 1992. The reduction of azo dyes by the intestinal microflora. *Crit. Rev. Microbiol.*, **18**, 175-197
35. Collins P., Dobson A. y Field J., 1998. Reduction of the 2,2 -azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6- sulfonate) cation radical by physiological organic acids in the absence and presence of Manganese. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 2026-2031.

36. Cripps C., Bumpus J. A. y Aust S. D., 1990. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1114–1118.
37. Cristóvão R.O., Tavares A.P., Ferreira L.A., Loureiro J.M., Bouventura R.A. y Macedo E.A., 2009. Modeling the discoloration of a mixture of reactive textile dyes by commercial laccase. *Bioresour. Technol.*, **100**, 1094-1099.
38. Dafale N., Rao N.N., Meshram S.U. y Wate S.R., 2008. Decolorization of azo dyes and simulated dye bath wastewater using acclimatized microbial consortium – Biostimulation and halo tolerance. *Bioresour. Technol.*, **99**, 2552–2558.
39. Dawkar V.V., Jadhav U.U., Ghodake G.S. y Govindwar S.P., 2009. Effect of inducers on the decolorization and biodegradation of textile azo dye Navy blue 2GL by *Bacillus* sp. VUS. *Biodegradation*, **20**, 777–787.
40. De Boer W., Folman L.B., Gunnewiek P.J., Svensson T., Bastviken D., Oberg G., Del Rio J.C. y Boddy L., 2010. Mechanism of antibacterial activity of the white-rot fungus *Hypholoma fasciculare* colonizing wood. *Can. J. Microbiol.*, **56**, 380-388.
41. Del Castillo T., Ramos J., Rodríguez-Herva J., Fuhrer T., Sauer U. y Duque E., 2007. Convergent peripheral pathways catalyze initial glucose catabolism in *Pseudomonas putida*: Genomic and flux analysis. *J. Bacteriol.*, **189**, 5142–5152
42. Demir G., 2004. Degradation of toluene and benzene by *Trametes versicolor*. *J. Environ. Biol.*, **25**, 19-25.
43. DeMoraes S.G., Freire R.S. y Duran N., 2000. Degradation and toxicity reduction of textile effluent by combined photocatalytic and ozonation processes. *Chemosphere*, **40**, 369-373.
44. Dias A.A., Bezerra R.M. y Pereira A.N., 2004. Activity and elution profile of laccase during biological decolorization and dephenolization of olive mill wastewater. *Biores. Technol.*, **92**, 7-13
45. Dias A.D., Sampaio A. y Bezerra R.M., 2007. Environmental applications of fungal and plant systems: decolourisation of textile wastewater and related dyestuffs. En *Environmental Bioremediation Technologies* (Editores Singh S.N. y Tripathi R.D.) Springer Berlin Heidelberg, 445-463.
46. Dönbak L., Rencuzogullari E., Topaktas M. y Sahin G., 2006. A biomonitoring study on the workers from textile dyeing plants. *Genetika.*, **42**, 613–618.

47. Dos Santos A.B., Bisschops I.A.E. y Cervantes F.J., 2006. Closing process water cycles and product recovery in textile industry: perspective for biological treatment. En *Advanced Biological Treatment Processes for Industrial Wastewaters*, vol. 1, (Editores: Cervantes F.J., Van Haandel A.C. y Pavlostathis S.G.), International Water Association, London, 298–320.
48. Dos Santos V.A., Heim S., Moore E.R., Strätz M. y Timmis, K.N., 2004. Insights into the genomic basis of niche specificity of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.*, **6**, 1264–1286.
49. Dos-Santos A., Cervantes F. y Van-Lier J., 2007. Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: Perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresour. Technol.*, **98**, 2369-2385.
50. Dubin P. y Wright K.L., 1975. Reduction of azo food dyes in cultures of *Proteus vulgaris*. *Xenobiotica*, **5**, 563–71.
51. Easton J., 1995. The dye maker's view. En *Colour in dyehouse effluent* (Editor: Cooper P), Bradford, UK: Society of Dyers and Colourists, 11.
52. Edens W. A., Goins Y. Q., Dooley D. y Henosn J. M., 1999. Purification and characterization of secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. tritici. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1741–1747.
53. Fersi C. y Dhahbi M., 2008. Treatment of textile plant effluent by ultrafiltration and/or nanofiltration for water reuse. *Desalination*, **222**, 263-271.
54. Folman L. B., Klein Gunnewiek P. J. A., Boddy L. y DeBoer W., 2008. Impact of white-rot fungi on numbers and community composition of bacteria colonizing beech wood from forest soil. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **63**, 181-191.
55. Forgacs E., Cserhati T. y Oros G., 2004 Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. *Environ. Int.*, **30**, 953–971.
56. Fu Y. y Viraraghavan T., 2002. Dye biosorption sites in *Aspergillus niger*. *Biores. Technol.*, **82**:139–145.
57. Gavril M. y Hodson P., 2007a. Chemical evidence for the mechanism of the biodecoloration of Amaranth by *Trametes versicolor*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 103–124, 2007.

58. Gavril M. y Hodson P.V., 2007b. Investigation of the Toxicity of the Products of Decoloration of Amaranth by *Trametes versicolor*. *J. Environ. Qual.*, **36**, 1591–1598.
59. Gingell R. y Walker R., 1971. Mechanisms of azo reduction by *Streptococcus faecalis*. II. The role of soluble flavins. *Xenobiotica*, **1**, 231–239.
60. Giordano A., Grilli S., De Florio L. y Mattioli D., 2005. Effect of selected textile effluents on activated sludge nitrification process. *J. Environ. Sci. Health A. Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.*, **40**, 1997-2007.
61. Glenn J.K. y Gold M.H., 1983. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1741–1747.
62. Gogate P.R. y Pandit A.B., 2004. A review of imperative technologies for wastewater treatment I: Oxidation technologies at ambient conditions. *Adv. Environ. Res.*, **8**, 501-551.
63. González-Gutiérrez L.V. y Escamilla-Silva E.M., 2009. Proposed pathways for the reduction of a reactive azo dye in an Anaerobic Fixed Bed Reactor. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 415–426.
64. Goszczynski S., Paszczynski A., Pasti-Grigsby M.B., Crawford R.L. y Crawford D.L., 1994. New pathway for degradation of sulfonated azo dyes by microbial peroxidases of by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. *J. Bacteriol.*, **176**, 1339–1347.
65. Gupta G.S., Singh A.K., Tayagi B.S., Prasad G. y Singh V.N., 1992. Treatment of carpet and metallic effluent by China clay. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **55**, 227–283
66. Hai I., Modin O., Yamamoto K., Fukush K., Nakajima F. y Nghiem L., 2012. Pesticide removal by a mixed culture of bacteria and white-rot fungi. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, **43**, 459–462.
67. Hao O.J., Kim H. y Chang P.C., 2000. Decolorization of wastewater. *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.*, **30**, 449–505.
68. Harvey P. y Thurston C., 2001. The biochemistry of ligninolytic fungi. En Fungi in Bioremediation (Editor Gadd G.M.) Cambridge University Press., 27-51.

69. Haug W., Schmidt A., Nörtemann B., Hempel D.C., Stolz A. y Knackmuss H.J., 1991. Mineralization of the sulfonated azo dye mordant yellow 3 by 6-aminonaphthalene-2-sulfonate-degrading bacterial consortium. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 3144–3149.
70. Hayase N., Kouno K. y Ushio K., 2000. Isolation and characterization of *Aeromonas* sp. B-5 capable of decolorizing various dyes. *J. Biosci. Bioeng.*, **90**, 570–573.
71. Hill, G. A.; Robinson, C. W., (1975). Substrate inhibition kinetics: Phenol degradation by *Pseudomonas putida*. *Biotech. Bioeng.*, **17**, 1599-1615
72. Hong Y., Guo J., Xu Z., Mo C., Xu M. y Sun G., 2007. Reduction and partial degradation mechanisms of naphthylaminesulfonic azo dye amaranth by *Shewanella decolorationis* S12. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 647-654
73. Horitsu H., Takada M., Idaka E., Tomoyeda M. y Ogawa T., 1977. Degradation of p-aminoazobenzene by *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **4**, 217–224.
74. Hu T.L., 1990. Decolourization of reactive azo dyes by transformation with *Pseudomonas luteola*. *Biores. Technol.*, **49**, 47–51.
75. Hu T.L., 2001. Kinetics of azoreductase and assessment of toxicity of metabolic products from azo dyes by *Pseudomonas luteola*. *Water Sci. Technol.*, **43**, 261–9.
76. Iakovlev A. y Stenlid J., 2000. Spatio temporal patterns of laccase activity in interacting mycelia of wood-decaying basidiomycete fungi. *Microb. Ecol.*, **39**, 236–245.
77. Jiménez J.I., Miñambres B., García J.L. y Díaz E., 2002. Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.*, **4**, 824-841
78. Johannes C. y Majcherczyk A., 2000. Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 524-528.
79. Kalyani D.C., Telke A.A., Dhanve R.S. y Jadhav J.P., 2008. Ecofriendly biodegradation and detoxification of reactive red 2 textile dye by newly isolated *Pseudomonas* sp. SUK1. *J. Hazard. Mater.*, **163**, 735-742.

80. Kandelbauer A. y Guebitz G.M., 2005. Bioremediation for the decolorization of textile dyes - a review. En *Environmental Chemistry* (Editores: Lichtfouse E, Dudd S, Robert D) Springer Berlin Heidelberg, 269-288.
81. Kapdan I.K., Tekol M., Sengul F., 2003. Decolorization of simulated textile wastewater in an anaerobic-aerobic sequential treatment system. *Proc. Biochem.*, **38**, 1031–1037.
82. Karcher S., Kornmuller A. y Jekel M., 2001. Screening of commercial sorbents for the removal of reactive dyes. *Dye Pigment.*, **51**, 111–125.
83. Kargi F. y Eker S., 2004. Toxicity and batch biodegradation kinetics of 2,4dichlorophenol by pure *Pseudomonas putida* culture. *Enz. Microbial. Technol.*, **35**, 424–428.
84. Kaushik P. y Malik A., 2009. Fungal dye decolourization: Recent advances and future potential. *Environ Int.*, **35**, 127-141.
85. Keharia H. y Madamwar D., 2002. Transformation of textile dyes by white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **102-103**, 99-108.
86. Kim T.H., Park C., Lee J., Shin E.B. y Kim S., 2002. Pilot scale treatment of textile wastewater by combined processes (fluidized biofilm process – chemical coagulation – electrochemical oxidation). *Water Res.*, **36**, 3979–3988
87. Kirby N., Marchant R. y McMullan G., 2000. Decolourisation of synthetic textile dyes by *Phlebiatremellosa*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **188**, 93–96.
88. Knackmuss H.J., 1996. Basic knowledge and perspectives of bioelimination of xenobiotic compounds. *J. of Biotechnol.*, **51**, 287–95.
89. Knapp J.S., Vantoch-Wood E.J. y Zhang F., 2001. Use of wood-rotting fungi for the decolorization of dyes in and industrial effluent. En *Fungi in Bioremediation* (Editor Gadd G.M.) Cambridge University Press., 242–304.
90. Knapp J.S., Zhang F. y Tapley K.N., 1997. Decolourisation of Orange II by a wood rotting fungus. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **69**, 289–296.
91. Kolb M., Sieber V., Amann M., Faulstich M. y Schieder D., 2012. Removal of monomer delignification products by laccase from *Trametes versicolor*. *Bioresour Technol.*, **104**, 298-304.

92. Kositzi M., Poullos I., Samara K., Tsatsaroni E. y Darakas E., 2007. Photocatalytic oxidation of Cibacron Yellow LS-R. *J. Hazard. Mater.*, **146**, 680–685
93. Kuhad R.C., Sood N., Tripathi K.K., Singh A. y Ward O.P., 2004. Developments in microbial methods for the treatment of dye effluents. *Adv. Appl. Microbiol.*, **56**, 185-213.
94. Kumar A., Kumar S. y Kumar S., 2005. Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. *Biochem. Eng. J.*, **22**, 151–159.
95. Kumar R., Sridhar T.R., Bhavani K.D. y Dutta P.K., 1998. Trends in color removal from textile mill effluents. *Colorage*, **40**, 25–34.
96. Kwon J.H., Lee H.K., Kwon J., Kim K., Park E., Kang M.H. y Kim Y.H., 2008. Mutagenic activity of river water from a river near textile industrial complex in Korea. *Environ. Monit. Assess.*, **142**, 289–296.
97. Lu L., Zhao M., Liang S.C., Zhao L.Y., Li D.B. y Zhang B. B., 2009. Production and synthetic dyes decolorization capacity of a recombinant laccase from *Pichiapastoris*. *J. Appl. Microbiol.*, **107**, 1149–1156.
98. Manu B. y Chaudhari S., 2002. Anaerobic decolorization of simulated textile wastewater containing azo dyes. *Biores. Technol.*, **82**, 225–231
99. Mathur N., Krishnatrey R., Sharma S. y Sharma K.P., 2003. Toxic effects of textile printing industry effluents on liver and testes of albino rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **71**:453–457.
100. McKay G., Lee C.K. y Heng L.L., 1986. Equilibrium studies for adsorption of dyestuffs from aqueous solutions by low cost materials. *Water Air Soil Poll.*, **29**, 274–283.
101. McMullan G., Meehan C., Conneely A., Kirby N., Robinson T., Nigam P., Banat I.M., Marchant R. y Smyth W.F., 2001. Microbial decolourisation and degradation of textile dyes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **56**, 81-87.
102. Mendes S., Pereira L., Batista C. y Martins L., 2011. Molecular determinants of azo reduction activity in the strain *Pseudomonas putida* MET94. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **92**, 393–405
103. Mishra G. y Tripathy M., 1993. A critical review of the treatments for decolouration of textile effluent. *Colourage*, **40**, 35–38

104. Mock M. y Hamouda H., 1998. Ozone application to color destruction of industrial wastewater- Part I: Experimental. *American Dyestuff Reporter*, **87**, 18-22.
105. Molina L., Ramos C., Duque E., Ronchel M.C., García J.M., Wyke L. y Ramos J.L., 2000. Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions. *Soil Biol. Biochem.*, **32**, 315–321.
106. Molina-Guijarro J.M., Perez J., Munoz-Dorado J., Guillen F., Moya R., Hernandez M. y Arias M.E., 2009. Detoxification of azo dyes by a novel pH-versatile, salt-resistant laccase from *Streptomyces ipomoea*. *Int. Microbiol.*, **12**, 13–21.
107. Monteiro A.M.G., Boaventura R.A.R., Rodrigues A.E., 2000. Phenol biodegradation by *Pseudomonas putida* DSM 548 in a batch reactor, *Biochem. Eng. J.*, **6**, 45–49.
108. Muralikrishna C. y Renganathan V., 1995. Phenolic azo dye oxidation by laccase from *Pyricularia oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 4374–4377.
109. Mutlu S.H., Yetis V., Gurkan T. y Yilmaz L., 2002. Decolorization of wastewater of a baker's yeast plant by membrane processes. *Water Res.*, **36**, 609–616
110. Nigam P., Armour G., Banat I.M., Singh D. y Marchant R., 2000. Physical removal of textile dyes from effluents and solid-state fermentation of dye-adsorbed agricultural residues. *Biores. Technol.*, **72**, 219–226.
111. Nigam P., Banat I.M., Singh D. y Marchant R., 1996. Microbial process for the decolorization of textile effluent containing azo, diazo and reactive dyes. *Process Biochem.*, **31**, 435–42.
112. Novotny C., Rawat B., Bhatt M., Patel M., Sasek V. y Molitors H.P., 2001. Capacity of *Irpexlacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. *J. Biotechnol.*, **89**, 113–122.
113. Oğuz E. y Keskinler B., 2008. Removal of color and COD from synthetic textile wastewaters using O₃, PAC, H₂O₂ and HCO₃⁻. *J. Hazard. Mat.*, **151**, 753–760.
114. Pak D. y Chang W., 1999. Decolorizing dye wastewater with low temperature catalytic oxidation. *Water Sci. Technol.*, **40**, 115–121.
115. Pandey A., Singh P. y Lyengar L., 2007. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **59**, 73–84.

116. Park C., Lee M., Lee B., Kim S.W., Chase H.A., Lee J. y Kim S., 2007. Biodegradation and biosorption for decolorization of synthetic dyes by *Funaliatrogii*. *Biochem. Eng. J.*, **36**, 59-65.
117. Pearce C.I., Lloyd J.R. y Guthrie J.T., 2003. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. *Dye Pigment.*, **58**, 179–196.
118. Pelegrini R., Peralto-Zamora P., De Andrade R., Ryers J. y Duran N., 1999. Electrochemically assisted photocatalytic degradation of reactive dyes. *Appl. Catal. B: Environ.*, **22**, 83–90.
119. Pieper D.H., Martins dos Santos V.A., y Golyshin P.N., 2004. Genomic and mechanistic insights into the biodegradation of organic pollutants. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **15**, 215–224.
120. Pointing S.B. y Vrizmoed L.P., 2000. Decolourization of azo and triphenyl methane dyes by *Pycnoporus sanguineus* producing laccase as the sole phenoloxidase. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **16**, 317–318.
121. Potthast A., Rosenau T., Chen C. y Gratzl J., 1996. A novel method for the conversion of benzyl alcohols to benzaldehydes by laccase catalysed oxidation. *J. Mol. Catalysis A.*, **108**, 5-9.
122. Rafii F., Fraeankalin W. y Cerniglia C. E., 1990. Azoreductase activity of anaerobic bacteria isolated from human intestinal microflora. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 2146–2151.
123. Raghavacharya C., 1997. Colour removal from industrial effluents—a comparative review of available technologies. *Chem. Eng. World*, **32**, 53–54.
124. Rakmi A. R., 1993. Characterization and prospects for biological treatment of textile finishing wastewater. Ministry of Science, Technology and the Environment, Malaysia, 99-108.
125. Ramesh B., Parande A.K., Raghu S., y Prem Kumar T., 2007. Cotton textile processing: waste generation and effluent treatment. *J. of Cotton Sci.*, **11**:141–153.
126. Ramsay J. y Goode C., 2004. Decoloration of a carpet dye effluent using *Trametes versicolor*. *Biotechnol. Lett.*, **26**, 197–201.

127. Ramsay J., Shin M., Wong S. y Goode C., 2006. Amaranth decoloration by *Trametes versicolor* in a rotating biological contacting reactor. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **3**, 791–795
128. Ramsay J. y Nguyen T., 2002. Decoloration of textile dyes by *Trametes versicolor* and its effect on dye toxicity. *Biotechnol. Lett.*, **24**, 1757–1761.
129. Ranganathan K., Jeyapaul S. y Sharma D., 2007. Assessment of water pollution in different bleaching based paper manufacturing and textile dyeing industries in India. *Environ. Monit. Assess.*, **134**, 363–372
130. Reardon K., Mosteller D., Rogers J., Du-Teau N. y Kim K., 2006. Biodegradation kinetics of aromatic hydrocarbon mixtures by pure and mixed bacterial cultures. *Environ. Health Perspect.*, **110**, 1005-1011.
131. Reddy C.A., 1995. The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **6**, 320–328.
132. Rehman A., Bhatti H. y Rehman H., 2008. Textile effluents affected seed germination and early growth of some winter vegetable crops: a case study. *Water Air Soil Pollut.*, **198**, 155-163.
133. Reid I.D., 1998. Fate of residual lignin during delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 2117-2125.
134. Robinson T., McMullan G., Marchant R. y Nigam P., 2001. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresour. Technol.*, **77**, 247-255.
135. Rodríguez-Rodríguez C., García-Galán M., Blánquez P., Díaz- Cruz S. y Barceló D., 2012. Continuous degradation of a mixture of sulfonamides by *Trametes versicolor* and identification of metabolites from sulfapyridine and sulfathiazole. *J. Hazar. Mater.*, **213-214**, 347-354.
136. Ryan S., Schnitzhfer W., Tznov T., Cavaco-Paulo A. y Gubitiz G.M., 2003. An acid stable laccase from *Sclerotium rolfsii* for wool dye decolourization. *Enz. Microb. Technol.*, **33**, 766–774.
137. Sani R.K., Azmi W. y Banerjee U.C., 1998. Comparison of static and shake culture in de decolorization of textile dyes and dye effluents by *Phanerochaete chrysosporium*. *Folia Microbiol.*, **43**, 85–88.

138. Sarnaik S. y Kanekar P., 1999. Biodegradation of methyl violet by *Pseudomonas mendocina* MCM B-402. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **52**, 251–254.
139. Schmid A., Dordick J. S., Hauer B., Kiener A., Wubbolts M y Witholt B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, **409**, 258-268.
140. Selvam K., Swaminathan K. y Chae K.S., 2003. Decolorization of azo dyes and a dye industry effluent by a white rot fungus *Thelephora* sp. *Biores. Technol.*, **88**, 115–119.
141. Semde R., Pierre D., Geuskens G., Devleeschouwer M. y Moes A.J., 1998. Study of some important factors involved in azo derivative reduction by *Clostridium perfringens*. *Int. J. Pharmaceutics*, **161**, 45–54.
142. Shaffique T.S., Roy J.J., Nair R.A. y Abraham T.E., 2002. Degradation of textile dyes mediated by plant peroxidases. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **102-103**, 315-326.
143. Shaul G.M., Holdsworth T.J., Dempsey C.R. y Dostall K.A., 1991. Fate of water soluble azo dyes in the activated sludge process. *Chemosphere*, **22**, 107-119.
144. Slokar Y.M. y Le Marechal A.M., 1998. Methods of decoloration of textile wastewater. *Dye Pigment.*, **37**, 335–356.
145. Stolz A., 2001. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Appl. Microb. Biotechnol.*, **56**, 69-80.
146. Supaka N., Juntongin K., Damronglerd S., Delia M.L. y Strehaiano P., 2004. Microbial decolorization of reactive azo dyes in a sequential anaerobic–aerobic system. *Chem. Eng. J.*, **99**, 169–176.
147. Swamy J. y Ramsay J.A., 1999. The evaluation of white rot fungi in the decolorization of textile dyes. *Enz. Microb. Technol.*, **24**, 130–137.
148. Swamy J. y Ramsay J.A., 1999a. Effect of glucose and NH_4^+ concentrations on sequential dye decoloration by *Trametes versicolor*. *Enz. Microb. Technol.*, **25**, 278–284
149. Swamy J. y Ramsay J.A., 1999b. Effect of Mn^{2+} and NH_4^+ concentrations on laccase and manganese peroxidase production and amaranth decoloration by *Trametes versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**, 391–396.
150. Tavares A., Coelho M., Agapito M., Coutinho J. y Xavier A., 2006. Optimization and modeling of laccase production by *Trametes versicolor* in a bioreactor using statistical experimental design. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **134**, 233-248.

151. Thiruchelvam A. y Ramsay J., 2007. Growth and laccase production kinetics of *Trametes versicolor* in a stirred tank reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **74**, 547–554.
152. Timmis, K.N., 2002. *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence. *Environ. Microbiol.*, **4**, 779–781.
153. Toh Y.C., Yen J.L., Obbard J.P. y Ting Y.P., 2003. Decolourisation of azo dyes by white-rot fungi (WRF) isolated in Singapore. *Enz. Microb. Technol.*, **33**, 569–575.
154. Tripathi A. y Srivastava S.K., 2011. Ecofriendly treatment of azo dyes: Biodecolorization using bacterial strains. *Int. J. Biosci. Biochem. Bioinform.*, **1**, 37-40.
155. Ullah M.A., Bedford C.T. y Evans C.S., 2000. Reactions of pentachlorophenol with laccase from *Coriolus versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**, 230-234.
156. Ulson de Souza S., Forgiarini E. y Ulson de Souza A., 2007. Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). *J. Hazard. Mat.*, **147**, 1073–1078.
157. Van der Zee F., 2002. Anaerobic azo dye reduction. Environmental Technology. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
158. Vasdev K, Kuhad RC (1994) Decolorization of poly R-478 (Polyvinylamine sulfonate anthrapyridone) by *Cyathusbulleri*. *Folia Microbiol.*, **39**, 61–64.
159. Vlyssides A.G., Loizidou M., Karlis P.K., Zorpas A.A. y Papaioannou D., 1999. Electrochemical oxidation of textile effluent using a Pt/Ti electrode. *J. Hazard. Mat.*, **70**, 41–52.
160. Vlyssides A.G., Papaioannou D., Loizidou M., Karlis P.K. y Zorpas A.A., 2000. Testing an electrochemical method for treatment of textile dye wastewater. *Waste Mang.*, **20**, 569–574.
161. Wang W., Zhang Z., Ni H., Yang X., Li Q. y Li L., 2012. Decolorization of industrial synthetic dyes using engineered *Pseudomonas putida* cells with surface-immobilized bacterial laccase. *Microb. Cell. Fact.*, **11**,75.
162. Wang Y. y Yu J., 1998. Adsorption and degradation of synthetic dyes on the mycelium of *Trametes versicolor*. *Water Sci. Technol.*, **38**, 233–238.
163. Weisburger J.H., 2002. Comments on the history and importance of aromatic and heterocyclic amines in public health. *Mutat. Res.*, **506–507**, 9–20.

164. White N.A. y Boddy L., 1992. Extracellular enzyme localization during interspecific fungal interactions. *FEMS Microbiol. Lett.*, **98**, 75–79.
165. Xu Y. y Leburn R.E., 1999. Treatment of textile dye plant effluent by nanofiltration membrane. *Separ. Sci. Technol.*, **34**, 2501–2519
166. Yang G., He Y., Cai Z., Zhao X., Wang L. y Wang L.;, 2011. Isolation and characterization of *Pseudomonas putida* WLY for reactive brilliant red x-3b decolorization. *Afr. J. Biotechnol.*, **10**, 10456-10464.
167. Yang Y., Wyatt D.T. y Bahorski M., 1998. Decolorization of dyes using UV/H₂O₂ photochemical oxidation. *Text. Chem. Color*, **30**, 27–35.
168. Yatome C., Ogawa T., Hishida H. y Taguchi T., 1990. Degradation of azo dyes by cell-free extract from *Pseudomonas stutzeri*. *J. Soc. Dyers Colour.*, **106**, 280–283.
169. Yesilada O., Cing S., Birhanli E., Apohan E., Asma D. y Kuru F., 2010. The evaluation of pre-grown mycelial pellets in decolorization of textile dyes during repeated batch process. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 33–39.
170. Yu J., Wang X. y Yue P.L., 2001. Optimal decolorization and kinetic modeling of synthetic dyes by *Pseudomonas* strains. *Water Res.*, **35**, 3579–3586.
171. Zhang F. y Yu J., 2000. Decolourisation of acid violet 7 with complex pellets of white rot fungus and activated carbon. *Bioprocess. Biosyst. Eng.*, **23**, 295–301.
172. Zhang S.J., Yang M., Yang Q.X., Zhang Y., Xin B.P. y Pan F., 2003. Biosorption of reactive dyes by the mycelium pellets of a new isolate of *Penicillium oxalicum*. *Biotechnol. Lett.*, **25**, 1479-1482.
173. Zhou Q., 2001. Chemical pollution and transport of organic dyes in water–soil–crop systems of the chinese coast. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **66**, 784–793.