



**EVALUACIÓN DE LA INMOVILIZACIÓN DE *Trametes versicolor* DSM
3086 EN ESTROPAJO COMÚN (*Luffa cylindrica*)**

**Paula Daniela Chaparro Bustos
Daniela Gómez Perdomo**

**Universidad El Bosque
Facultad de Ingeniería
Programa Ingeniería Ambiental
Bogotá, 24 de octubre de 2018**

**EVALUACIÓN DE LA INMOVILIZACIÓN DE *Trametes versicolor* DSM
3086 EN ESTROPAJO COMÚN (*Luffa cylindrica*)**

Paula Daniela Chaparro Bustos

Daniela Gómez Perdomo

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Ingeniero Ambiental

Directora:

Carel Elizabeth Carvajal Arias

Codirector:

Möritz Velásquez Riaño

Línea de Investigación:

Saneamiento Básico

Universidad El Bosque

Facultad de Ingeniería

Programa Ingeniería Ambiental

Bogotá, Colombia

2018

“La Universidad El Bosque, no se responsabiliza de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.

Dedicatoria

Este proyecto de grado se lo dedico a Dios que me guió en los momentos en que dude o me sentí perdida, ayudándome a esclarecer ideas y tener fortaleza en los momentos difíciles. También quiero dedicárselo a mi mamá Claudia y mi mejor amiga Camila, las cuales siempre estuvieron dándome su apoyo incondicional, palabras alentadoras cuando más las necesitaba y confiando en mí y en mis capacidades sin dudar ni un solo segundo. Las llevo en mi corazón. Gracias por todo.

-Paula Daniela Chaparro Bustos

Quiero dedicar este trabajo de grado a Dios, quién fue mi roca y fortaleza en los momentos de mayor dificultad , estrés y ansiedad, siendo quién siempre me recordó por medio de su Palabra que debía esforzarme y ser valiente para superar cada una de estas pruebas. Además les dedico este proyecto a mis padres Sandra y Carlos quienes siempre han estado allí apoyándome, dándome guía y dirección en cada una de las etapas que pase a lo largo de este camino. Los amo con toda mi alma. Nada habría sido posible sin ustedes.

-Daniela Gómez Perdomo

Agradecimientos

Queremos agradecer a los profesores Carel Carvajal Arias y Möritz Velásquez Riaño quienes contribuyeron al desarrollo de este proyecto de investigación ya que sin su dirección, tiempo, paciencia y esfuerzo, no habría sido posible lograr los objetivos de este trabajo y asimismo por otorgarnos parte de su conocimiento que nos permitieron crecer en gran manera no sólo como Ingenieras Ambientales sino como seres humanos.

También, agradecemos a Zandy Castellanos, Carolina Casanova y demás auxiliares de laboratorio por su ayuda para llevar acabo las pruebas experimentales de este trabajo de grado. Por último, agradecemos a la profesora Carolina Angulo Orozco del departamento LEA, quien nos brindó parte de su tiempo y dedicación para completar detalles ortográficos y de redacción con el fin de obtener un documento de mayor calidad

Tabla de Contenido

1. Introducción	1
2. Planteamiento del problema y pregunta de investigación	2
3. Justificación	3
4. Objetivos	4
4.1. Objetivo General	4
4.2. Objetivos Específicos.....	4
5. Marco de referencia	5
5.1. Marco de Antecedentes	5
5.2. Estado del arte	5
5.3. Marco Teórico y Conceptual	8
5.3.1. Análisis de Varianza (ANOVA)	8
5.3.2. Biomasa fúngica	8
5.3.3. Biorreactor	8
5.3.4. Control abiótico.....	8
5.3.5. Inmovilización.....	9
5.3.6. Matriz de Comparación cualitativa	9
5.3.7. Soportes de inmovilización de <i>Trametes versicolor</i> DSM 3086	9
5.3.8. Parámetros fisicoquímicos	10
5.3.9. Pellets	10
5.3.10. <i>Trametes versicolor</i>	10
5.3.11. Vinaza.....	11
5.4. Marco geográfico	12
5.5. Marco normativo	12
6. Metodología	14
6.1. Diseño metodológico	14
6.2. Plan de Trabajo	17
6.2.1. Metodología objetivo específico 4.2.1	17
6.2.2 Metodología objetivo específico 4.2.2	18
6.2.3. Metodología objetivo específico 4.2.3	21
7. Resultados y análisis de resultados	24
7.1. Resultados y análisis objetivo específico 4.2.1	24

7.1.1 Propagación de <i>Trametes versicolor</i> DSM 3086.....	24
7.1.2. Inmovilización del hongo en 4 sustratos en caldo PD	25
7.2. Resultados y análisis objetivo específico 4.2.2	31
7.2.1. Producción de biomasa	31
7.2.2. Comparación de biomasa inmovilizada experimentalmente con biomasa inmovilizada reportada.....	34
7.3. Resultados y análisis objetivo específico 4.2.3	36
7.3.1. Caracterización de vinaza pura, vinaza diluida al 60%	36
7.3.2. Ensayos de degradación de vinaza con concentración óptima.....	39
8. Conclusiones.....	41
9. Recomendaciones.....	42
10. Bibliografía.....	43

Lista de Tablas

Tabla 1. Diseño metodológico.....	14
Tabla 2. Tabla metodológica.....	15
Tabla 3. Composición fisicoquímica de la vinaza empleada en la investigación	21
Tabla 4. Visualización de adherencia de <i>T. versicolor</i> DSM 3086 a bioportadores	25
Tabla 5. Biomasa inmovilizada de <i>T. versicolor</i> DSM 2086 en soportes y sin soporte.....	32
Tabla 6. Matriz de Comparación de biomasa inmovilizada experimentalmente y reportada en la literatura	34
Tabla 7. Valores de cada parámetro según concentración de la vinaza	36

Lista de Figuras

Figura 1. Fotografía de <i>T. versicolor</i> DSM 3086 cultivado en agar Extracto de Malta (A: vista superior del hongo y B: envés del hongo en la caja de petri).....	24
Figura 2. Curva de crecimiento del hongo <i>T. versicolor</i> DSM 3086 cultivado en agar Extracto de Malta durante 7 días a 28° C.....	24
Figura 3. Fotografía de <i>T. versicolor</i> DSM 3086 inmovilizado en Estropajo (<i>Luffa cylindrica</i>)	26
Figura 4. Fotografía de <i>T. versicolor</i> DSM 3086 inmovilizado en Espuma de poliuretano	26
Figura 5. Fotografía de <i>T. versicolor</i> DSM 3086 inmovilizado en Fique.....	27
Figura 6. Fotografía de la inmovilización de <i>T. versicolor</i> DSM 3086 en estropajo (T1) por un período de 7 días a 26.5 C.....	28
Figura 7. Fotografía de la inmovilización de <i>T. versicolor</i> DSM 3086 en fique (T2) por un período de 7 días a 26.5° C.....	29
Figura 8. Fotografía de la inmovilización de <i>T. versicolor</i> DSM 3086 en espuma de poliuretano por un período de 7 días a 26.5° C.	29
Figura 9. Fotografía de la inmovilización de <i>T. versicolor</i> DSM 3086 en espuma de poliuretano con imán dentro (T3) (A: sustrato espuma flotante en caldo PD y B: sustrato espuma colonizado por el hongo <i>T. versicolor</i> DSM 3086 con discos de agar en caldo PD)	30
Figura 10. Fotografía de la inmovilización de <i>T. versicolor</i> DSM 3086 en madera (T4) (A: sustrato madera flotante en caldo PD y B: sustrato madera disuelto y pellets del hongo <i>T. versicolor</i> DSM 3086 en caldo PD) por un período de 7 días a 26.5° C.	30
Figura 11. Comparación de medias de biomasa inmovilizada seca en estropajo, espuma de poliuretano, fique y control positivo de inóculo	33

Resumen

Con el paso del tiempo los tratamientos biológicos como la biorremediación se han convertido en una excelente alternativa para la remoción de contaminantes presentes ya sean en el suelo, aire y/o agua. Los hongos de podredumbre blanca poseen una exitosa remoción de contaminantes gracias a sus actividades enzimáticas, como la degradación de la lignina presente en materiales de procedencia natural. Las industrias tienen como subproductos vertimientos, los cuales en el ecosistema acuático generan un gran impacto ambiental, por consiguiente, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la inmovilización de *Trametes versicolor* DSM 3086 en estropajo común (*Luffa cylindrica*) con el fin de emplearla en procesos de biorremediación. Para esto se llevó a cabo una metodología de inmovilización con un hongo de podredumbre blanca, la cual consistió en la comprobación de esta misma en diferentes soportes como el estropajo, el fique y la espuma de poliuretano. Como segundo paso se determinó la biomasa producida en cada una de las inmovilizaciones y comparadas con los reportes de la literatura y como tercer paso se propuso un tratamiento preliminar para la degradación de vinaza mediante la inmovilización de *Trametes versicolor* DSM 3086. Los tres soportes resultaron efectivos. Sin embargo, el bioportador con mayor capacidad de retención de biomasa frente a los otros dos y a los reportes comparados fue el estropajo, por lo cual se puede concluir que sus características físicas y químicas le atribuyen mayor capacidad de colonización que los demás soportes. Por otro lado, para conseguir una degradación de contaminantes a través de este método es necesario realizar una estandarización exhaustiva de las condiciones de tratamiento para que logre ser implementado exitosamente.

Palabras Clave: Inmovilización, *Trametes versicolor*, biorremediación, soporte, biomasa.

Abstract

Over time, biological treatments such as bioremediation have become an excellent alternative for the removal of contaminants present in the soil, air, and/or water. White rot fungi possess successful contaminant removal qualities thanks to their enzymatic activities, such as the degradation of lignin present in naturally occurring materials. The industry generates dumpings as a byproduct, which, in the aquatic ecosystem, has a major environmental impact. Therefore, this study's objective was to evaluate the immobilization of *Trametes versicolor* DSM 3086 in commercial luffa gourd (*Luffa cylindrica*) for the purpose of utilizing it in bioremediation processes. Therefore, an immobilization methodology was conducted with a white rot fungus, which consisted of testing said methodology against different bases such as the luffa gourd, agave and polyurethane foam. As a second step, the biomass produced in each of the immobilizations was identified and compared with scientific literature reports. As a third step, a preliminary treatment was proposed for the degradation of vinasse through the immobilization of *Trametes versicolor* DSM 3086. The three bases proved to be effective. However, as opposed to the other two bases and the compared reports, the bio-carrier with the greatest biomass retention capacity was the luffa gourd. Thus, it can be concluded that its physical and chemical characteristics give it greater colonization capacity than other bases. On the other hand, in order to achieve the successful implementation of contaminant degradation through this method, it is necessary to carry out an exhaustive standardization of the treatment conditions.

Keywords: Immobilization, *Trametes versicolor*, bioremediation, bases, biomass.

1. Introducción

Los residuos líquidos industriales, generalmente vertidos a cuerpos de agua, representan un grave problema a nivel ambiental debido a que tienen la capacidad de modificar las características fisicoquímicas del agua, como el pH, la turbidez, el color, entre otros parámetros. Un ejemplo de ello es cuando el agua se torna muy turbia, impide la fotosíntesis de las plantas acuáticas y consume con bastante facilidad el oxígeno disuelto con el fin de acelerar la descomposición, generando la mortandad de la fauna marina. También la alta carga de nutrientes que generalmente componen estos vertimientos produce eutrofización, lo cual implica la disminución del espejo de agua por el aumento de flora flotante y la abundante dispersión de malos olores, esto solo por mencionar algunos de los impactos que traen estos aspectos sobre el ambiente (Vargas Naranjo, 2014).

Es por esto que se ha suscitado la necesidad de tratar estos efluentes con el fin de disminuir los impactos ambientales de las actividades industriales, ya sea con técnicas físicas, químicas y biológicas. Una de las técnicas más eficientes y económicas para el tratamiento de residuos sólidos y líquidos es la biorremediación o tratamiento biológico, rama de la biotecnología. La biorremediación tiene como fin la mitigación de los efectos nocivos causados por contaminantes ambientales con el uso de microorganismos como bacterias, hongos y levaduras, o bien enzimas de estos (Alegría, 2013).

Una de las técnicas que ha comprobado ser eficiente a bajo costo es la inmovilización de hongos ligninolíticos para la biodegradación de aguas residuales industriales (Fernández et al., 2009). La inmovilización de un microorganismo está definida como una forma de atrapamiento o adhesión celular a diferentes superficies o incluso a otros microorganismos, debido a estructuras celulares o sustancias que este mismo segrega (Garzón & Barragán, 2008). Además, el uso de células inmovilizadas permite la operación de biorreactores a velocidades de flujo que son independientes de la velocidad de crecimiento empleadas y la estabilidad catalítica puede ser mayor en células inmovilizadas que en células libres, permitiendo que algunos microorganismos inmovilizados sean más tolerantes a concentraciones altas de contaminantes que aquellos que no están inmovilizados (Garzón & Barragán, 2008).

Por consiguiente, en el presente estudio se realizaron pruebas de inmovilización del hongo *Trametes versicolor* DSM 3086 en estropajo (*Luffa cylindrica*), donde se comprobó si la cepa utilizada es más eficiente en términos de biomasa que otras sepas reportadas y se evaluó si es posible que este método sea implementado posteriormente en procesos de biorremediación de vinaza.

2. Planteamiento del problema y pregunta de investigación

Según el Decreto 475 de 1998, se denomina contaminación del agua a la alteración de las características organolépticas, físicas, químicas, radiactivas y microbiológicas, como resultado de las actividades humanas o procesos naturales que producen rechazo o enfermedad al consumidor. La contaminación hídrica es generada por vertimientos de origen doméstico, industrial o agrícola, derrames de toda clase de materiales, lo que provoca una degradación de las aguas y modifica sus características fisicoquímicas (Ministerio de Salud, 1998).

Los principales agentes contaminantes del recurso hídrico son los agentes patógenos, los desechos que requieren oxígeno, las sustancias químicas orgánicas e inorgánicas, los sedimentos o la materia suspendida y las sustancias radiactivas (Méndez, 2013). La inadecuada gestión de estos vertimientos a los ecosistemas acuáticos trae consigo efectos adversos como la degradación del paisaje, la eutrofización y la reducción de la concentración del oxígeno disuelto en los cuerpos hídricos, lo que genera condiciones anóxicas que afectan organismos a diferentes niveles tróficos perjudicando las actividades comerciales de las poblaciones aledañas, el acceso del agua para uso doméstico y agrícola y la calidad de vida de las comunidades contiguas al río (Zúñiga & Gandini, 2013).

A raíz de esta problemática la comunidad científica se ha preocupado por desarrollar técnicas no convencionales, empleando la biotecnología, que permitan el tratamiento de aguas contaminadas de forma eficaz y económica, dirigidas especialmente a las industrias o agroindustrias. La biotecnología es una ciencia que se dedica al uso de organismos vivos o compuestos obtenidos de estos para obtener productos y ponerlos a disposición de los seres humanos (Grupo Sacsá, 2016). Es por medio de esta ciencia que surge la biorremediación, la cual estudia el potencial de los microorganismos para biodegradar contaminantes (Alegría, 2013). Una de las técnicas para biorremediar aguas contaminadas que ha demostrado ser eficiente a bajo costo es la inmovilización de hongos ligninolíticos en soportes ya sea orgánicos e inorgánicos en sustratos líquidos, por la capacidad de estos hongos de degradar compuestos contaminantes como vinaza y colorantes a través de enzimas ligninocelulolíticas (Lacasa, Peroxidasa y Manganese-peroxidasa) capaces de biodegradarlos (Tapie, 2015).

De este modo el cuestionamiento que guía la siguiente investigación es: ¿Qué limitantes inciden en el óptimo funcionamiento de la inmovilización de *Trametes versicolor* DSM 3086 en estropajo común (*Luffa cylindrica*) con el fin de emplearla en procesos de biorremediación?

3. Justificación

Con el fin de resolver la problemática de contaminación hídrica por efluentes industriales que se presenta en Colombia, se evaluó un tratamiento biológico alternativo en condiciones aerobias con el hongo *Trametes versicolor* DSM 3086, mediante una técnica de biorremediación, denominada inmovilización de microorganismos. Esta es una tecnología que permite solucionar problemas ambientales con el uso de hongos, bacterias y levaduras, siendo una estrategia de gestión ambiental orientada a prevenir y mitigar problemas de carácter ambiental. De igual forma, la biorremediación es una técnica eficiente que requiere de una menor inversión económica, menor tiempo de operación y no posee un impacto negativo en el ambiente.

La inmovilización del hongo de podredumbre blanca *Trametes versicolor* DSM 3086 en estropajo común (*Luffa cylindrica*), requirió del desarrollo de una metodología experimental en la cual se realizaron pruebas para evaluar la efectividad de la cepa empleada, en vista de que esta no ha sido utilizada anteriormente en soportes de colonización. El éxito de este método supone un aporte a la Ingeniería Ambiental, dado que este protocolo de degradación puede llegar a ser implementado a futuros diseños de infraestructura sanitaria en industrias, resolviendo así el impacto que estos procesos productivos pueden generar sobre el ambiente de forma económica y a su vez contribuyendo a la protección de los recursos naturales y la calidad de vida de las generaciones futuras. Lo planteado, se atribuye al cumplimiento del sexto objetivo del desarrollo sostenible, el cual tiene como meta garantizar agua limpia y saneamiento para las comunidades. Por este motivo se realizaron ensayos de biodegradación de vinaza proveniente de ingenios no reportados anteriormente para evaluar la eficiencia del método.

4. Objetivos

4.1. Objetivo General

Evaluar la inmovilización de *Trametes versicolor* DSM 3086 en estropajo común (*Luffa cylindrica*) con el fin de emplearla en procesos de biorremediación.

4.2. Objetivos Específicos

4.2.1. Comprobar la inmovilización del hongo *Trametes versicolor* DSM 3086 en el soporte experimental (estropajo común), mediante un análisis macroscópico.

4.2.2. Determinar la biomasa producida por *Trametes versicolor* DSM 3086 en el soporte experimental (estropajo común) para compararlo con reportes de la literatura de otras cepas de *Trametes versicolor*.

4.2.3. Proponer un tratamiento preliminar de degradación de vinaza con el hongo *Trametes versicolor* DSM 3086 en el soporte experimental, estropajo común (*Luffa cylindrica*).

5. Marco de referencia

5.1. Marco de Antecedentes

La biotecnología hace referencia al procesamiento de materiales por medio de agentes biológicos como bacterias, levaduras, hongos, entre otros. En Latinoamérica desde 6000 a.C., inició la historia de la biotecnología. Sin embargo, se han presentado diferentes eras de biotecnología. La primera se basaba en los procesos de fermentación por parte de la actividad microbiana. La segunda se dio después de la Primera Guerra Mundial y se centró en la producción de glicerol, la acetona y antibióticos. La tercera enfatizó más en los medicamentos. Por último, la cuarta era le abrió las puertas a la ingeniería genética (PQBio, 2018).

La biorremediación, es una rama de la biotecnología que se implementa en procesos de biodegradación de los contaminantes que impiden la conservación de los recursos naturales. Teniendo en cuenta esto, se trabajó con uno de los métodos de biorremediación, como lo es la inmovilización de microorganismos en soportes, la cual se viene desarrollando alrededor de 30 años y debido a su atractivo y eficiente remoción de contaminantes, se han llevado a cabo trabajos de grado de universidades y artículos de revistas científicas con óptimos resultados en degradación de efluentes contaminados por medio de este método. Por lo que la idea de investigación surgió a partir de los temas tratados en clases de microbiología y en el semillero de Calidad del Agua y Ecología Microbiana.

5.2. Estado del arte

Se han reportado varios estudios con base a la inmovilización de los hongos de podredumbre blanca, con el fin de lograr la biorremediación de aguas contaminadas. En estos estudios se han reportado resultados favorables en cuanto a los valores de reducción de los parámetros más significativos por parte del hongo *Trametes versicolor*, como el color, la DQO, entre otros. Por otro lado, la inmovilización de la biomasa fúngica también ha presentado resultados óptimos en la reducción de los contaminantes. Estos antecedentes se han reportado a nivel internacional y nacional, los cuales han mostrado similitud en sus resultados.

Velásquez et al. (2018) evaluaron un tratamiento mixto de degradación de vinaza utilizando *Komagataeibacter kakiaceti* GM5 y *Trametes versicolor* DSM 3086. Este nació a partir de la problemática ambiental generada por la disposición inadecuada de las vinazas derivadas de la industria del bioetanol. Los ensayos se realizaron utilizando medios de cultivo experimental de vinaza al 60% (v/v), el cual fue comparado con un medio estándar de glucosa al 2% utilizando simultáneamente un cultivo de la bacteria y el hongo por medio de un proceso de lites en agitador orbital. El tratamiento mixto arrojó los mejores resultados de DQO en la degradación de vinaza. A pesar de que el tratamiento no mejoró por completo todos los parámetros evaluados, no disminuyó en ningún momento su rendimiento por lo que no se descarta como una alternativa biológica innovadora para el tratamiento de contaminantes.

Pereira et al. (2017) realizaron una investigación sobre el uso del estropajo común como soporte para procesos de adsorción e inmovilización que aportan soluciones a problemas de remoción de contaminantes y del tratamiento del agua. Esta revisión analizó 57 artículos, de los cuales hicieron

énfasis en los rasgos botánicos, estructurales y mecánicos, de las propiedades adsorbentes y su eficiencia en cuanto a la inmovilización de microorganismos; los cuales llegaron a la conclusión de que la *Luffa cylindrica* posee las propiedades necesarias para permitir el crecimiento de las comunidades microbianas y la remoción de las sustancias contaminantes.

En la ciudad de Santiago de Cuba, Cuba se realizó un estudio de determinación de biomasa fúngica y su utilidad en procesos biotecnológicos. En esta investigación se comparó el crecimiento de las cepas *Pleurotus ostreatus* y *Trametes sp.* en fermentación sumergida (FS) y en fermentación en medio sólido (FES) con el fin obtener productos o metabolitos de interés. La comparación se realizó por medio de métodos gravimétrico y espectrofotométrico. Los resultados obtenidos con respecto a biomasa en FS fueron de $1,38 \pm 0,01$ g/L y $0,40 \pm 0,02$ g/L de biomasa seca para *Trametes sp.* y *Pleurotus sp.*, después de 12 días de cultivo. En cuanto a la FES se mostró mayor crecimiento con valores de 300,5 mg/g de biomasa seca. Según Rodríguez et al. (2017), estos resultados evidencian una correlación entre la concentración de biomasa determinada por gravimetría y la concentración de quitina, permitiendo el seguimiento óptimo del crecimiento fúngico.

En Caracas, Venezuela, Cano et al. (2012) desarrollaron un artículo basado en la decoloración del tinte Café Directo 2 mediante extractos crudos de enzimas intracelulares, extracelulares y la biomasa de *Trametes versicolor*, el cual fue cultivado en medio líquido con inductores metálicos. En el procedimiento experimental se colocaron los extractos enzimáticos y la biomasa fúngica en tubos de ensayo junto con el colorante en agitación por 24 horas a 30° C. Obtuvieron como resultado la decoloración en un tiempo significativo de 3 horas con respecto a la biomasa fúngica. Aunque, las enzimas intra y extracelulares también resultaron efectivas en la decoloración del tinte.

Un estudio elaborado por Saetang y Babel en el año 2009 consistió en el tratamiento de los lixiviados de un vertedero de Nonthaburi, Tailandia, como experimento en una columna con el hongo de podredumbre blanca *Trametes versicolor* inmovilizado en espuma de poliuretano. Con los lixiviados diluidos, lograron la obtención de un pH óptimo de 4, el hongo alcanzó una decoloración del 78% y 63% y una reducción de la DQO y DBO de 42% y 52%. Al diluir los lixiviados se observó una mayor eficiencia de eliminación del contaminante debido a la reducción de la carga orgánica y al uso de glucosa como cosustrato.

El trabajo de grado de Córdoba y Ospina (2009) se basó en la selección y evaluación de un consorcio fúngico inmovilizado sobre *Furcraea sp.*, para el tratamiento de aguas residuales de la industria textil. En el cual realizaron pruebas de decoloración en medio sólido llamado Rhada, celulosa como cosustrato y fibra de fique como fuente de carbono para favorecer el proceso de decoloración. No obstante, los resultados más característicos y eficientes fueron el empleo del agua residual al 100% sin uso de cosustratos de carbono y nitrógeno, así lograron conseguir una decoloración del 99% y la disminución de la DQO del 75%.

Rossana Garzón en la Pontificia Universidad Javeriana en el año 2009 realizó una investigación sobre la inmovilización de diferentes hongos de podredumbre blanca en fique para la degradación de diversos colorantes. El proceso de colonización del soporte experimental, en medio líquido de extracto de salvado de trigo se realizó a 30° C y 120 rpm. El tratamiento duró 15 días con todos los

microorganismos y como resultados se obtuvieron excelentes resultados por parte de *T. versicolor* con remociones del 80%, comprando la efectividad del tratamiento.

Fernández et al en el año 2009, inmovilizaron hongos ligninolíticos para remover colorante negro reactivo 5, ya que la presencia de este tipo de colorante azoicos en aguas residuales de la industria textil son un problema ambiental y sanitario por ser potenciales carcinógenos. Para su desarrollo se evaluó el efecto de tres hongos, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete chrysosporium* sobre la decoloración de agua con colorante reactivo 5. La inmovilización se realizó en dos soportes, estropajo y espuma de poliuretano con el fin de seleccionar el mejor soporte y el hongo con mayor capacidad de biodegradación. Como resultados, Fernández et al. (2009) reportan que los dos sustratos empleados son igual de efectivos y que el hongo que produjo los mayores niveles de decoloración fue *T. versicolor* con un 98%.

El estudio realizado en Bogotá, Colombia en la Pontificia Universidad Javeriana en el año 2008 por Nataly Moreno, Ximena Ospina denominado “Evaluación de Inductores metálicos y cosustratos para la remoción de Negro Reactivo 5 empleando *Pleurotus ostreatus* inmovilizado en fique”. En este estudio se evaluó la inducción de enzimas ligninolíticas buscando obtener una mayor remoción del Negro Reactivo 5 a 150 ppm. Se determinó que la decoloración fue en un 96% probando su efectividad con respecto al uso de los diferentes cosustratos y la combinación de los inductores metálicos con una concentración máxima y una mínima, todo esto al cabo de 4 días. Posteriormente, se realizó la curva de remoción durante 8 días con parámetros y condiciones óptimas con un tiempo de retención de 24 horas, logrando una decoloración del 97%. Por último, se realizó un barrido UV-VIS el cual logró degradar la molécula del reactivo por acción enzimática, de esta manera se concluyó que los parámetros lograron biotransformar el colorante.

Garzón & Barragán (2008) de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas de la Ciudad de México, México, realizaron una investigación de inmovilización microbiana y sus técnicas y usos en el tratamiento de residuos tóxicos, puesto que su disposición inadecuada ha generado grandes impactos sobre el medio ambiente. Por lo que hace una revisión como la aplicación de microorganismos para este tipo de tratamientos, resultando que presentan ciertas ventajas como una mayor resistencia a altas concentraciones de compuestos tóxicos, incremento de la actividad catalítica y la formación de microambientes necesarios para la degradación de compuestos recalcitrantes.

Rodríguez et al. (2003) estudiaron la decoloración de los residuos líquidos generados en los procesos de destilería como la vinaza y extracto líquido de pulpa de café, mediante un cultivo del hongo de podredumbre blanca *Pleurotus spp* sumergido en los contaminantes. En el procedimiento se inoculó el hongo en cajas de Petri que contenían un medio sintético con los residuos de la vinaza y el extracto de pulpa a diferentes concentraciones. Luego en varios erlenmeyer añadieron los residuos líquidos junto con el hongo y se pusieron en agitación a 150 rpm y 27° C. Al final del estudio se evidenció que el tratamiento logró ser efectivo en cuanto a la reducción de la DQO y el color de los contaminantes.

González et al. (1994) realizaron un estudio a través del cual se evaluó la eliminación del color de los vertimientos generados en el proceso de la fermentación de las melazas sin ningún tipo de tratamiento posterior a la recolección, por medio de la inmovilización del hongo *Trametes versicolor* en alginato cálcico y como cosustratos la sacarosa y el nitrato amónico. Este estudio fue

llevado a cabo en matraces agitados y en un reactor de burbuja, logrando obtener como resultado una decoloración del 73% y una disminución de la DQO del 50%.

5.3. Marco Teórico y Conceptual

5.3.1. Análisis de Varianza (ANOVA)

El análisis de varianza ANOVA es un método de modelado lineal para comprobar si las medias de más de dos poblaciones son diferentes (Pérez J. L., 2012). Las pruebas ANOVA comparan la varianza explicada (provocada por los campos de entrada) con la varianza no explicada (provocada por el origen del error), si la proporción de la varianza explicada con la varianza no explicada es alta, las medias son estadísticamente diferentes (IBM, 2018).

Para el adecuado análisis se debe tener en cuenta que un factor ANOVA es una variable cualitativa que genera una serie de poblaciones a comparar. A estos grupos o poblaciones que un factor delimita se les denomina “niveles de factor”. Estos pueden ser fijos o aleatorios. Fijo es cuando los niveles que se estudian son los únicos niveles que interesan; aleatorio es cuando los niveles que se estudian son una muestra de niveles. Además, dos o más factores pueden estar entre sí, dos a dos, cruzados o anidados, es decir, se combinan con todos los niveles del otro factor (Pérez J. L., 2012).

5.3.2. Biomasa fúngica

La biomasa es materia orgánica originada en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía (APPA, 2018).

Ahora bien, la biomasa fúngica es la materia orgánica generada por el crecimiento de hongos, algunos de estos capaces de degradar lignina y otros que secretan enzimas despolimerizadoras, por lo que este tipo de biomasa está empezando a ser empleada para solucionar problemas generados por efluentes industriales por medio de la biotecnología (García & Martínez, 2014).

5.3.3. Biorreactor

Un Biorreactor es un recipiente o sistema que mantiene un ambiente biológicamente activo. Es un recipiente en el que se lleva a cabo un proceso químico que involucra organismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas de dichos organismos, los cuales pueden ser procesos aeróbicos o anaerobios. Comúnmente son cilíndricos y varían de tamaño desde algunos milímetros hasta metros cúbicos.

Generalmente, los biorreactores buscan mantener condiciones ambientales propicias (pH, T°, concentraciones de oxígeno, etc.) al organismo o sustancia química que se cultiva para así dar un tratamiento adecuado al contaminante de estudio (Mihelcic & Zimmerman, 2012).

5.3.4. Control abiótico

El control abiótico consiste en realizar tratamientos con sus respectivos soportes y contaminantes, pero sin inoculante manteniendo las mismas condiciones de los demás tratamientos, es decir, la misma temperatura y agitación; quedando sometido a condiciones físicas más no biológicas con el fin de determinar si era necesaria la presencia de un microorganismo para el tratamiento de un contaminante en específico (Méendez, 2013). Anexo 1.

5.3.5. Inmovilización

La inmovilización de células y enzimas se refiere a la confinación o localización de estas en un espacio determinado reteniendo sus propiedades y actividades catalíticas (Fajardo et al., 2011). Consiste en la fijación de este a una superficie o sustrato sin degradarlo (Fernández et al., 2009).

5.3.6. Matriz de Comparación cualitativa

Una matriz comparativa es una tabla de doble entrada que muestra información de una forma resumida y concentrada a través de columnas y filas y sirve principalmente para comparar las características de objetos de la misma categoría, por ejemplo modelos curriculares, teorías del aprendizaje, etc (Pérez M. , 2018).

5.3.7. Soportes de inmovilización de *Trametes versicolor* DSM 3086

5.3.7.1. Espuma de poliuretano

La espuma de poliuretano es un material plástico poroso formado por una agregación de burbujas. Permiten la inmovilización de microorganismos por adsorción. La espuma de poliuretano ha adquirido gran relevancia como soporte sólido para biofiltros debido a que es un material inerte con buenas propiedades mecánicas, alta porosidad (>95%), elevada superficie específica, grandes posibilidades para el escalamiento a nivel planta piloto e industrial y muy bajo coste. Ya ha sido probado con éxito en la eliminación de metanol, tolueno (Martín Ramírez, 2017).

Además, se ha comprobado que es capaz de inmovilizar el hongo *Trametes versicolor* y ser muy eficiente para la degradación de colorante reactivo 5, por lo que se ha seleccionado en este estudio como soporte de control (Fernández et al., 2009). Anexo 1.

5.3.7.2. Estropajo (*Luffa cylindrica*)

Esta planta es miembro de la familia de las cucurbitáceas en las que se reconocen siete especies del género *Luffa*. En su mesocarpio se forma una intrincada retícula fibrosa constituida por lignocelulosa que es la parte típicamente útil de la planta. El estropajo es una importante planta que provee de alternativas de aplicación diversas en salud y que plantea promisorias utilidades en la tecnología de los materiales (Pereira-Martinez et al., 2017).

El estropajo es el soporte experimental de este estudio, ya que según el artículo de investigación “Inmovilización de hongos ligninolíticos para la remoción del colorante negro reactivo 5” de la Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá, Colombia, se comprueba que el estropajo es el mejor soporte de inmovilización por ser un producto natural y muy efectivo con el hongo *Trametes versicolor* logrando porcentajes de decoloración del 97% de en promedio de colorante reactivo 5 (Fernández et al., 2009). Anexo 1.

5.3.7.3. *Fique*

Furcraea bedinghausii, pertenece a la familia botánica *Agavaceae*. Se les conoce con el nombre común de agave, pita, maguey, cabuya, fique, mezcal. Actualmente se reconocen más de 200 especies pertenecientes a este género con gran diversidad en colores, tamaños, etc.

Este tipo de plantas forman una roseta de hojas gruesas y carnosas, generalmente terminadas en una afilada aguja en el ápice y, algunas presentan márgenes espinosos. Presentan un tallo robusto generalmente corto dando la apariencia de que las hojas surgen de la raíz.

De esta planta se producen fibras largas, duras que resultan muy importantes para la producción de cordeles, empaques, textiles, etc. Se trata de una fibra biodegradable que al descomponerse es utilizada como alimento y abono; además no contamina el agua y es bastante empleada en procesos de producción más limpia (Gravenhorst, 2013). Anexo 1.

5.3.8. *Parámetros fisicoquímicos*

Las muestras que necesitan de un tratamiento preliminar requieren de una caracterización previa, las cuales normalmente generan información sobre el contenido de dichas sustancias. Existe una gran variedad de parámetros. No obstante, los que se analizaron en el presente estudio fueron el pH, la turbidez, el color y la DQO. El pH es un parámetro físico que permite conocer la acidez de una muestra. La turbidez permite conocer la presencia de material suspendido en una sustancia. El color es una característica óptica que permite percibir la existencia de material disuelto. Por último, la DQO es el parámetro que cuantifica la cantidad de oxígeno requerido para degradar la materia orgánica presente en ella (Jimenez, 2000).

5.3.9. *Pellets*

Los pellets hacen referencia a los gránulos de diferentes tamaños de biomasa fúngica que se forman en medio líquido al estar frente a condiciones de agitación.

5.3.10. *Trametes versicolor*

Trametes versicolor es un hongo *Basidiomycota*, se distingue por poseer un cuerpo fructífero (Basidiocarpio pileado) con sistemas de hifas, esporas lisas no dextrinoides, sécil color blanco, coriáceo y fibroso. Presenta, además, un himenio formado por poros redondeados, un píleo delgado con zonas multicolores y líneas concéntricas de color blanco, amarillo, crema, ocre, gris, café, negro y azul en diferentes tonalidades; que puede alcanzar hasta los 10 cm de ancho, 5 cm de radio con un borde irregular y ondulado. Microscópicamente presenta esporas sólidas, hifas hialinas y de pared delgada (Jung, 1999; Velásquez et al., 2018).

Este hongo se caracteriza por ser de podredumbre blanca, característica de los microorganismos capaces de descomponer materia orgánica por la acción de sus enzimas extracelulares como oxidoreductasas, que convierten los polímeros en azúcares fermentables. Generalmente se encuentra en superficies del suelo y residuos vegetales (Steffen et al., 2000; Velásquez et al., 2018).

Se ha comprobado que el hongo *Trametes versicolor* inmovilizado en soporte de estropajo y espuma de poliuretano es más efectivo con respecto a otros hongos, logrando degradaciones de color de 97% en promedio para colorante reactivo 5 (Fernández et al., 2009). Además, se ha demostrado que es capaz de degradar vinaza efectivamente (Velásquez et al., 2018), siendo este uno de los hongos de podredumbre blanca más efectivos para biorremediación de contaminantes.

La cepa de *Trametes versicolor* DSM 3086 proviene del del Liebniz Institut DSMZ-German Sammlung von Mikroorganismen un Zellkulturen en Braunschweig, Alemania. Este fue muestreado antes del 24 de octubre del año 1894 y conservado en diversos medios (DSMZ, 2018).

5.3.11. Vinaza

La vinaza es uno de los efluentes resultantes de la producción de bioetanol. Se caracteriza por ser un líquido de color marrón, con gran contenido de sólidos suspendidos y materia orgánica, olor a miel y sabor a malta. También presenta un pH bajo, altos valores de DQO y DBO5 y alta turbidez (Zuñiga & Gandini, 2013; Velásquez et al., 2018).

Por sus características, se considera como unos de los vertimientos que impacta negativamente el ambiente, especialmente al recurso hídrico, ya que disminuye la luminosidad de las aguas, la actividad fotosintética y el oxígeno disuelto. Además, produce eutrofización del agua y contribuye al desarrollo de vectores y malos olores (Zuñiga & Gandini, 2013).

Teniendo en cuenta las características mencionadas de la vinaza, los parámetros que se evaluaron en este estudio son: el DQO, turbidez, pH y unidades de color, siendo estas algunas de las que reporta Zuñiga & Gandini (2013).

5.3.11.1. Vinaza como contaminante

La vinaza se encuentra clasificada como agente pululante, hasta 100 veces más que las aguas negras, debido a sus características fisicoquímicas (Freire & Cortez, 2000; Velásquez et al., 2018). Este residuo líquido al ser vertido a un cuerpo hídrico puede ocasionar la proliferación de microorganismos, los cuales tienen alta demanda de oxígeno disuelto lo que genera que los ecosistemas pierdan su equilibrio natural. Esto se da debido a su bajo pH y sus altos valores de DQO Y DBO (Freire & Cortez, 2000; Velásquez et al., 2018). Lo que trae como consecuencia la reducción de la población de la biota acuática y la eutrofización del cuerpo hídrico, facilitando la liberación de malos olores y la proliferación de vectores de enfermedades como la malaria y amebiasis. Además, se limita el uso del recurso hídrico para las poblaciones aledañas a las industrias azucareras (Laime et al., 2011; Velásquez et al., 2018).

Frente a esta situación, los grandes ingenios tanto nacionales como internacionales han buscado alternativas para reutilizar la vinaza como fertilizante de cultivos, pero se ha comprobado que esta puede alterar las características edáficas de los suelos.

Cuando la vinaza se vierte en el suelo, se generan ciertos impactos negativos que varían según el tipo de suelo. Por ejemplo, puede sobrecargar los nutrientes, acidificar, compactar e impermeabilizar los suelos. Asimismo, se ha demostrado que genera contaminación de aguas subterráneas por percolación, desencadenando la transferencia de altas concentraciones de NH₃,

Mg⁺², Al⁺³, Fe⁺², Mn⁺², Cl⁻ y materia orgánica a la capa freática, disminuyendo así la calidad de estos recursos (Piacente, 2005; Velásquez et al., 2018).

Igualmente, es importante resaltar que la vinaza generada a partir de caña de azúcar es una fuente representativa de gases de efecto invernadero (GEI), especialmente CO₂, N₂O y CH₄. Estas se dan principalmente durante el transporte y almacenamiento (Oliveira et al., 2011; Velásquez et al., 2018).

5.4. Marco geográfico

El desarrollo empírico de esta investigación se realizó en el Laboratorio de Química Ambiental perteneciente a la Facultad de Ingeniería Ambiental de la Universidad El Bosque en Bogotá, Colombia.

La vinaza líquida empleada en la parte experimental de la investigación fue ofrecida, como una muestra sin ningún valor comercial, por el área de comercio, logística y distribución del Ingenio Manuelita S.A ubicado en el km 7 vía Palmira-Cerrito en el municipio Palmira del departamento del Valle del Cauca. Por otro lado, también se trabajó con la vinaza proveniente del Ingenio Incauca S.A.S., la cual se consiguió por medio de un empleado de la planta. Este ingenio se encuentra ubicado en la vía El Ortigal, en el municipio Miranda del departamento del Cauca, Colombia. Anexo 2.

5.5. Marco normativo

En el Capítulo 3 de la Constitución Política de Colombia de 1991, realizado por la Asamblea Nacional Constituyente, en el Artículo 79 se afirma:

“Todas las personas tienen derecho a gozar de un ambiente sano. La ley garantizará la participación de la comunidad en las decisiones que puedan afectarlo. Es deber del Estado proteger la diversidad e integridad del ambiente, conservar las áreas de especial importancia ecológica y fomentar la educación para el logro de estos fines”. (Asamblea Nacional Constituyente, 1991).

Esto resulta importante para la presente investigación, ya que se pretende brindar una solución a partir de un método de biorremediación a problemas de contaminación de cuerpos de agua con vertimientos como la vinaza proveniente de la industria azucarera, lo que permitirá el cumplimiento de este deber como industria.

Por lo que se refiere a uso de la biodiversidad para el tratamiento de contaminantes el Congreso de la República promulgó la Ley 165 de 1994 por medio de la cual se aprueba el Convenio sobre la Diversidad Biológica realizado en Río de Janeiro el 5 de junio de 1992, establece la conservación de la diversidad biológica, la utilización sostenible de sus componentes y la participación justa y equitativa de los beneficios que se deriven de los recursos genéticos. Particularmente, en el Artículo 2 se define biotecnología como toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos como la biorremediación de contaminantes (Congreso de Colombia, 1994).

Con esta intención, el Artículo 19 dictamina:

“Las Partes estudiarán la necesidad y las modalidades de un protocolo que establezca procedimientos adecuados, incluido en particular el consentimiento fundamentado previo, en la esfera de la transferencia, manipulación y utilización de cualesquiera organismos vivos modificados resultantes de la biotecnología que puedan tener efectos adversos para la conservación y la utilización sostenible de la diversidad biológica”. (Congreso de Colombia, 1994).

Por lo que en la presente investigación se establecieron protocolos de tratamiento de microorganismos en los ensayos de biorremediación realizados de forma que no se perjudicara la conservación de estos promoviendo su uso sostenible y así con el contaminante empleado.

Con referencia a lo anterior el Ministerio del Medio Ambiente, ahora Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible (MADS), y el Departamento Nacional de Planeación (DNP) con el apoyo del Instituto Humboldt publicaron la Política Nacional de Biodiversidad la cual pretende orientar a largo plazo las estrategias nacionales en cuanto a biodiversidad y sus encargados, y se argumenta que la biodiversidad es de gran importancia por los servicios ambientales que se derivan de esta (MADS & DNP), como el uso de microorganismos para degradar contaminantes que afectan el curso normal de los cuerpos hídricos como la vinaza proveniente de la producción de bioetanol en los ingenios colombianos.

En este orden de ideas es posible citar el Marco Normativo Ambiental del Sector Agroindustrial de la Caña, elaborado por el MADS, del cual se extrajo principalmente la legislación relativa a usos del agua y vertimientos las cuales se mencionan a continuación.

La Ley 9 de 1979, promulgada por el Congreso de la República de Colombia, en el Artículo 2 dicta las normas de protección de la calidad de aguas tanto privadas como públicas, creando el control sanitario de los usos del agua. Estas normas son los puntos de referencia para las caracterizaciones que se deben realizar a las aguas contaminadas con vinaza y otros residuos líquidos industriales.

También, debe tenerse en cuenta el Decreto- Ley 2811 de 1974, promovido por el MADS, dicta el Código Nacional de Recursos Naturales Renovables y de Protección al Medio Ambiente el cual pretende abarcar los factores que deterioran el medio ambiente (Artículo 8), específicamente los que contaminan el agua como lo es la vinaza y otros tipos de vertimientos. Además, el Decreto 3930 de 2010, promulgado por el Presidente de la República, establece las disposiciones relacionadas con los usos del recurso hídrico, el Ordenamiento del Recurso Hídrico y los vertimientos al recurso hídrico, al suelo y a los alcantarillados. Tiene como objeto la reglamentación de los usos y ordenamiento del recurso hídrico y de los vertimientos (a cuerpos de agua, al mar, al suelo -asociado a acuíferos- y al alcantarillado público). Aplica a las Autoridades Ambientales Competentes (AAC), a los generadores de vertimientos y a las personas prestadoras del servicio público domiciliario de alcantarillado, por lo que sus reglamentaciones se tomaron en consideración ya que se trabajó con contaminantes y se debieron establecer protocolos de disposición adecuados.

6. Metodología

6.1. Diseño metodológico

En la Tabla 1, se presenta el enfoque, el alcance, la unidad de análisis y las variables de la presente investigación. Por medio de esta se pretende ilustrar la orientación que tuvo el desarrollo del estudio y que fue la base principal para el desarrollo de esta.

Tabla 1. *Diseño metodológico*

Objetivo general	Evaluar la inmovilización de <i>Trametes versicolor</i> DSM 3086 en estropajo común (<i>Luffa cylindrica</i>) con el fin de emplearla en procesos de biorremediación.		
Enfoque	La investigación tiene un enfoque mixto, dado que posee metodologías estructuradas con las cuales se pretende evaluar la producción de biomasa inmovilizada mediante la preparación, el desarrollo y análisis de los datos. Teniendo en cuenta esta información, en dos de las etapas de la metodología, se obtienen diferentes cifras, lo cual lo convierte en un proyecto medible. Sin embargo, una de las fases se evaluó de forma cualitativa, puesto que se realizó un análisis observacional (Sampieri, 2014).		
Alcance	El alcance del primer objetivo específico es correlacional, puesto que en esta fase del proyecto se pretende conocer el grado de asociación que puede haber entre los diferentes sustratos con el hongo <i>T. versicolor</i> DSM 3086 (Sampieri, 2014).	El segundo objetivo específico presenta un alcance correlacional dado que compara la relación entre dos o más variables (Sampieri, 2014).	En cuanto al tercer objetivo específico, la realización del tratamiento preliminar posee un alcance correlacional, ya que se definen las características a evaluar y se miden con exactitud sobre la unidad de análisis (Sampieri, 2014).
Unidad de análisis	La unidad de análisis con la que se trabajó durante el proyecto es la inmovilización en estropajo (<i>Luffa cylindrica</i>) de <i>T. versicolor</i> DSM 3086, debido a que es esta es la técnica que se desarrolló para verificar la eficiencia de remoción de la vinaza.		
Variables			
Dimensión	Variable	Aspecto	Indicador
Ecológico	<i>T. Versicolor</i> DSM 3086	Capacidad de degradación	Visualización
		Crecimiento	Medición de biomasa
	Vinaza	Concentración	Revisión bibliográfica
		Degradación	DQO, pH, turbidez y unidades de color

Ahora bien, en la Tabla 2, se expresa el resumen del diseño metodológico que se tuvo en cuenta para proponer los protocolos que se debió seguir en cada una de las fases propuestas en los objetivos específicos, los cuales suponen el cumplimiento del objetivo central de la investigación.

Tabla 2. *Tabla metodológica*

Objetivo General	Evaluar la inmovilización de <i>Trametes versicolor</i> DSM 3086 en estropajo común (<i>Luffa cylindrica</i>) con el fin de emplearla en procesos de biorremediación		
Objetivos Específicos	Actividades	Técnicas	Instrumentos
Comprobar la inmovilización del hongo <i>Trametes versicolor</i> DSM 3086 en el soporte experimental (estropajo común) mediante un análisis teórico y macroscópico.	Revisión bibliográfica	Consulta de documentos	Documentos, páginas web, libros
	Definición de técnicas para recolección de información	Análisis documental	Artículos, trabajos de grado
	Limpieza del equipo	Esterilización del material	Autoclave Labconco, alcohol
	Cultivo de hongo	Activación del hongo <i>T. versicolor</i> DSM 3086	Cajas de Petri con el hongo, agar extracto de malta, puntas azules.
	Prueba de inmovilización	Inmovilización del hongo	Erlenmeyer, caldo PD, discos de hongo, sustratos (estropajo, espuma de poliuretano, fique y madera)
	Período de crecimiento	Incubación del hongo	Agitador Incu Shaker 10L Benchmark
	Observación macroscópica	Visualización	Estéreo microscopio Olympus SZ61.
Determinar la biomasa producida por <i>Trametes</i>	Revisión bibliográfica	Consulta de documentos	Documentos, páginas web, libros

<i>versicolor</i> DSM 3086 en el soporte experimental (estropajo común) para compararlo con reportes de la literatura de otras cepas de <i>Trametes versicolor</i> .	Definición de técnicas para recolección de información	Análisis documental	Artículos, trabajos de grado
	Limpieza del equipo	Esterilización del material	Autoclave Labconco, alcohol
	Medición de biomasa húmeda	Filtración y pesaje de biomasa	Embudo, papel filtro, soporte metálico, beaker, balanza analítica, caja de petri
	Medición de biomasa seca	Secado y pesaje	Papel filtro, horno, mortero y balanza analítica
	Comparación de biomasa en soportes con reportes	Cualitativa	Matriz de comparación
	Comparación de biomasa hallada experimentalmente	ANOVA	InfoStat, prueba de Wilcoxon
Proponer un tratamiento preliminar de degradación de vinaza con el hongo <i>Trametes versicolor</i> DSM 3086 en el soporte experimental, estropajo común (<i>Luffa cylindrica</i>).	Revisión bibliográfica	Consultas de documentos	Documentos, páginas web
	Definición de técnicas para recolección de información	Análisis documental	Artículos, trabajos de grado
	Solicitud de material	Proceso de solicitud de servicios de tecnología	Hoja de solicitud de material para prácticas de laboratorio
	Limpieza de equipos	Esterilización del material	Alcohol, horno memmert, jabón neutro

Realización de pruebas de análisis fisicoquímico	Pruebas de pH, cubetas de DQO, turbidez, color	Sartorius, spectroquant TR 420, espectrofotómetro GENESYS 5, turbidímetro HATCH 47001, multiparámetro HANNA
Montaje de los sustratos en el contaminante	Dilución de la vinaza al 60% con discos de hongo y soportes	Vinaza, agua destilada, puntas azules, agujas de inyección, hongo, probeta, erlenmeyer
Período de crecimiento	Incubación de los Erlenmeyer	Incu Shaker 10L Benchmark, tapones.

6.2. Plan de Trabajo

6.2.1. Metodología objetivo específico 4.2.1

6.2.1.1. Propagación de *T. versicolor* DSM 3086

La cepa de *Trametes versicolor* empleada fue DSM 3086 proveniente del Leibniz Institut DSMZ-German Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen en Braunschweig, Alemania, la cual se propagó en Agar Extracto de Malta (Anexo 3), a través de discos de 0,5 cm de diámetro, incubados por 7 días a 28° C y después del período de incubación, se conservaron en neveras a 4° C.

6.2.1.1.1. Velocidad de crecimiento de *T. versicolor* DSM 3086

La velocidad de crecimiento (V_r) de hongo *T. versicolor* DSM 3086 fue evaluado mediante la utilización de la ecuación lineal, donde la V_r corresponde a la pendiente de la fase exponencial de la curva de crecimiento de un microorganismo (Torres et al., s.f).

6.2.1.2. Inmovilización del hongo en 4 sustratos en caldo PD

Para la inmovilización del hongo se hicieron 4 tratamientos diferentes y una producción de inóculo, por lo cual se preparó caldo PD (Anexo 3) para 20 erlenmeyer. Para el tratamiento 1, denominado T1, se utilizaron 4 erlenmeyer, 3 con producción de inmovilización, los cuales

contenían 125 mL de caldo PD, 2 piezas de estropajo de 2 cm² y 4 discos de 0.5 cm de diámetro de agar de la propagación del hongo. El cuarto erlenmeyer contenía caldo PD y otras dos piezas del soporte, pero este se encontraba libre de microbiota, al cual se le denominó control abiótico. En el tratamiento 2 (T2), también se utilizaron 3 erlenmeyer para inmovilización, los cuales tenían 125 mL de caldo PD, con 2 piezas de fique de aproximadamente de 2 cm² y 4 discos del mismo diámetro del agar de la propagación del hongo y el último erlenmeyer tenía caldo PD con dos piezas más de fique del mismo tamaño como control abiótico. Para el tercer tratamiento (T3), tres de los erlenmeyer tenían 125 mL de caldo PD, 2 cubos de espuma de poliuretano alrededor de 2 cm³ y 4 discos de 0.5 cm de del hongo propagado en agar y el cuarto erlenmeyer tenía caldo PD con otros dos cubos de espuma como control abiótico. El tratamiento 4 (T4), contenía en 3 erlenmeyer caldo PD a un volumen de 125 mL, 2 piezas de madera de 2 cm² y 4 discos de agar con hongo. El último recipiente tenía caldo PD y 2 piezas de madera del mismo tamaño como control abiótico (Saetang & Babel, 2009).

Simultáneamente con estas pruebas de inmovilización, se realizó la inoculación (T5) del hongo *T. versicolor* DSM 3086 en otros 4 erlenmeyer adicionales con 125 mL de caldo PD. En estos 4 caldos se añadió 4 discos de 0.5 cm de diámetro de agar con el microorganismo crecido en las cajas de petri mencionadas anteriormente. Posteriormente, se esterilizaron y su incubación se llevó a cabo en agitación en el Incu Shaker 10L Benchmark por 7 días a 26.5° C y 150 rpm (Apohan & Yesilada, 2017).

Cabe resaltar que en el T1 el estropajo fue utilizado como soporte experimental, en el T2 el fique se usó como control positivo orgánico, en el T3 la espuma de poliuretano se utilizó como control positivo sintético y en el T4 la madera como control negativo (Apohan & Yesilada, 2017; Saetang & Babel, 2009).

Cada uno de los tratamientos fue evaluado según los resultados de inmovilización obtenidos en artículos presentes en la literatura y también de manera macroscópica por medio de observación a través de un estéreo microscopio Olympus SZ61.

6.2.2 Metodología objetivo específico 4.2.2

6.2.2.1. Producción de biomasa

Para el cálculo de la biomasa, se utilizaron todos los tratamientos de inmovilización, los cuales fueron pesados y analizados junto con el inóculo para la comparación de biomasa de *T. versicolor* DSM 3086 con otros reportes de la literatura que contenían protocolos de colonización similares.

6.2.2.1.1. Cálculo peso húmedo

6.2.2.1.1.1. Biomasa fúngica en caldo PD

Se seleccionó un erlenmeyer por cada medio, de los cuales se tomaron los pellets producidos durante la incubación. Esta biomasa se filtró y posteriormente se colocó en una caja de Petri previamente pesada y se anotó el peso de los pellets (Moreno & Ospina, 2008).

$$\text{Whúmedo} = \text{Wcaja de Petri con biomasa} - \text{Wcaja de Petri}$$

6.2.2.1.1.2. Biomasa inmovilizada en caldo PD

Cada uno de los sustratos se pesó previo a la colonización. Realizada la inmovilización en el correspondiente medio, se sacaron los sustratos de los erlenmeyer y se colocaron en una caja de Petri previamente pesada y se tomó nota del peso (Moreno & Ospina, 2008).

$$W_{\text{húmedo}} = W_{\text{caja de Petri con sustrato inmovilizado}} - W_{\text{caja de Petri}} - W_{\text{sustrato}}$$

6.2.2.1.2. Cálculo de peso seco

6.2.2.1.2.1. Biomasa fúngica en caldo PD

Se tomaron los recipientes que contenían el inóculo de *T. versicolor* DSM 3086, los cuales se colocaron en un papel filtro anteriormente pesado y se dejaron filtrar los pellets correspondientes a cada medio. El papel con el inóculo se mandó al horno a 103.5° C hasta alcanzar peso constante. Posterior a esto, se tomó el peso (Moreno & Ospina, 2008).

$$W_{\text{seco}} = W_{\text{caja de petri con biomasa seca}} - W_{\text{caja de petri}}$$

6.2.2.1.2.2. Biomasa inmovilizada en caldo PD

Los sustratos fueron pesados antes de la colonización. A continuación, se llevó a cabo la inmovilización y seguido de esto, se filtraron los soportes inmovilizados mediante una base, unas pinzas, un embudo, papel filtro y un beaker que recogía el caldo filtrado de la inmovilización. En seguida, se metió en el horno el papel filtro con el sustrato inmovilizado a 103.5° C hasta peso constante. Concurrido este tiempo, se tomó el peso (Moreno & Ospina, 2008). Anexo 4.

$$W_{\text{seco}} = W_{\text{papel filtro con sustrato inmovilizado seco}} - W_{\text{sustrato}} - W_{\text{papel filtro}}$$

6.2.2.1.3. Cálculo de la desviación estándar

La incertidumbre del promedio hallado de biomasa para cada uno de los soportes y del inóculo libre fue calculada por medio de las siguientes formulas (Aretaga, 2015) Anexo 4:

1. Cálculo del promedio de las mediciones

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}$$

2. Cálculo del error absoluto de cada medición

$$\text{Error}_{\text{abs}} = X_i - \bar{X}$$

3. Cálculo de la incertidumbre absoluta o desviación media

$$S = \sqrt{\frac{\sum(X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

4. Valor aceptado

$$\text{Valor aceptado} = \bar{X} \pm S$$

6.2.2.2. Análisis Estadístico

Por medio del método ANOVA se realizó el análisis estadístico del crecimiento de *T. versicolor* DSM 3086 en los diferentes soportes de control desarrollados experimentalmente. Este método fue escogido ya que permite estudiar las dispersiones o varianzas de los grupos, estudiar sus medias y posibilita crear subconjuntos de grupos con medias iguales (Bellón, 2010), Permitiendo establecer una diferencia en las muestras estudiadas con fines comparativos.

Para realizar este análisis se empleó el programa InfoStat. En primer lugar, se escogía la prueba de comparación, en este caso se trabajó con Wilcoxon, la cual es una prueba no paramétrica que permite comparar diferentes muestras pequeñas. Seguido de esto, se ingresaron los datos de los pesos de la biomasa producida por cada sustrato en una tabla que posteriormente arrojaba una gráfica de barras en la que se representaban los datos ingresados. Sin embargo, para corroborar que la información obtenida por las gráficas fuera asertiva, se hizo uso de la estadística; para lo cual también se empleó el programa (Universidad de Valencia, 2018).

Para el análisis fue necesario el empleo de una hipótesis nula (H_0) y de una hipótesis alternativa (H_A), las cuales están definidas en las siguientes ecuaciones, respectivamente:

$$H_0 = M1 = M2 \quad (1)$$

$$H_A = M1 \neq M2 \quad (2)$$

Con el fin de determinar cuál de las dos hipótesis se acepta para cada uno de los casos empleados, se utilizó el valor de significancia p . Cuando el valor de $p \leq 0,05$ se rechaza la hipótesis nula, y cuando el valor $p > 0,05$ se acepta la hipótesis nula de que las muestras son iguales (Universidad de Valencia, 2018).

6.2.2.3. Matriz de comparación cualitativa

Para el análisis de comparación de la biomasa hallada experimentalmente con la biomasa reportada en la literatura se empleó el método cualitativo matriz de comparación. Una matriz comparativa es una tabla de doble entrada que muestra información de una forma resumida y concentrada a través de columnas y filas y sirve principalmente para comparar las características de objetos de la misma categoría (Pérez M. , 2018).

Este método fue seleccionado ya que no fue viable realizar un análisis estadístico dado que los datos de biomasa que se compararon no contaban con las mismas condiciones de crecimiento. Sin embargo, se realizó la comparación para determinar si la cepa de *Trametes versicolor* trabajada fue mejor que las cepas reportadas solamente tomando en consideración los datos de biomasa.

6.2.3. Metodología objetivo específico 4.2.3

6.2.3.1. Características de la vinaza pura

La vinaza empleada para esta investigación se obtuvo de dos ingenios diferentes, los cuales fueron el Ingenio Manuelita y el Ingenio Incauca. Inicialmente, se trabajó con la vinaza proveniente de la agroindustria Manuelita, de la cual se utilizaron 1.5 L. Transcurrido un tiempo de 15 días se trabajó con la vinaza del Ingenio Incauca, de esta se utilizó aproximadamente 1 L.

Previo a su uso, ambas vinazas se mandaron a esterilizar en autoclave, se almacenaron en frascos tipo Schoott de vidrio y se refrigeraron a 4° C, los cuales anteriormente se encontraban en su totalidad en un recipiente de plástico.

Considerando que la vinaza de Manuelita se obtuvo directamente con el ingenio, esta venía con su correspondiente rotulado y adecuadas especificaciones en cuanto a la composición fisicoquímica, las precauciones y advertencias de uso y aplicación.

A continuación, en la Tabla 3 se visualizan las características de la vinaza otorgadas por el Ingenio Manuelita.

Tabla 3. Composición fisicoquímica de la vinaza empleada en la investigación

Características fisicoquímicas			
Análisis		Unidades	Resultado
<i>pH</i>			4.85
<i>Brix</i>		*Brix	50.0
<i>Gravedad Específica</i>		mg/mL	1.237
<i>Densidad</i>		kg/L	1.225
<i>Calcio</i>	Ca	%	1.29
<i>Potasio</i>	K	%	3.0 - 4.5
<i>Magnesio</i>	Mg	%	0.75
<i>Sodio</i>	Na	%	0.19
<i>Relación Acidez-Alcalinidad</i>	Ras	me/L	3.29
<i>Carbonatos</i>	CO ₃	me/L	1859.23
<i>Ácido Carbónico</i>	HCO ₃	me/L	296.55
<i>Sulfato</i>	SO ₄	me/L	678.53
<i>Ion Cloro</i>	Cl	me/L	462.49
<i>Dureza</i>	CaCO ₃	ppm	40523.89
<i>Sólidos Disueltos Totales</i>	TDS	mg/L	382296.00
<i>Demanda Química de Oxígeno</i>	DQO	ppm	140000

Nota. Recuperado de Ingenio Azucarero Manuelita S.A

6.2.3.2. Determinación de concentración óptima de degradación de la vinaza

La concentración óptima de degradación de la vinaza fue del 60% (v/v). Se determinó según la metodología reportada por Velásquez et al. (2018), en el que se evaluaron diferentes concentraciones de vinaza estéril a 100, 90, 80, 70 y 60% (v/v) en erlenmeyer de 250 mL, con un volumen efectivo de trabajo de 100 mL, utilizando agua destilada como diluyente. Se inocularon

en cada uno de los erlenmeyer por triplicado, 3 discos de 1 cm de diámetro de *Trametes versicolor*, incubados a 29° C a 130 rpm por 18 días. Para evaluar la efectividad de cada concentración, se evaluaron los parámetros de turbidez, color y biomasa. Finalmente, el estudio determinó por medio de la evaluación de color y producción de biomasa que concentración fue óptima, donde la mayor reducción de color fue de 54.7% en la concentración del 60% (v/v) y por la reducción de la concentración de vinaza aumenta la producción de biomasa. Teniendo en cuenta estos resultados, los autores concluyen que la concentración más adecuada de degradación de vinaza es al 60% (Velásquez et al., 2018).

6.2.3.3 Caracterización de vinaza pura y vinaza diluida al 60%

A pesar de las características enviadas por el Ingenio Manuelita S.A, se realizó una caracterización a la vinaza pura y diluida en su concentración de degradación óptima (60%) para comprobar en qué situación se encontraban. Para estas medidas se trabajó con un volumen de 125 mL con la vinaza de Manuelita y para la vinaza de Incauca se trabajó con un volumen de 100 mL, esto en consecuencia de que la muestra obtenida por el Ingenio Incauca no fue la suficiente para realizar todas las pruebas al volumen de 125 mL.

6.2.3.3.1. Métodos de Caracterización de la vinaza

Los métodos empleados para caracterizar la vinaza fueron tomados del libro “Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales” versión en inglés del año 2005. Elaborado por la American Public Health Association (APHA), la American Water Works Association (AWWA) y la Water Pollution Control Federation WPCF).

En primer lugar, para hallar las unidades de color se empleó el método espectrofotométrico, por medio del equipo multiparámetro Sartorius. En cuanto a la turbidez, esta se halló por el método nefelométrico, los resultados fueron leídos por el equipo 2100N Turbidimeter HATCH 47001. El pH fue determinado por el método electrométrico, utilizando el fotómetro HANNA. Por último, la DQO resultó a través del método de reflujos cerrado titulométrico, trabajando los equipos Spectroquant TR 420 y Espectrofotómetro Genesis 5.

Para todos los procesos, excepto para el pH, debió diluirse la vinaza de modo que las muestras entraran en los rangos de lectura de los equipos empleados. Los resultados obtenidos debieron multiplicarse por el factor de dilución para obtener el valor real de la medición, la cual se adapta para todas las diluciones ejecutadas (HACH, 2015). Anexo 4.

1. Cálculo del volumen total

$$\text{Volumen total} = \text{Volumen de la muestra (mL)} + \text{volumen del agua (mL)}$$

2. Cálculo del factor de dilución

$$\text{Factor de dilución} = \frac{\text{volumen total (mL)}}{\text{volumen de la muestra (mL)}}$$

3. Cálculo del valor real

Valor real de la muestra = Valor medido (unidades) × factor de dilución

6.2.3.4. Ensayos de degradación de vinaza con concentración óptima

Para el ensayo de degradación, se utilizaron 18 erlenmeyer. Los 3 primeros fueron destinados a inoculación y se les añadieron 4 discos de 2 cm de diámetro tomados del hongo crecido en las cajas de Petri del numeral 6.1. En los 15 erlenmeyer restantes se vertieron 40 mL de agua destilada, en el cual este volumen representa el 40% de la muestra. Todos los recipientes y una probeta se esterilizaron en autoclave. Transcurrido el tiempo de esterilización, se vertieron 60 mL de vinaza, los cuales representan el 60% de la muestra, contando con un volumen final de 100 mL. Seguido de esto, se sacaron con una aguja de inyección los sustratos inmovilizados en los caldos mencionados en el numeral 6.4 y se trasladaron a los correspondientes recipientes que contenían la vinaza diluida (Fernández et ál, 2009; Velásquez et al., 2018).

Los erlenmeyer que contenían la vinaza diluida y los caldos se dejaron en el Incu Shaker a 26.5° C y 150 rpm por un período de 15 días (Apohan & Yesilada, 2017).

Hay que tener en cuenta que, para el ensayo de la vinaza de Manuelita, el montaje se realizó con el soporte, el contaminante diluido y discos del hongo, mientras que, en el ensayo con la vinaza de Incauca, se colocó en los Erlenmeyer la vinaza diluida y el hongo ya inmovilizado en el soporte. Como controles abióticos se tenían los soportes sin biomasa dentro de los erlenmeyer y con el medio correspondiente.

7. Resultados y análisis de resultados

7.1. Resultados y análisis objetivo específico 4.2.1

7.1.1 Propagación de *Trametes versicolor* DSM 3086

Se examinó el crecimiento macroscópico del hongo *T. versicolor* DSM 3086, como se puede observar en la Figura 1, presentó una característica morfológica algodonosa de color blanco con un crecimiento uniforme en ambos discos. Esto permitió determinar que el crecimiento promedio del hongo es de 6 días, suponiendo que puede llegar a ser el mismo tiempo al realizarse la inmovilización.

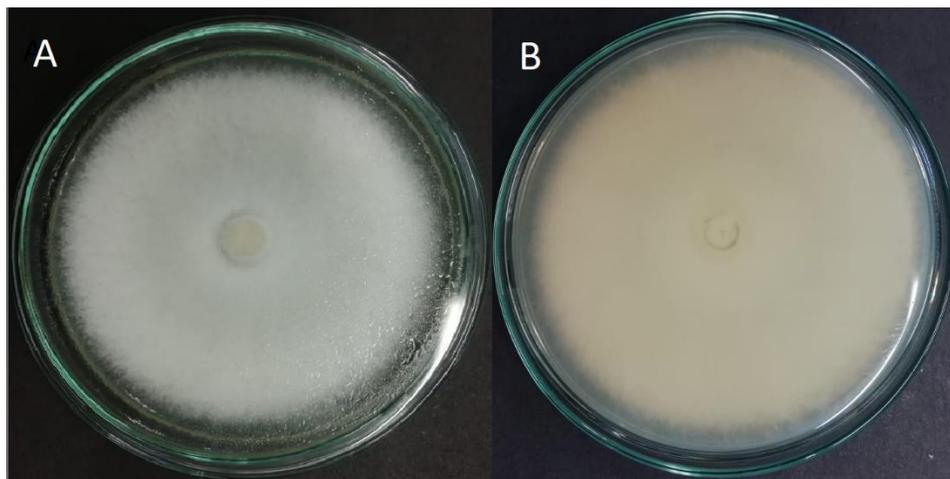


Figura 1. Fotografía de *T. versicolor* DSM 3086 cultivado en agar Extracto de Malta (A: vista superior del hongo y B: envés del hongo en la caja de Petri)

La Figura 2, expone la curva de crecimiento del hongo *T. versicolor* DSM 3086 de los dos discos del hongo propagado en Agar Extracto de malta por 6 días.

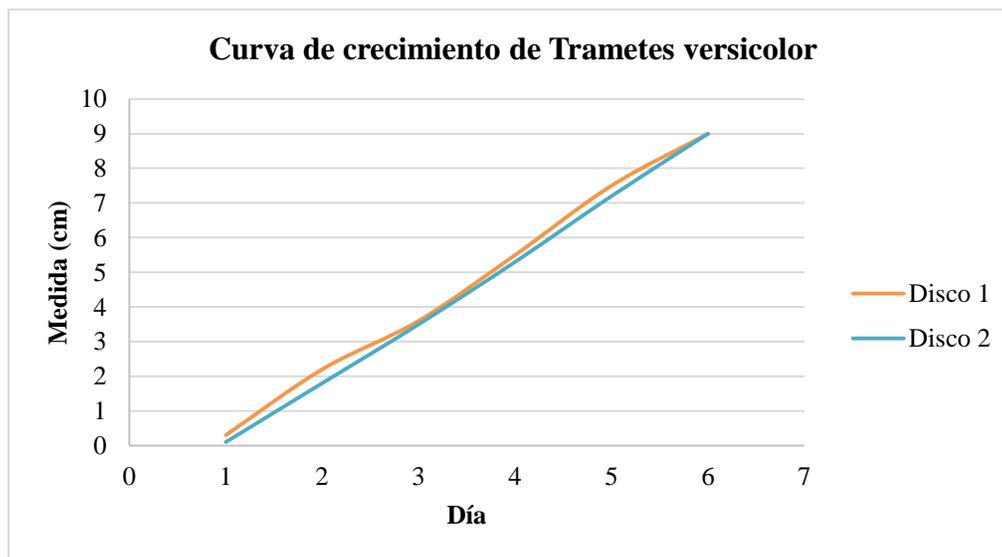


Figura 2. Curva de crecimiento del hongo *T. versicolor* DSM 3086 cultivado en agar Extracto de Malta durante 7 días a 28° C.

Las velocidades de crecimiento halladas mediante la ecuación de la recta para los dos discos fueron de 1.78 y 1.75 cm/día, dando un promedio de crecimiento de 1.76 ± 0.01 cm/día para *T. versicolor* DSM 3086.

Comparando con un estudio reportado por Campi et al., (2016), donde propagaron *T. versicolor* en agar extracto de malta por un período de 10 a 24 días el cual dependía de la colonización del hongo a diario. El valor de crecimiento reportado para el hongo fue de 0.93 ± 0.10 cm/día, mostrando que la velocidad de la cepa empleada en el estudio reportado tiene una velocidad de crecimiento menor a la obtenida experimentalmente.

Esto conlleva a suponer el hongo *T. versicolor* DSM 3086 tiene una mayor capacidad de adaptación al medio de cultivo lo que permite que crezca a velocidades mayores a las reportadas por Campi et al. (2016). Cabe resaltar que si el hongo tiene mejores condiciones de crecimiento y por lo tanto aumenta su velocidad de reproducción este es capaz de generar mayor biomasa en menor tiempo que el comparado en la literatura.

7.1.2. Inmovilización del hongo en 4 sustratos en caldo PD

Como se observa en la Tabla 4, se realizó una evaluación macroscópica con respecto a la adherencia del hongo a los diferentes soportes. En la cual se visualizan resultados efectivos para los dos controles positivos y el soporte experimental. A su vez se confirmó que la madera procesada no es capaz de portar microorganismos.

Tabla 4. Visualización de adherencia de *T. versicolor* DSM 3086 a bioportadores

Soporte	Visualización macroscópica inmovilización en soportes	
	Si	No
Estropajo (<i>Luffa cylindrica</i>)	X	
Espuma de Poliuretano	X	
Fique	X	
Madera		X

Estas observaciones se realizaron a través del estéreo microscopio Olympus SZ61 el permitió verificar la colonización y la incorporación del hongo *T. versicolor* DSM 3086 en cada uno de los soportes, como se expresa en las figuras 3-5.

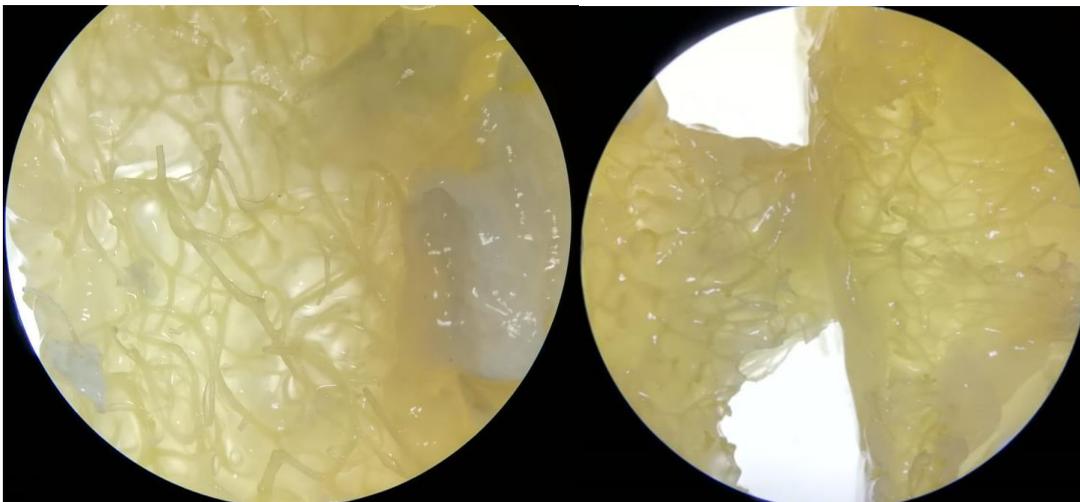


Figura 3. Fotografía de *T. versicolor* DSM 3086 inmovilizado en Estropajo (*Luffa cylindrica*)

La Figura 3, permite notar la colonización del hongo *T. versicolor* DSM 3086 siendo el hongo de color blanco amarilloso con textura lisa, con algunas secciones blancas. Adicionalmente, las fibras del estropajo se ven entre el medio de la biomasa producida, que abarco toda la superficie del soporte.

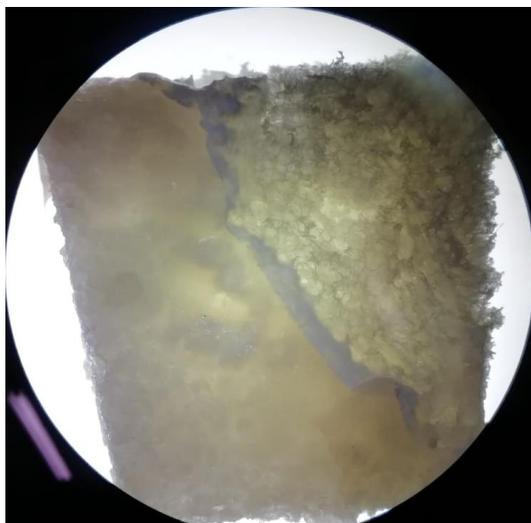


Figura 4. Fotografía de *T. versicolor* DSM 3086 inmovilizado en Espuma de poliuretano

La Figura 4 en cambio, muestra la colonización del hongo en la espuma de poliuretano, la cual sólo logró crecer en medio soporte. El hongo presenta una textura lisa de color blanco y bordes definidos. En este caso no se nota a simple vista si el hongo logro colonizar la zona interna del sustrato ya que por su tipo de textura no es fácil notar que hay en su interior.



Figura 5. Fotografía de *T. versicolor* DSM 3086 inmovilizado en Fique

La Figura 5, por otra parte resalta la colonización del hongo en los hilos de fique, notando que la biomasa del hongo mayor a la del soporte. Esto se debe a que el fique cambió su forma inicial al contacto con el medio líquido. Sin embargo, el hongo logró unificar los hilos de fique que flotaban en el medio comprobando que se inmovilizaron a este.

Aproximadamente en los últimos 30 años, se viene trabajando con la técnica de inmovilización natural o inducida de microorganismos para la biodegradación de residuos orgánicos o industriales que contaminan agua, suelo y aire. Con el paso del tiempo, se han ido registrando diversos artículos en los que se presenta la efectividad de la inmovilización de microorganismos como hongos y bacterias en diferentes soportes. De igual forma, existen reportes en la literatura sobre cómo realizar una inmovilización de manera adecuada. Siendo este el caso, Kourkoutas et ál. (2004), desarrollaron un artículo en el cual se presentan los requisitos para lograr una inmovilización, para lo cual se debe contar con una matriz que posea una superficie de adherencia amplia, fácil de manipular y de regenerar, que posea estabilidad química, biológica, mecánica y térmica y ser resistente a enzimas, solventes y cambios de presión. Por último, debe tener una porosidad que permita un intercambio de sustratos, productos, cofactores y gases (Kourkoutas et ál, 2004). Lo anterior permite percibir que los soportes empleados en la investigación cumplen con estos requisitos para una adecuada inmovilización, como se detallará más adelante.

Existen dos tipos de inmovilización. Está la pasiva, la cual se basa en la fijación del microorganismo a la superficie del soporte, creando las biopelículas mencionadas anteriormente. O está la inmovilización activa, en la cual se genera un atrapamiento del hongo. En este caso, se realizó la inmovilización pasiva, debido a que los hongos de podredumbre blanca como lo es *T. versicolor*, son los más importantes en la biodegradación de la lignina, lo cual permite una rápida colonización de las superficies a disposición. No solo hay que tener en cuenta su sencilla adhesión a los sustratos, sino también los beneficios que esta trae, pues esta interacción no permite que se presenten cambios en el pH, temperatura o que se genere pérdida de biomasa (Garzón R. , 2009). Además, estas inmovilizaciones pueden ser utilizadas en biorreactores destinados para la biorremediación de aguas contaminadas.

Con respecto a los tratamientos T1 y T2, macroscópicamente resultaron positivos en la inmovilización del hongo. En la Figura 6, se puede evidenciar la completa colonización de los sustratos por parte del microorganismo, además de su considerable crecimiento. Por parte del estropajo, el aumento en el tamaño del sustrato fue notable y esto debido a la biomasa, la cual por medio de su adhesión fue extendiendo y enredando sus micelios en las fibras del estropajo, lo que generó el gran tamaño del producto de la inmovilización.

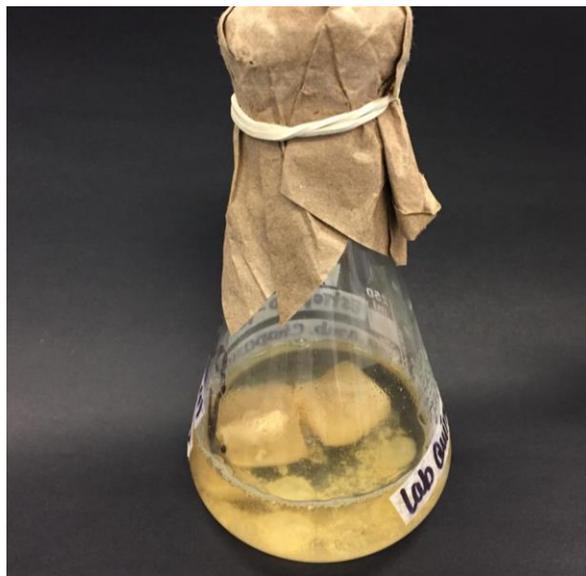


Figura 6. Fotografía de la inmovilización de *T. versicolor* DSM 3086 en estropajo (T1) por un período de 7 días a 26.5 C..

El estropajo se caracteriza por poseer una estructura tubular larga, a esto se le suma las capas fibrosas, flexibles y fuertes que cubren el tallo, además de su alta porosidad. Estas propiedades permiten que esta esponja tenga la capacidad no solo de permitir la inmovilización microbiana gracias a sus poros penetrables sino también de adsorber contaminantes presentes en el ambiente, lo cual facilita la retención y remoción de estos (Pereira-Martinez et ál, 2017).

Por otro lado, en su interior, el estropajo posee una retícula fibrosa conformada por lignina, celulosa y hemicelulosa, los cuales ayudan a la remoción de sustancias tóxicas y la inmovilización de los hongos, debido a que estos compuestos le proporcionan nutrientes y una fuente de carbono necesaria que el microorganismo requiere para su óptimo crecimiento como se presentó en Fernández y acompañantes (2009). En este caso como los hongos fueron inmovilizados en caldo de papa con glucosa, estos obtuvieron del medio los nutrientes vitales para su desarrollo. Así mismo, el soporte les proporcionaba más sustratos, lo que dio a lugar una profunda extensión de los micelios en las fibras del estropajo.

En cuanto al tratamiento T2, en la Figura 7, se puede presenciar que el mismo hongo se encargó de unir los hilos y formar una sola aglomeración de fique inmovilizado. Al colocar en agitación el montaje de la inmovilización, el hongo empezó a colonizar hilo por hilo, logrando la unión de cada uno de estos, una sola biomasa fúngica inmovilizada y una formación de pellets alrededor de la inmovilización.



Figura 7. Fotografía de la inmovilización de *T. versicolor* DSM 3086 en fique (T2) por un período de 7 días a 26.5° C.

El fique es un material similar al estropajo, es decir, en su composición también se encuentran compuestos celulósicos que permiten y benefician el crecimiento del micelio fúngico. Más aún al estar en contacto con el medio líquido nutritivo concede un desarrollo más abundante como se encuentra reportado en el trabajo de Córdoba y Ospina (2009). Otro rasgo muestra que, al ser una estructura porosa, esta posibilita la transferencia de oxígeno durante todo el proceso de inmovilización y de metabolismo del microorganismo (Fernández et ál, 2009).

En la Figura 8, en la que se contempla que la inmovilización en espuma de poliuretano (T3) solo se realizó en la parte inferior de esta, mientras que la parte superior no presentó ninguna adhesión de la biomasa fúngica. Esto se debe a que la espuma no se encontraba sumergida por completo en el caldo.

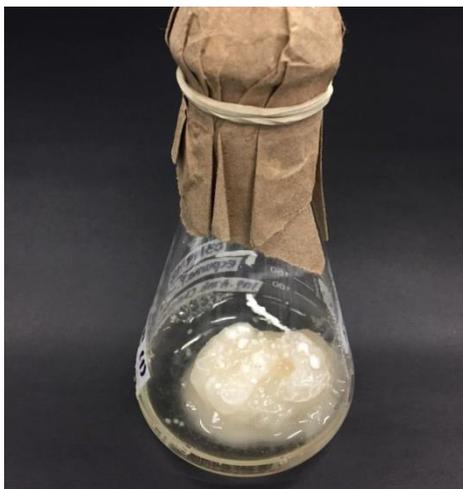


Figura 8. Fotografía de la inmovilización de *T. versicolor* DSM 3086 en espuma de poliuretano por un período de 7 días a 26.5° C.

Por lo que se refiere al hongo, este no degrada los compuestos químicos que posee la espuma, ya que es un polímero sintético y termoestable sintetizado por la mezcla del polioliol e isocianato (Fernández et ál, 2009), por esta razón el hongo por sí solo no iba a colonizar la zona superior de la espuma como se observa en la Figura 8.



Figura 9. Fotografía de la inmovilización de *T. versicolor* DSM 3086 en espuma de poliuretano con imán dentro (T3) (A: sustrato espuma flotante en caldo PD y B: sustrato espuma colonizado por el hongo *T. versicolor* DSM 3086 con discos de agar en caldo PD)

Existen diferentes artículos que reportan una inmovilización eficiente en este sustrato como el artículo realizado por Fernández y demás (2009), es por esto que se decidió insertar dentro de la espuma un imán circular de 8 mm x 3 mm, debido a que el soporte en el que se acomodó el erlenmeyer en el agitador es de un material metálico y por ende esto permitía que el sustrato lograra sumergirse en el medio líquido. Esto posibilitó la perfecta inmovilización alrededor de los cubos, lo cual posteriormente llevó al aumento en el tamaño del producto como se evidencia en la Figura 9.

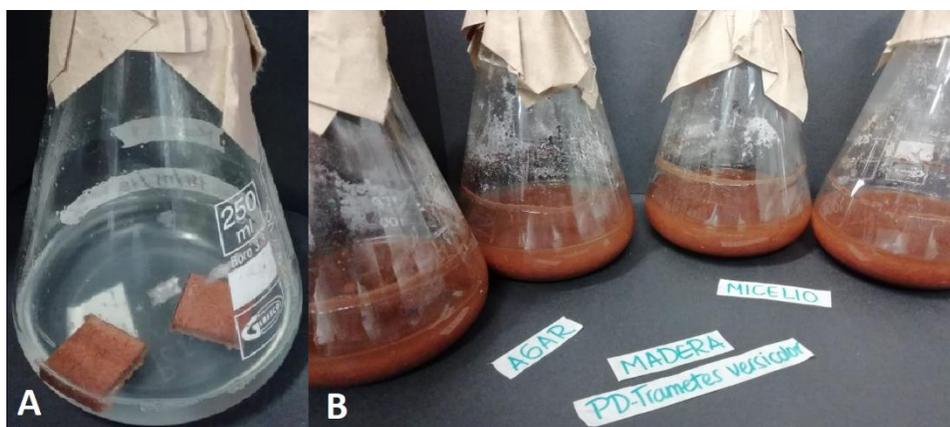


Figura 10. Fotografía de la inmovilización de *T. versicolor* DSM 3086 en madera (T4) (A: sustrato madera flotante en caldo PD y B: sustrato madera disuelto y pellets del hongo *T. versicolor* DSM 3086 en caldo PD) por un período de 7 días a 26.5° C.

El tratamiento T4 como se observada en la Figura 10, al ser sometido a altas temperaturas durante el proceso de esterilización en autoclave se deshizo completamente. Sin embargo, estos erlenmeyer se expusieron al período de incubación, con el fin de observar cómo reaccionaba el microorganismo en esas condiciones. Al finalizar los 7 días, el hongo formó pellets sin mostrar

ningún tipo de colonización, por lo cual se puede deducir que este tipo de madera procesada no funciona como sustrato de inmovilización, ya que no le proporciona al microorganismo los nutrientes que este necesita para su crecimiento o posee compuestos químicos que generan inhibición de hongos como los anti-fungidas, dado que es un material proveniente de inmuebles. No obstante, la madera seleccionada se descartó como sustrato para la inmovilización de *T. versicolor* DSM 3086. Por otro lado, cabe aclarar que no todos los tipos de madera se encuentran excluidos en esta técnica, puesto que los hongos de podredumbre blanca en la naturaleza crecen en madera. Por ello, es válido mencionar que la madera de origen natural es la apropiada en el desarrollo de la inmovilización si es el caso, debido a que existen reportes en la literatura de la inmovilización de microbios en fibras y cubos de madera (Garzón R. , 2009; Iqbal & Saeed, 2006).

La inmovilización se puede realizar en matrices orgánicas y sintéticas. Como se puede apreciar, en este estudio, se utilizaron ambas; el tratamiento T1 como el soporte experimental, el T2 como control positivo orgánico y T3 como tratamiento positivo sintético. Aunque Garzón y Barragán (2008) expuso que los materiales orgánicos permiten una mejor adhesión que las sintéticas, debido a que estos poseen varios grupos radicales que posibilitan la formación de fuerzas electrostáticas que establecen la adherencia del hongo con el soporte, además de la quitina presente en la pared fúngica que también lo permite.

Es válido acotar que existen diferencias entre estos soportes. Por ejemplo, en el caso del estropajo y el fique, ambos son materiales de baja toxicidad y reactividad, poseen una excelente maleabilidad, alta porosidad y biodegradabilidad, lo cual resulta propicio para el medio ambiente. Hay que mencionar, además, que son materiales abundantes en los trópicos colombianos y económicos. En el caso de la espuma de poliuretano, esta funciona como soporte para la inmovilización del hongo, gracias a su porosidad y su superficie. No obstante, si este material no se encuentra dentro de un medio que contenga los nutrientes que requiere el microorganismo para crecer, este no podría actuar como sustrato inmovilizador y posee un mayor costo que el estropajo y el fique. Por último, cabe resaltar que, al finalizar el tratamiento, por parte de las matrices orgánicas el residuo puede ser incorporado en otros procesos, mientras que la matriz sintética se convertiría en un residuo el cual se debe disponer (Fernández et ál, 2009).

7.2. Resultados y análisis objetivo específico 4.2.2

7.2.1. Producción de biomasa

Después de realizar los cálculos para hallar la biomasa inmovilizada en estado seco de cada uno de los soportes colonizados y del inóculo de *T. versicolor* DSM 3086, se presentan los siguientes resultados en la Tabla 5, los cuales están representados en mg de biomasa/mg de soporte inmovilizado (Anexo 4). A simple vista es posible observar la diferencia de crecimiento de biomasa tanto en el soporte experimental (estropajo) como en los soportes de tratamiento positivo (espuma de poliuretano y fique) y el inóculo de *T. versicolor* DSM 3086. La capacidad de inmovilización de cada uno de estos soportes se debe principalmente a su composición y porosidad como se expone más detalladamente en el apartado 7.1.2. Además, la desviación obtenida por cada uno de los valores indica la dispersión de los datos, es decir, entre mayor sea la desviación estándar mayor es la dispersión de los datos indicando un aumento grado de variabilidad principalmente en las muestras de estropajo y de inóculo de *T. versicolor* DSM 3086.

Ahora bien, con respecto a los soportes de inmovilización, el que obtuvo mejores resultados de biomasa se trató del estropajo. Fue capaz de retener mayor cantidad de biomasa que la espuma de poliuretano y el fique incluso teniendo algunas diferencias de tamaño entre estos.

Tabla 5. Biomasa inmovilizada de *T. versicolor* DSM 2086 en soportes y sin soporte

Soportes	W Seco (mg biomasa/mg de soporte)	Promedio W Seco (mg biomasa/mg de soporte)	Desviación estándar (mg/mg)	Incertidumbre
Estropajo (T1)	9.4203	9.2208	2.25	9.2208 ± 2.25
	6.8714			
	11.3707			
Espuma de Poliuretano (T3)	3.3633	3.6445	0.87	3.6445 ± 0.87
	2.9482			
	4.6220			
Fique (T2)	0.3451	0.3263	0.08	0.3263 ± 0.08
	0.3961			
	0.2378			
Inóculo de <i>T. versicolor</i> DSM 3086 (T5)	10.1984	21.0763	11.92	21.0763 ± 11.92
	33.8200			
	19.2104			
Control Abiótico (T4)	-	-	-	-

Nota: No se realizó medición de biomasa para la madera ya que no hubo colonización de *T. versicolor* DSM 3086 en este soporte. Anexo 4.

7.2.1.1. Análisis de varianza de biomasa inmovilizada en seco experimentalmente

Como se expone en el gráfico de cajas de la Figura 11, el cual proporciona un resumen gráfico de la distribución de una muestra evidenciando la forma, tendencia central y variabilidad de los datos (Minitab, 2017), es posible determinar visualmente una asimetría importante y gran variabilidad de datos de cada uno de los soportes inmovilizados y en el control positivo sin soporte, ya que cada uno de los puntos (medias) se encuentra fuera de los límites de decisión, demostrando que la media de los niveles de los factores representados por cada punto son significativamente diferentes entre sí (Minitab, 2017). Esta dispersión de los datos puede deberse a la estructura, tamaño y composición de cada uno de los soportes y la capacidad del hongo de inmovilizarse a estos o ya sea por su crecimiento libre.

Siendo así, el T5 fue el tratamiento con mayor producción de biomasa, seguido del T1, el cual fue el sustrato que inmovilizó mayor cantidad de biomasa frente a los tratamientos positivos, demostrando ser el soporte más eficiente para la inmovilización del hongo *T. versicolor* DSM 3086.

El control abiótico y el T4 no se representan en la gráfica, puesto que no presentaron ningún crecimiento de biomasa. Siguiendo el control abiótico, indica que las condiciones en las que se operaron los controles fueron óptimas y no se contaminaron con ningún otro tipo de microorganismo.

Por otra parte, todas las pruebas ANOVA realizadas, comparando cada uno de los tratamientos entre sí, presentan valores $p \leq 0.05$, lo que significa que se rechaza la hipótesis nula y es posible aceptar la hipótesis alternativa de que cada una de las muestras de biomasa inmovilizada en los soportes son significativamente diferentes.

Producción de biomasa

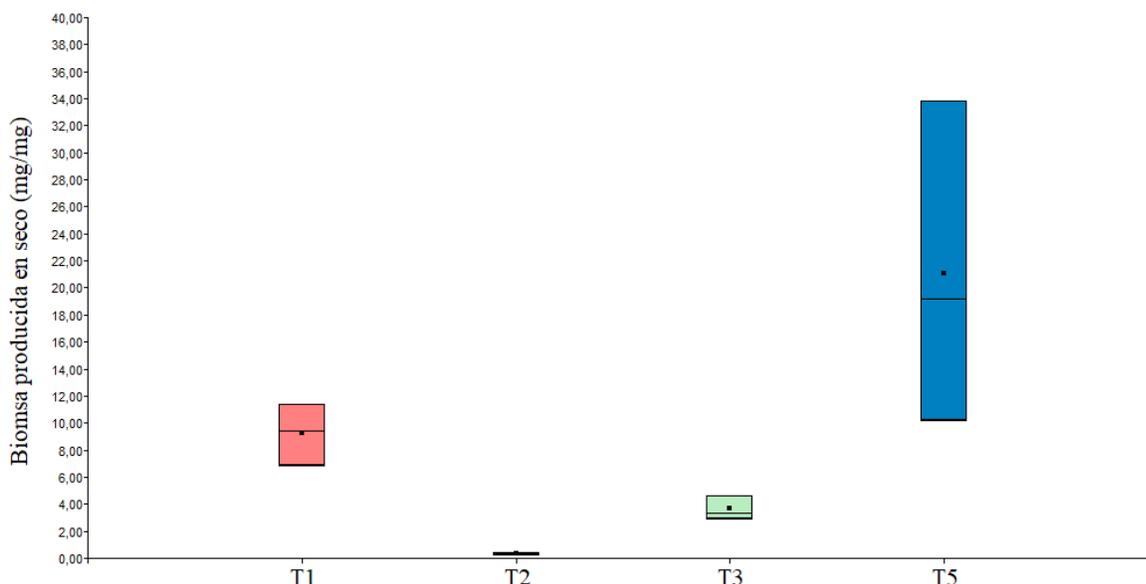


Figura 11. Comparación de medias de biomasa inmovilizada seca en estropajo, espuma de poliuretano, fique y control positivo de inóculo

Con esta información es posible determinar que en términos de biomasa el T5, es decir, la producción de biomasa sin soporte, es más eficiente que inmovilizando *T. versicolor* DSM 3086 en algún tipo de soporte, ya que se produce más del triple de biomasa en estado libre que en estropajo, como se indica en la Tabla 5, el soporte que mayor biomasa retuvo. Sin embargo, observando la comparación entre los mejores soportes de colonización, el soporte con mayor retención de biomasa es el estropajo (T1), como ya se mencionó anteriormente.

De acuerdo a esto, al momento de plantear un tratamiento con este hongo para degradar algún tipo de contaminante, sería ideal manejar el hongo de manera libre ya que es capaz de producir mayor cantidad de biomasa. Sin embargo, si por ejemplo, se determina el funcionamiento de un Biorreactor de lecho fluidizado tipo columna, no sería práctico manejar el hongo de forma libre, ya que toda la biomasa se precipitaría y no lograría desarrollarse de forma óptima la biodegradación. Por lo que en este caso si sería oportuno pensar en que el funcionamiento del hongo sea a través de un soporte que permita que pueda localizarse a lo largo de toda la columna (Martínez et ál., 2005). Además de tratarse de una forma práctica para el diseño de la columna, el hecho de que esta requiera una entrada constante de aire, denotaría un incremento en la actividad

de las enzimas ligninolíticas permitiendo una mayor decoloración del contaminante que se quiera tratar como lo reporta Martínez et ál. (2005) (Saetang & Babel, 2009).

Tomando esto en consideración, según los tratamientos realizados, el T1 fue el más eficiente en cuanto a retención de biomasa con respecto a los tratamientos T2 y T3. El análisis de varianza ANOVA, permite corroborar esta información ya que el valor p resultado fue menor al 95%, demostrando que todos los valores de biomasa obtenidos entre si son significativamente diferentes rechazando así la Ho.

Con esto en mente, la columna de biorremediación tendría mejores condiciones de funcionamiento si se implementa con el hongo inmovilizado en estropajo, por ser el soporte con mayor capacidad de colonización, el cual estaría completamente distribuido dentro de la columna facilitando su adecuado funcionamiento y garantizando una mayor degradación (Saetang & Babel, 2009).

7.2.2. Comparación de biomasa inmovilizada experimentalmente con biomasa inmovilizada reportada

La Tabla 6 ilustra, mediante una matriz de comparación cualitativa, los pesos secos de biomasa hallados experimentalmente en el apartado 7.2.1 y los pesos secos de biomasa inmovilizada que se han reportado en la literatura. Estos pesos fueron comparados con el fin de determinar si la cepa de *T. versicolor* DSM 3086 es más eficiente que otras cepas teniendo en cuenta los sustratos de colonización.

Tabla 6. Matriz de Comparación de biomasa inmovilizada experimentalmente y reportada en la literatura

Biomasa (mg/mg)	Soportes			
	Estropajo (<i>Luffa cylindrica</i>) (T1)	Fique (T2)	Espuma de poliuretano (T3)	Inóculo de <i>T.</i> <i>versicolor</i> DSM 3086
Hallada experimentalmente	9.2208 ± 2.25	0.326 3 ± 0.08	3.6445 ± 0.87	21.0763 ± 11.92
Reportada en la literatura	5.58 ± 2.3	0.43 ± 0.05	5.50 ± 2.8	1.38 ± 0.1

La cepa de *T. versicolor* inmovilizada en estropajo y espuma de poliuretano reportada en la literatura, con la que se comparó la inmovilización de *T. versicolor* DSM 3086 en estropajo y espuma de poliuretano experimentalmente, fue una cepa proveniente del cepario de la Pontificia Universidad Javeriana donde se conservan hongos y bacterias de interés clínico, biotecnológico, industrial y ambiental (Fernández et al., 2009).

Se presentan algunas diferencias en el mecanismo de inmovilización empleado, dado que como se indica en el estudio realizado por Fernández et al. (2009) se evaluaron dos protocolos de colonización en medio sólido y en medio líquido. En el sistema líquido se utilizaron erlenmeyer de 100 mL con 50 mL de caldo extracto de salvado de trigo y 5 cubos de estropajo y de espuma de poliuretano de 0,5 cm³. Después del proceso de esterilización (auto clavado), se inocularon 15

discos de agar crecidos con el *T. versicolor* y se incubaron por 8 días a 30° C y 150 rpm. El producto inmovilizado se filtró y se determinó la cantidad de biomasa atrapada en cada uno de los cubos por medio de peso seco.

El mecanismo de inmovilización en medio sólido se realizó colocando 30 cubos de estropajo y de espuma de poliuretano de 0,5 cm³ sobre una caja de Petri con agar extracto de salvado de trigo y se sembraron 15 discos de agar de *T. versicolor* de forma que estuvieran en contacto con el medio de cultivo y el sustrato. Las cajas se incubaron por 8 días a 30° C. Se determinó la cantidad de biomasa atrapada después del proceso por medio de peso seco (Fernández et al., 2009).

Después de la determinación de biomasa de cada uno de los protocolos de inmovilización, Fernández et al. (2009) reportan que se presentaron diferencias significativas, demostrando que en el proceso de inmovilización en sólido se retuvo la mayor cantidad de biomasa en mg/mg de soporte de estropajo y de espuma de poliuretano con valores de 67 mg/mg ± 2,3 y 66 mg/mg ± 2,8, respectivamente.

Como se observa en la Tabla 6, la biomasa reportada por Fernández et al. (2009) inmovilizada en estropajo es menor que la biomasa colonizada en esta investigación lo que demuestra mayor rendimiento de biomasa en la trabajada experimentalmente. Esto puede deberse por las condiciones fisicoquímicas de crecimiento del hongo, como la temperatura, la agitación y el tiempo.

Por otra parte, en el caso de la espuma de poliuretano, se presenta el caso contrario, se reporta que hay mayor crecimiento de biomasa que la obtenida experimentalmente. Esto puede deberse por el volumen empleado de espuma y por las condiciones de crecimiento del hongo.

Por otra parte, la cepa de *T. versicolor* inmovilizada en fique, reportada en la literatura, con la que se comparó la biomasa de *T. versicolor* DSM 3086 inmovilizada en fique experimentalmente, es donada por el laboratorio de Biotecnología aplicada de la Pontificia Universidad Javeriana. Sin embargo, Garzón (2009) no reporta el tipo de cepa utilizada por lo que no se tienen detalles de su conservación.

El protocolo de inmovilización de fique reportado se realizó por medio de un ensayo en 250 mL de medio líquido mineral Radha modificado dónde agregaron 4 mallas de fique de 1x1 cm con un peso de 0,24 g cada una. Se incubaron en agitación a 120 rpm durante 15 días a 30° C.

Después de este procedimiento se halló el peso seco de la biomasa inmovilizada en las mallas de agave y se reportó un atrapamiento de *T. versicolor* de 0,44 mg/mg, 0,42 mg/mg y 0,41 mg/mg para cada uno de los ensayos realizados.

En este caso, al igual que como la espuma de poliuretano el fique reportado por Garzón (2009) resultó obtener mejores resultados de retención de biomasa, como se observa en la Tabla 6. Estos resultados se deben en primer lugar a la diferencia de tamaños del soporte fique en las dos investigaciones ya que en el experimento reportado por Garzón (2009) se emplearon 4 mallas de fique de 1x1 cm, contrario a la malla de fique de 3x3 cm que se empleó en el presente estudio. Al tener más sustrato para retener biomasa se reporta más crecimiento de esta. Asimismo, es

necesario tener en cuenta que las condiciones del protocolo de inmovilización ya que pueden afectar la variable biomasa con respecto a la temperatura, la agitación y el medio de cultivo.

Por último, fue necesario comparar el crecimiento de biomasa libre de *T. versicolor* DSM 3086 con el reportado por Rodríguez et al. (2017), el cual empleó una cepa de *Trametes máxima* inoculado en medio líquido. Se raspó parte del micelio del hongo conservado en cajas de Petri en PDA y se adicionó a erlenmeyer con 50 mL de caldo peptona. Estos fueron incubados en agitación a 120 rpm a 25° C por 15 días. Completado este proceso se separó la biomasa por filtración y se obtuvo como peso seco final 1.38 ± 0.01 mg/mL.

La gran variación de datos de biomasa obtenida experimentalmente con la reportada en la literatura, demuestra a simple vista que el hongo *T. versicolor* DSM 3086 es mucho más eficiente en cuanto a la producción de biomasa que *T. máxima*, al producir más del triple de biomasa reportada.

Aunque es claro que las condiciones de crecimiento del hongo experimentalmente comparado con cada uno de los reportes varían considerablemente, en términos de biomasa es posible determinar que el hongo *T. versicolor* DSM 3086 es muy recomendable en la optimización de tratamientos biológicos por su alta capacidad de producción de biomasa, siendo directamente proporcional a su posible capacidad de degradación de un contaminante específico.

7.3. Resultados y análisis objetivo específico 4.2.3

7.3.1. Caracterización de vinaza pura, vinaza diluida al 60%

En la puesta en marcha del tratamiento preliminar se llevaron a cabo dos pruebas, en la primera se trabajó con la vinaza del Ingenio Manuelita y en la segunda con la vinaza proveniente del Ingenio Incauca.

A continuación, en la Tabla 7 se presentan los resultados obtenidos en los 4 parámetros establecidos anteriormente en la metodología.

Tabla 7. Valores de cada parámetro según concentración de la vinaza

Parámetro	Concentración					Unidades	
	0.5 %	5 %	10 %	60 %	100%		
Vinaza Manuelita	pH	-	-	-	4.79	4.83	
	Turbidez	-	64	885	8850	1280	NTU
	Color	403	-	-	-	80600	PCU
	DQO	353	-	-	-	101000	mg O ₂ /L
Vinaza Incauca	pH	-	-	-	4,55	4,6	
	Turbidez	-	14	-	-	2960	NTU

		8				
Color	150	-	-	-	3000 0	PCU
DQO	262 7	-	-	-	5254 00	mg O ₂ /L

Nota: Cada uno de los valores obtenidos por los equipos de la Universidad El Bosque, fueron verificados según la repetitividad de los valores. El pH fue hallado por medio del Multiparámetro Sartorius, la turbidez se halló a través del 2100 N Turbidimeter HATCH 47001, el color fue determinado con el Fotómetro HANNA y la DQO con el Spectroquant TR 420 y el Espectrofotómetro GENESYS 5.

La dilución de las sustancias genera un cambio en el pH, debido a que al aumentar el volumen diez veces, la concentración de dicha sustancia se reduce a la décima parte y el pH varía en 1 unidad (IES DOMINGO MIRAL, 2010).

En consideración con los resultados obtenidos frente a la dilución de las dos vinazas, se puede apreciar que su pH cambió en aproximadamente 0.05 unidades. Lo anterior se puede explicar a causa de que en ambas vinazas se diluyó la muestra, pero no al grado de diluirla 1 vez más al volumen trabajado principalmente, por ende, mucho menos a 10 veces el volumen, dicho de otro modo, como no se utilizó un volumen considerable, el pH no varió en gran cantidad.

T. versicolor se identifica por tener una excelente producción de la enzima lacasa, la cual ha sido reportada como una de las mejores enzimas con actividades enzimáticas para la degradación de contaminantes, dado que en la interacción vinaza-hongo, se genera un vínculo electrostático entre los fragmentos aniónicos, la muestra y los aminoácidos producidos por esta enzima (Fernández et ál, 2009). Todo este proceso se habría visto favorecido por el pH, a causa de que este tipo de actividades se desarrollan mejor en condiciones de acidez. Sin embargo, esto no quiere decir que el pH no haya podido variar con el tratamiento, por el contrario, en relación con este, de haber funcionado, el cambio del pH habría sido un poco más notorio, puesto que no solo influye la realización de diluciones, sino que también se habría visto afectado por la degradación del contaminante, sin dejar de oscilar cercano al valor obtenido principalmente.

Por parte de la turbidez, como la vinaza es un subproducto muy turbio, la muestra pura no logró ser leída por el equipo, de tal manera que se diluyó al 5% para poder ser medida, lo que nos muestra que es de gran proporción la cantidad de sedimentos y materia orgánica que posee la vinaza. Asimismo, la muestra que fue diluida al 60% para la realización del ensayo, debió ser diluida al 10% para confirmar su lectura.

Las vinazas utilizadas en el tratamiento, a pesar de ser provenientes de industrias azucareras, no son efluentes con el mismo valor en cada una de las propiedades analizadas en la caracterización fisicoquímica. Como se puede observar, la turbidez de la vinaza del Ingenio Incauca es mucho mayor a la turbidez de la vinaza del Ingenio Manuelita, lo que muestra que el subproducto de Incauca posee una mayor cantidad de material suspendido que no permite el paso de la luz en el equipo, ya sea por sedimentos, materia orgánica, entre otros. Por otro lado, en la Tabla 7, se puede notar la ausencia del dato que corresponde a la turbidez de la vinaza de Incauca al 60%, lo cual es debido a que no se obtuvo una cantidad de muestra suficiente para determinar este parámetro.

Con respecto al color, la vinaza obtuvo niveles de PCU (Unidades de Platino Cobalto) muy altos a la concentración del 100%, lo cual se debe a la presencia de melanoidinas y melazas que aparecen en el proceso productivo de la caña de azúcar. Estas melazas tienen unos derivados que son los compuestos fenólicos recalcitrantes, los cuales permiten la pigmentación oscura y a su vez los valores de la DQO de la vinaza. Dado que, el principio de funcionamiento del equipo para medir este parámetro, se basa en el paso del haz de luz a través de la muestra y la interacción de esta con la muestra, se pudo determinar que, debido a su alto contenido de material (melazas) y la precisión del equipo, se tuvo que diluir la vinaza al 0,5% para obtener una lectura que estuviese dentro del rango del fotómetro, ya que estas diluciones permitían la dispersión del material que no precisaba una adecuada lectura (HANNA, 2018; Gutiérrez et ál, 2009).

Como se ha explicado con anterioridad, no todas las vinazas poseen el mismo valor característico, es por esto que la vinaza del Ingenio Manuelita mantuvo una coloración mayor a la vinaza del Ingenio Incauca. De igual forma, se puede mencionar que la actividad biológica presente en las vinazas influyó en el color, puesto que, en el caso del subproducto de Manuelita, esta llevaba 6 meses de haber sido recogida de los destiladores y almacenada en un galón de plástico, a diferencia de la vinaza de Incauca que, a las dos semanas de haber sido recolectada, ya estaba siendo esterilizada, almacenada en frascos de vidrio y refrigerada como lo recomienda Giraldo (1995).

La enzima lacasa es producida por el hongo *T. versicolor* y los reportes presentan muy buenos resultados por parte de esta enzima en la decoloración de las aguas contaminadas. Es por esto que, en caso de haber funcionado el tratamiento, la lacasa en los tres primeros días habría comenzado a degradar el color marrón de la vinaza, puesto que su actividad se encuentra en mejores condiciones durante este período. Esta actividad enzimática habría desintegrado los compuestos que proporcionan la fuerte pigmentación, es decir, los compuestos fenólicos recalcitrantes se convertirían en unos más simples para su posterior remoción (Fernández et ál, 2009; Gutiérrez et ál, 2009).

Con relación a los resultados de la DQO, el instrumento encargado de medir este parámetro posee un haz de luz que cuantifica la cantidad de oxígeno requerido para oxidar la materia orgánica presente en la muestra (Rodríguez, 2007). Para un subproducto tan oscuro como la vinaza, la radiación electromagnética no lograba ser transmitida, sino que era absorbida por la materia en suspensión, por consiguiente, se tuvo que diluir la vinaza al 1%. Sin embargo, a este grado de dilución la muestra seguía dando un valor fuera de escala, por ende, se diluyó a 0.5% para poder obtener un resultado.

Como fue mencionado anteriormente en el color, los compuestos fenólicos recalcitrantes no solo se encargan de proporcionar coloración a la muestra, sino que también tienen influencia en la DQO y como la vinaza de Manuelita mantuvo un reposo de 6 meses, sus características fisicoquímicas cambiaron por acción de las actividades microbianas (Giraldo, 1995). Con base en los datos arrojados en la prueba de DQO, es evidente que la vinaza de Incauca posee un valor mayor a la de Manuelita, para lo cual se puede deducir que en el tiempo de reposo al que estuvo expuesto la vinaza de Manuelita, la descomposición por parte de la microbiota presente generó una disminución en la DQO, puesto que, para el punto de la realización de la prueba, ya se habría degradado gran parte de la materia orgánica presente en el subproducto. Por lo que se refiere a la

vinaza del Ingenio Incauca, como esta no llevaba mucho tiempo de haberse recolectado, existía aún una cantidad considerable de materia orgánica en ella.

Por otro lado, se puede inferir que, en caso de haber funcionado el tratamiento, la muestra no habría reducido la DQO al 100%, en vista de que según Gutiérrez (2009), las sustancias que conforman los compuestos fenólicos recalcitrantes, tales como el ácido gálico, tánico y melanoides, no son degradables por procesos biológicos.

7.3.2. Ensayos de degradación de vinaza con concentración óptima

Para la muestra de Manuelita se realizó un ensayo con discos de hongo y el soporte sin estar inmovilizado, pero debido a que esta prueba no resultó, se realizó un segundo ensayo con la vinaza de Incauca con el soporte ya inmovilizado por el hongo. Sin embargo, este tampoco resultó, lo que significa que no se presentó ningún signo de degradación de este contaminante durante el tiempo y las condiciones estipuladas en la metodología.

Finalizados los 15 días del tratamiento, se analizaron todas las muestras por medio de la observación donde a simple vista se logró percibir que no ocurrió algún tipo de contaminación por parte del montaje, ya que en los controles abióticos de los tratamientos no se presentó la propagación de ningún microorganismo. No obstante, tampoco se presentó un cambio en el color de la vinaza, a razón de esto, se determinaron algunos motivos por los cuales los ensayos no funcionaron. En primer lugar, haciendo referencia a la vinaza de Manuelita, principalmente la prueba no funcionó debido a que la muestra llevaba 6 meses de haber sido recogida a la salida del proceso de destilación, por ende, ya se encontraba en un nivel de descomposición avanzado, lo cual no permitió el crecimiento del microorganismo (Giraldo, 1995).

En segundo lugar, tomando el ensayo de la vinaza de Incauca, también se pudo observar que el color de la muestra no cambió. Sin embargo, esto no es atribuible a la muestra, ya que esta se encontraba en buen estado. Dicho esto, se puede analizar que no se presentó una degradación visual del contaminante por varias razones, como lo es la estandarización del proceso, esto quiere decir que se deben hacer más pruebas hasta alcanzar los resultados esperados, dado que un experimento puro requiere de varios ensayos para poder obtener las condiciones óptimas para un adecuado funcionamiento.

También un motivo se puede deber a la cantidad de los discos que se utilizaron en el montaje para la inmovilización del hongo en los sustratos, ya que en los reportes que se han presentado, la cantidad de discos que usan para la colonización del soporte varía de 10 a 15 discos, de modo que les proporciona una mayor cantidad de biomasa y no permite que esta se inactive fácilmente. Con relación a su tamaño, si se tienen discos pequeños lo más conveniente es tener una cantidad considerable, mientras que si se tienen discos grandes se debe tener una menor cantidad de ellos, lo cual lo convierte en una relación inversamente proporcional, lo mismo sucede con los sustratos (Fernández et al., 2009).

El tamaño y la cantidad de los soportes también es influyente en los resultados, porque al ser de menor tamaño se permite una colonización más completa de todos los utilizados y como se ha reportado, han utilizado referente al fique alrededor de 15 hilos de 5cm de largo, en lo correspondiente a la espuma y al estropajo han sido en torno a 5 cubos de 0.5 cm³, entre otros. Por

consiguiente, los pequeños tamaños de los soportes permiten que haya una mayor cantidad de inmovilizaciones, puesto que habría una mayor cantidad de cada bioportador, lo cual puede generar una mayor remoción por la diversa cantidad de superficies de contacto de la inmovilización, mientras que una sola masa grande de soporte, no posee tanto movimiento como lo tendrían varias masas y así lograr tener más roce con el contaminante (Fernández et ál, 2009; Córdoba & Ospina, 2009; Moreno & Ospina, 2008).

Otra causa pudo haber sido las condiciones a las que se sometió la incubación del ensayo, puesto que en este estudio se trabajó con una temperatura de 26.5° C y agitación de 150 rpm, mientras que en otros artículos la temperatura utilizada oscila en los 30° C y la agitación en los 120-130 rpm. Las variables utilizadas pudieron ocasionar que el hongo no se desarrollara como debía por la falta de temperatura para cumplir con su metabolismo o por la agitación, siendo esta tal vez mucho más rápida de la que puede tolerar el hongo para mantener su adherencia al soporte, generando condiciones de estrés en el microorganismo, lo que pudo haber generado que este se enfocara más en mantener su adhesión al bioportador que en llevar a cabo la degradación del contaminante. Igualmente, el tiempo manejado por algunas investigaciones presentan ciclos de 30 a 40 días para poder visualizar una decoloración del contaminante, en cambio el tiempo utilizado en los ensayos fue de 15 días, de manera que este tipo de experimentos requieren de un período más extenso para notar cambios en consideración a la degradación (Velásquez et ál, 2018; Garzón & Barragán, 2008; Fernández et ál, 2009; Córdoba & Ospina, 2009; Garzón R. , 2009).

Por último, a causa de que no todas las vinazas que se producen son homogéneas, es decir, las características de cada una varían dependiendo la industria en que sea genera; la concentración de dilución a trabajar puede ser diferente en las vinazas, puesto que, por ejemplo, la cantidad de melazas presentes en cada muestra puede ser mayor en una que en otra. Por lo cual, la dilución al 60% como fue trabajada por Velásquez et ál. (2018), tal vez no fue la adecuada para las muestras utilizadas.

8. Conclusiones

La inmovilización del hongo *T. versicolor* DSM 3086 demostró ser eficiente en estropajo común (*Luffa cylindrica*), dado que se obtuvo el mayor crecimiento de biomasa y mayor retención interna de este. Lo que permite concluir que la inmovilización puede ser viable para optimizar procesos de biorremediación por la gran producción de biomasa que se genera en este tipo de soporte y además se facilitarían las condiciones de operación de los tratamientos biológicos al manejar el hongo de forma voluntaria.

Adicionalmente, se comprobó que, el estropajo es el bioportador más eficiente para la contención de biomasa fúngica, debido a su estructura tubular y fibrosa que permiten la inserción de las hifas del microorganismo dentro de sí. Sin mencionar que este crecimiento se ve beneficiado por la gran porosidad, cabida en su interior y los elementos que la componen, ya que estos le ofrecen al hongo los nutrientes y sustratos necesarios para su óptimo desarrollo. Además, a la *Luffa cylindrica* se le atribuyen ciertas ventajas referentes a su valor, puesto que es un material económico, no genera ningún tipo de toxicidad ni reactividad con los contaminantes a tratar, es fácil de manejar y es un material biodegradable que después de su uso, no es considerado como un residuo peligroso ni de difícil disposición.

Cabe mencionar que, en cuestiones de biomasa, se presentó una mayor producción de esta en el control positivo sin soporte, indicando que el hecho de generar una inmovilización disminuye el rendimiento de producción de biomasa del microorganismo. Sin embargo, el manejo del hongo se hace más práctico cuando este se encuentra inmovilizado, por lo que se propone plantear tratamientos de inmovilización con este método.

El hongo *T. versicolor* DSM 3086, presentó mejores resultados de crecimiento fúngico, con respecto a las cepas comparadas, debido a que se trata de una cepa de banco aislada, que ha sido apartada de cualquier contaminante, contacto con cualquier tipo de fauna como hongos, levaduras, bacterias, insectos, entre otros. Lo cual da vía para suponer que el hongo ha mantenido su pureza por medio de tratamientos, conllevando a la mejora de su eficiencia.

Las limitantes que inciden en el óptimo desempeño de la inmovilización del hongo *T. versicolor* en estropajo común, para ser empleada en procesos de biorremediación, son factores asociados al tiempo de degradación, la temperatura, las revoluciones por minuto, el volumen de soporte que se emplee tanto como el número de discos del hongo que se utilicen para determinado tratamiento. Por esto se concluye que es necesario hacer una estandarización del proceso para así asegurar las condiciones de biorremediación óptimas, ya que, al tratarse de un tratamiento tan sensible, con microorganismos, se debe asegurar la sobrevivencia y adecuado funcionamiento de estos.

El aporte de este trabajo a la Ingeniería Ambiental radica en la posible implementación del método para biorremediación de contaminantes, de forma económica, mitigando y previniendo los impactos negativos sobre el recurso hídrico alterado por las industrias, para lograr mejorar la calidad de vida de la comunidad.

9. Recomendaciones

Es importante tener en cuenta en futuros estudios, que la estandarización del método es vital, a causa de que esta homogenización de la metodología permitiría la obtención de excelentes resultados en cuanto a la degradación de la vinaza. Para lo cual se recomienda continuar con la alternativa de tratamientos biológicos como la inmovilización de hongos de podredumbre blanca mediante la optimización de las condiciones a las que se deben exponer, tales como la temperatura, la duración del ensayo, las diferentes concentraciones del contaminante y las revoluciones en el proceso de agitación. Sin embargo, se sugiere que el cultivo de los microorganismos se realice en medio sólido. Por parte de la inmovilización, es recomendable llevar a cabo los inóculos con una mayor cantidad de discos y los soportes de un menor tamaño, pero en mayor cantidad para su óptima colonización.

Realizado el ensayo y obtenidos los resultados ideales en la inmovilización, se recomienda llevar a cabo las pruebas más allá de las pequeñas escalas, como, por ejemplo, incorporar la inmovilización en una columna, en la cual el proceso de biorremediación proceda en su interior. Entrando por la parte superior de dicha columna el efluente, es decir, el contaminante y saliendo por la parte inferior el contaminante degradado. Dentro de la columna se podría encontrar el soporte inmovilizado por el microorganismo encargado de la degradación y dicha estructura debería encontrarse en las condiciones óptimas para su adecuado desarrollo.

Por último, el desarrollo de esta alternativa de biorremediación de la vinaza puede llegar a ser implementada como un tratamiento a la salida del proceso productivo de los ingenios azucareros, permitiendo una reducción en la contaminación de los cuerpos hídricos aledaños a las industrias, una posible disminución en los costos de la empresa y/o ganancias por medio de la implementación de simbiosis industrial, es decir que los residuos de un proceso, en este caso los vertimientos a ser tratados con este tipo de biotecnología, sirvan como insumo para otros procesos; por ejemplo, que el agua degradada logre ser recirculada en otros procesos.

10. Bibliografía

- Alegría, J. R. (5 de Junio de 2013). *BIOTECNOLOGIA Y BIORREMEDIACION*. Obtenido de Universidad de El Salvador :
<http://www.redicces.org.sv/jspui/bitstream/10972/2429/1/biotecnologia%20y%20bioremediacion.pdf>
- APHA et al. (2005). *Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales*. Madrid, España: Diaz de Santos S.A.
- Apohan, E., & Yesilada, O. (2017). Effect of leachate loading rate and incubation period on the treatment efficiency by *T. versicolor* immobilized on foam cubes. *Int. J. Environ. Sci. Tech*, 457 -466.
- APPA. (2018). *¿Qué es la biomasa?* Obtenido de Asociación de Empresas de Energías Renovables :
<https://www.appa.es/appa-biomasa/que-es-la-biomasa/>
- Aretaga, R. (23 de Enero de 2015). Mediciones e incertidumbre.
- Asamblea Nacional Constituyente. (1991). *Constitución Política de Colombia -Actualizada con los Actos Legislativos a 2016*. Obtenido de Corte Constitucional :
<http://www.corteconstitucional.gov.co/inicio/Constitucion%20politica%20de%20Colombia.pdf>
- Asocaña. (2018). *Sector Agroindustrial de la Caña*. Obtenido de Sector Agroindustrial de la Caña:
<http://www.asocana.org/publico/info.aspx?Cid=215>
- Bellón, J. M. (3 de Enero de 2010). *Prueba ANOVA: comparación de las medias de tres o más grupos*. Obtenido de EMEI: <https://epidemiologiamolecular.com/prueba-anova-comparacion-medias-grupos/>
- Campi et al. (2016). *Evaluación del crecimiento de macrohongos de interés biotecnológico en residuos agroindustriales y maderero*. Obtenido de ResearchGate:
https://www.researchgate.net/publication/311729860_Evaluacion_del_crecimiento_de_macrohongos_de_interes_biotecnologico_en_residuos_agroindustriales_y_maderero?enrichId=rgreq-9cec0d84cea965c64c458ee9ec0750cf-XXX&enrichSource=Y292ZXJQYWdlOzMxMTcyOTg2MDtBUzo
- Cano et ál. (2012). DECOLORACIÓN DE CD2 (CAFÉ DIRECTO 2) POR ENZIMAS INTRACELULARES Y EXTRACELULARES DE *Trametes versicolor*. *Interciencia*, 294-298. Obtenido de INTERCIENCIA.
- Chaves, M. (1985). LAS VINAZAS EN LA FERTILIZACION DE LA CAÑA DE AZUCAR. *Boletín Informativo No. 21. Año 3. 1985 y El Agricultor Costarricense 43*, 59-61. Obtenido de DIECA Boletín Informativo No. 21. Año 3. 1985 y El Agricultor Costarricense.
- Congreso de Colombia. (24 de Enero de 1979). *Ley 9 de 1979*. Obtenido de Biblioteca Salud Capital:
http://biblioteca.saludcapital.gov.co/img_upload/03d591f205ab80e521292987c313699c/ley-9-de-1979_1.pdf
- Congreso de Colombia. (9 de Noviembre de 1994). *LEY 165 DE 1994*. Obtenido de Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible (MADS):
http://www.minambiente.gov.co/images/BosquesBiodiversidadyServiciosEcosistemicos/pdf/Politica-Nacional-de-Biodiversidad/3355_ley_0165_091194.pdf
- Córdoba, D., & Ospina, L. (Noviembre de 2009). *SELECCIÓN DE UN CONSORCIO FÚNGICO INMOVILIZADO SOBRE *Furcraea* sp PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES*

- DE LA INDUSTRIA TEXTIL*. Obtenido de Pontificia Universidad Javeriana:
<https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8449/tesis417.pdf?sequence=1>
- DSMZ. (2007). *DSMZ*. Obtenido de DSMZ:
https://www.dsmz.de/?id=329&tx_mnogosearch_pi1%5Bq%5D=malt+extract+agar&tx_mnogosearch_pi1%5Bsubmit%5D=Buscar
- DSMZ. (2018). *Trametes versicolor DSM 3086*. Obtenido de DSMZ:
<https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/dsm-3086.html>
- ESI. (2018). *COMPARAR MEDIAS CON SPSS*. Obtenido de Escuela Superior de Informática:
https://previa.uclm.es/profesorado/raulmmartin/Estadistica/PracticasSPSS/COMPARAR_MEDIAS.pdf
- Fajardo et al. (17 de Octubre de 2011). *Inmovilización de Células y Enzimas*. Obtenido de EADEC:
<http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%206/5.html>
- Fernández et ál. (4 de Junio de 2009). *Inmovilización de hongos ligninolíticos para la remoción del colorante negro reactivo 5*. Obtenido de Biblioteca Digital UNAL:
<https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/10322/38382>
- Fernández et al. (4 de Junio de 2009). *Inmovilización de hongos ligninolíticos para la remoción del colorante negro reactivo 5*. Obtenido de Biblioteca Digital UNAL:
<https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/10322/38382>
- Freire, W. J., & Cortez, L. (2000). Vinhaça de cana-de-açúcar. *Guaíba: Agropecuária*, 203.
- French, E., & Hebert, T. (1980). *Metodos de Investigación Fitopatologica*. San José, Costa Rica: Editorial IICA.
- Gamboa, M., & Heredia, G. (2010). Bacterias y hongos microscópicos. En C. d. -CICY, *BIODIVERSIDAD Y DESARROLLO HUMANO EN YUCATÁN* (págs. 168-169). Yucatán, México: CONABIO.
- García, J. L., & Martínez, M. J. (2014). Biomasa y Biotecnología. *SEM@foro*, 45-47.
- García, Q. (30 de Octubre de 2014). *Curva del Crecimiento*. Obtenido de Blogspot:
<http://microbiologia3bequipo5.blogspot.com/2014/10/curva-del-crecimiento.html>
- Garzón. (Enero de 2009). *CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DE COLORANTES TEXTILES DE DIFERENTES CLASES QUÍMICAS POR HONGOS Y BACTERIAS IMOVILIZADOS SOBRE FIBRA DE Agave tequilana Webber var. Azul*. Obtenido de Pontificia Universidad Javeriana:
<http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis217.pdf>
- Garzón et ál, J. (11 de Agosto de 2017). *Aporte de la biorremediación para solucionar problemas de contaminación y sue contaminación y su*. Obtenido de Universidad Distrital Francisco José de Caldas: <http://www.scielo.org.co/pdf/reus/v19n2/0124-7107-reus-19-02-00309.pdf>
- Garzón, C., & Barragán, B. E. (2008). INMOVILIZACIÓN MICROBIANA: TECNICAS Y USOS EN EL TRATAMIENTO DE RESIDUOS TÓXICOS. *Revista Sistemas Ambientales* , 23-34. Obtenido de Pontificia Universidad Javeriana.
- Garzón, R. (Enero de 2009). *CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DE COLORANTES TEXTILES DE DIFERENTES CLASES QUÍMICAS POR HONGOS Y BACTERIAS IMOVILIZADOS SOBRE FIBRA DE Agave tequilana Webber var. Azul*. Obtenido de Pontificia Universidad Javeriana:
<http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis217.pdf>
- Giraldo, G. I. (1995). *MANUAL DE ANÁLISIS DE AGUAS*. Obtenido de Biblioteca Digital UNAL:
<http://bdigital.unal.edu.co/50540/1/manualdeanalisisdeaguas.pdf>
- González et ál. (1994). ELIMINACIÓN DEL COLOR DEL AGUA RESIDUAL PROCEDENTE DE LA FERMENTACIÓN DE MELAZAS CON TRAMETES VERSICOLOR . *INFORMACIÓN TECNOLÓGICA -CIT*, 65-68.

- Gravenhorst, H. (5 de Octubre de 2013). *¿Qué es la planta de Fique?* Obtenido de Tejido Texturizado: <https://tejidotexturizado.wordpress.com/queeslaplantadefique/>
- Grupo Sacsa. (14 de Septiembre de 2016). *¿Qué es la biotecnología?* Obtenido de SACSA- Servicios Agropecuarios de la Costa : <http://www.gruposacsa.com.mx/que-es-la-biotecnologia/>
- Gutiérrez et ál. (Enero de 2009). *Ultrafiltración de vinazas provenientes de destilerías de etano.* Obtenido de ReserchGate: https://www.researchgate.net/publication/277868168_Ultrafiltracion_de_vinazas_provenientes_de_destilerias_de_etanol
- Gutiérrez et al. (Enero de 2009). *Ultrafiltración de vinazas provenientes de destilerías de etano.* Obtenido de ReserchGate: https://www.researchgate.net/publication/277868168_Ultrafiltracion_de_vinazas_provenientes_de_destilerias_de_etanol
- HACH. (Abril de 2015). *2100N IS.* Obtenido de HACH.
- HANNA. (2018). *Manual de Instrucciones HI 4221 y HI 4222.* Obtenido de HANNA: https://cdn.hannachile.com/hannacdn/support/manual/2012/10/20140707120257-manual_hi4221_hi4222.pdf
- IBM. (2018). *Análisis de Varianza (ANOVA).* Obtenido de IBM: [https://www.ibm.com/support/knowledgecenter/es/SS4QC9/com.ibm.solutions.wa_an_overview.2.0.0.doc/analysis_of_variance_\(anova\).html](https://www.ibm.com/support/knowledgecenter/es/SS4QC9/com.ibm.solutions.wa_an_overview.2.0.0.doc/analysis_of_variance_(anova).html)
- IES DOMINGO MIRAL. (2010). *Concepto, escala y medida del pH.* Obtenido de IES DOMINGO MIRAL: http://www.iesdmjac.educa.aragon.es/departamentos/fq/temasweb/QUI2BAC/QUI2BAC%20Tema%204%20Equilibrios%20acido-base/4_concepto_escalaymedida_delpH.html
- Iqbal, M., & Saeed, A. (Febrero de 2006). *Entrapamiento de hifas fúngicas en red estructural estructurada de Madera de papaya para producir un biosorbente único para la eliminación de metales pesados.* Obtenido de ScienceDirect: https://www.academia.edu/36269418/Entrapment_of_fungal_hyphae_in_structural_fibrous_network_of_papaya_wood_to_produce_a_unique_biosorbent_for_the_removal_of_heavy_metals
- Jimenez, A. (2000). *DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE CALIDAD DE LAS AGUAS.* Obtenido de Universidad Carlos III de Madrid : <http://ocw.uc3m.es/ingenieria-quimica/ingenieria-ambiental/otros-recursos-1/OR-F-001.pdf>
- Jung, K. (1999). Molecular phylogeny of *Trametes* and related genera. *Antonie Van Leeuwenhoek.* , 191-9.
- Kourkoutas et ál. (Agosto de 2004). *Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review.* Obtenido de ScienceDirect: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002003001072>
- Kourkoutas et al. (Agosto de 2004). *Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review.* Obtenido de ScienceDirect: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002003001072>
- Laimé et al. (2011). Technological possibilities for the disposal of vinasse: a review. *Tropical ciências agrárias e biológicas*, 5-29.
- MADS & DNP. (s.f.). *POLÍTICA NACIONAL DE BIODIVERSIDAD.* Obtenido de Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible (MADS): http://www.minambiente.gov.co/images/BosquesBiodiversidadyServiciosEcosistemicos/pdf/Nota%20Informativa/Políticas/politica_nacional-biodiversidad.pdf
- MADS. (18 de Diciembre de 1974). *DECRETO 2811 DEL 18 DE DICIEMBRE DE 1974.* Obtenido de Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible:

- http://www.minambiente.gov.co/images/GestionIntegraldelRecursoHidrico/pdf/normativa/Decreto_2811_de_1974.pdf
- Martín Ramírez, I. d. (4 de Febrero de 2017). *Inmovilización de Thiobacillus thioparus sobre espuma de poliuretano para la eliminación de H₂S de efluentes gaseosos*. Obtenido de ResearchGate: [https://www.researchgate.net/publication/313301743_Inmovilizacion_de_Thiobacillus_thioparus_sobre_espuma_de_poliuretano_para_la_eliminacion_de_H₂S_de_efluentes_gaseosos](https://www.researchgate.net/publication/313301743_Inmovilizacion_de_Thiobacillus_thioparus_sobre_espuma_de_poliuretano_para_la_eliminacion_de_H2S_de_efluentes_gaseosos)
- Martínez et ál. (2005). EFECTO DE LA GLUCOSA Y NITRATO DE AMONIO SOBRE LAS ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS PRODUCIDAS POR *Trametes versicolor* INMOVILIZADO EN ESPUMA Y LA DECOLORACIÓN DE UN EFLUENTE PAPELERO EN UN BIORREACTOR DE LECHO FLUIDIZADO. *UNIVERSITAS SCIENTIARUM Revista de la Facultad de Ciencias*, 27-36.
- Mateos, P. (2018). *CRECIMIENTO MICROBIANO*. Obtenido de Universidad de Salamanca: <http://webcd.usal.es/Web/educativo/micro2/tema07.html>
- Méndez, F. J. (2013). *EVALUACION PRELIMINAR DE LA REMOCION DE COLOR EN AGUAS DE DESCARGA PRODUCTO DEL PROCESO DE CURTIDO DE PIELS USANDO EL HONGO Phanerochaete chrysosporium EN CURTIEMBRES CAMELO*. Obtenido de Universidad de Manizales: <http://ridum.umanizales.edu.co:8080/jspui/bitstream/6789/606/1/trabajo%20de%20grado%20M%C3%A8ndez-C%20Francy%20J.pdf>
- Mihelcic, J. R., & Zimmerman, J. B. (2012). *Ingeniería ambiental: fundamentos, sustentabilidad, diseño*. Alfaomega.
- Ministerio de Salud. (10 de Marzo de 1998). *Decreto 475 de 1998*. Obtenido de Ministerio de Salud: https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/DECRETO%200475%20DE%201998.PDF
- Minitab. (2017). *Explicación Análisis de medias*. Obtenido de Minitab: <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/anova/supporting-topics/basics/understanding-analysis-of-means/>
- Minitab. (2017). *Interpretar todos los estadísticos y gráficas para Mostrar estadísticos descriptivos*. Obtenido de Minitab: <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/statistics/basic-statistics/how-to/display-descriptive-statistics/interpret-the-results/all-statistics-and-graphs/>
- Moreno, N., & Ospina, X. (28 de Noviembre de 2008). *EVALUACIÓN DE INDUCTORES METÁLICOS Y CO-SUSTRATOS PARA LA REMOCIÓN DE NEGRO REACTIVO 5 EMPLEANDO Pleurotus ostreatus INMOVILIZADO EN FIQUE*. Obtenido de Pontificia Universidad Javeriana: <http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis222.pdf>
- Oliveira et al. (2011). Technological possibilities for the disposal of vinasse: a review. *Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas*, 16-29.
- Peña González, J. (2017). *Procesos de Biorremediación en el tratamiento de residuos sólidos de cigarrillo*. Obtenido de Biblioteca Digital UNAL: <http://bdigital.unal.edu.co/61353/7/jeimmyroxanape%C3%B1agonzalez.2017.pdf>
- Pereira-Martinez et ál. (2017). Empleo del estropajo común (*Luffa cylindrica*) en la remoción de contaminantes. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 205-215.
- Pereira-Martinez et al. (2017). Empleo del estropajo común (*Luffa cylindrica*) en la remoción de contaminantes. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 205-215.
- Pérez, J. L. (20 de Diciembre de 2012). *ANOVA*. Obtenido de Blog Curso de Estadística: <https://estadisticaorquestainstrumento.wordpress.com/2012/12/20/tema-15-anova/>

- Pérez, M. (2018). *Matriz Comparativa*. Obtenido de UAEH:
https://www.uaeh.edu.mx/docencia/VI_Lectura/LITE/LECT65.pdf
- Piacente. (2005). Agroindustria canaveira o sistema de gestao ambiental: o caso das usinas localizadas nas bacias hidrográficas dos ríos Piracicaba, Capivari e Jundiaí. *UNICAMP*, 181.
- PNUD. (2018). *Objetivos del Desarrollo Sostenible* . Obtenido de PNUD:
<http://www.undp.org/content/undp/es/home/sustainable-development-goals.html> [Accessed 24 Aug. 2018].
- PQBio. (2018). *BIOTECNOLOGÍA, UNA HISTORIA....* Obtenido de PQBio:
https://www.agroindustria.gov.ar/sitio/areas/escuelagro/_archivos//000001_Biotecnologia-%20innovaciones%20sustentables/000000_Informacion%20general%20sobre%20Biotecnologia/000000_Manuales,%20debate,%20material%20de%20Agroindustria/000000_Biotecnolog%C3%AD
- Presidencia de la República. (25 de Octubre de 2010). *Decreto 3930 de 2010*. Obtenido de Parque Arvi: <http://parquearvi.org/wp-content/uploads/2016/11/decreto-3930-de-2010.pdf>
- PUJ. (2018). *Microorganismos* . Obtenido de Pontificia Universidad Javeriana- Bogotá:
<http://ciencias.javeriana.edu.co/investigacion/colecciones-biologicas/microorganismos>
- Rodríguez et ál. (2003). Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus* spp. *Revista Iberoamericana de Micología*, 164-168. Obtenido de ResearchGate.
- Rodríguez Pérez et ál. (2017). Determinación de biomasa fúngica y su utilidad en procesos biotecnológicos. *Revista de química teórica y aplicada*, 60-67.
- Rodríguez, C. H. (28 de Diciembre de 2007). *DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO POR REFLUJO CERRADO Y VOLUMETRIA*. Obtenido de IDEAM:
<http://www.ideam.gov.co/documents/14691/38155/Demanda+Qu%C3%ADmica+de+Ox%C3%ADgeno..pdf/20030922-4f81-4e8f-841c-c124b9ab5adb>
- Saetang, J., & Babel, S. (2009). Effect of leachate loading rate and incubation period on the treatment. *Int. J. Environ. Sci. Tech*, 457-466.
- Salvucci, E. (2018). *CRECIMIENTO MICROBIANO*. Obtenido de Wordpress:
<https://esalvucci.wordpress.com/crecimiento-microbiano/>
- Sampieri, R. H. (2014). *Metodología de la Investigación* . Ciudad de México: McGraw Hill.
- Secretaría de Salud. (20 de Octubre de 2015). *DETERMINACION DE COLOR APARENTE EN AGUAS*. Obtenido de Departamento del Meta:
<https://www.meta.gov.co/web/sites/default/files/adjuntos/P-SA-84%20DETERMINACION%20DE%20COLOR%20APARENTE%20EN%20AGUAS%20V1.pdf>
- Steffen et al. (2000).). Mineralisation of ¹⁴C-labelled synthetic lignin and ligninolytic enzyme activities of litter-decomposing basidiomycetous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 819-825.
- Tapie, W. A. (Enero de 2015). *Evaluación in vitro del tratamiento de la vinaza de caña de azúcar con Pleurotus ostreatus en producción animal*. Obtenido de Research Gate:
https://www.researchgate.net/publication/317017044_Evaluacion_in_vitro_del_tratamiento_de_la_vinza_de_cana_de_azucar_co_Pleurotus_ostreatus_en_produccion_anima
- Torres et al. (s.f). *EVALUACION DE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO RADIAL Y BIOMASA DE HONGOS FILAMENTOSOS DESARROLLADOS EN DI (2-ETILHEXIL) FTALATO AISLADOS DE UNA INDUSTRIA PRODUCTORA DE PAPEL* . Obtenido de SMBB:
<https://smbb.mx/congresos%20smbb/queretaro11/TRABAJOS/trabajos/IV/carteles/CIV-50.pdf>

- Universidad de Valencia. (2018). *El test U de Wilcoxon, Mann y Whitney para la comparación de dos muestras independientes*. Obtenido de Universidad de Valencia:
<https://www.uv.es/ceaces/tex1t/7%20no%20para/Mann.htm>
- UPO. (Mayo de 2004). *DETERMINACIÓN DE MATERIA ORGÁNICA*. Obtenido de UPO:
https://www.upo.es/depa/webdex/quimfis/docencia/TAQ/curso0405/TAQP4_0405.pdf
- Vargas Naranjo, S. A. (2014). *Efecto del nivel de inclusión y concentración de vinaza de caña (Saccharum officinarum) sobre los parámetros de fermentativos y calidad nutricional de un ensilaje de maralfalfa (Penissetum sp.)*. Obtenido de Biblioteca Digital UNAL:
<http://bdigital.unal.edu.co/49770/1/1017129737.2015.pdf>
- Velásquez et ál. (2018). Evaluation of a mixed simultaneous vinasse degradation treatment using Komagataeibacter kakiaceti GM5 and Trametes versicolor DSM 3086. *Ecotoxicology and Environmental Safety* , 425-433.
- Velásquez et al. (2018). Evaluation of a mixed simultaneous vinasse degradation treatment using Komagataeibacter kakiaceti GM5 and Trametes versicolor DSM 3086. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 425-433.
- Zuñiga, A., & Gandini, M. (2013).). Mineralisation of 14C-labelled synthetic lignin and ligninolytic enzyme activities of litter-decomposing basidiomycetous fungi. . *DYNA*, 124-131.
- Zúñiga, V., & Gandini, M. A. (8 de Enero de 2013). *CARACTERIZACIÓN AMBIENTAL DE LAS VINAZAS DE RESIDUOS DE CAÑA DE AZÚCAR RESULTANTES DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL*. Obtenido de Biblioteca Dígital UNAL:
<https://revistas.unal.edu.co/index.php/dyna/article/view/27518/43731>