

## Artículo

# Remediación de la vinaza y el licor negro mediante tratamiento combinado de foto-Fenton y hongos de pudrición blanca

Elizabeth M. Pérez-Pérez, María Fernanda Potentini, Elisa Araujo y Antonio Rodríguez-Malaver

**Resumen.** La purificación de las aguas residuales provenientes de los procesos industriales es un problema de interés en nuestra sociedad actual, debido a la cantidad de desechos producidos y a la disminución de las fuentes de agua potable. Por esta razón, es necesario el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan la purificación de efluentes altamente contaminantes y tóxicos, como los provenientes de la industria de la pulpa y el papel (licor negro, LN) y de la industria destilera (vinaza). En este trabajo se llevó a cabo la combinación de los procesos biodegradativos de *Trametes elegans* y *Phanerochaete chrysosporium* con la metodología de foto-Fenton, alternando las secuencias de combinaciones de tratamiento fotoquímico-biológico y biológico-fotoquímico. Se encontró que para las muestras de vinaza y LN la secuencia de tratamiento más efectiva fue foto-Fenton/tratamiento biológico, lo cual concuerda con otros sistemas en que el proceso de foto-Fenton es usado como pre-tratamiento.

**Palabras clave.** Licor negro. Vinaza. Foto-Fenton. *Phanerochaete chrysosporium*. *Trametes elegans*.

Remediation of vinasse and black liquor by combined treatment of photo-Fenton and white rot fungi

**Abstract.** Wastewater purification from industrial processes is very interesting problem in our society, due to the large amount of waste produced and the decrease of potable water. It is therefore necessary develop new technologies to purify the highly toxic and polluting wastewaters, such as those from the pulp and paper (black liquor, BL) and distillery industry (vinasse). This work was carried out the combination of biodegradatives processes of *Trametes elegans* and *Phanerochaete chrysosporium* with photo-Fenton methodology, alternating following treatment sequences photochemical-biological and biological-photochemical. Was found that for vinasse and BL samples the sequence more effective was photo-Fenton/biological treatment, which is in agreement with other systems in which the photo-Fenton process is used as pre-treatment.

**Key words.** Black liquor. Vinasse. Photo-Fenton. *Phanerochaete chrysosporium*. *Trametes elegans*.

## Introducción

Uno de los problemas ambientales actuales más preocupantes es la escasez de fuentes de agua potable. Se ha calculado que al menos una quinta parte de la población mundial carece de agua potable, y por lo menos la mitad no posee las instalaciones sanitarias adecuadas. Este problema se agrava al saber que en la mayoría de las ciudades de los países en vías de desarrollo, el 80-90% de las aguas residuales no

tratadas se descargan en ríos y lagunas, fuentes de agua que son usadas para la alimentación y limpieza (Shiklomanov 1996, Dudgeon 2000). Dentro de estas aguas residuales se encuentran la vinaza y el licor negro (LN) (Tibbets 2000).

El LN es un efluente producido durante el proceso *kratf* en la industria de procesamiento de la pulpa y el papel. Es una combinación de residuos de lignina y los reactivos químicos usados para la extracción, principalmente NaOH y Na<sub>2</sub>S (Sarkanen, 1997). Este efluente se descarga directamente en los cuerpos de agua, aunque en algunos casos es recuperado químicamente. Sin embargo, los procesos de recuperación convencionales no son económicamente viables para industrias pequeñas o para aquellas que utilizan materias primas diferentes a la madera. Por estas razones, el LN es considerado como un agua residual peligrosa, altamente tóxica, coloreada y escasamente biodegradable (Sarkanen 1997). Por otra parte, las aguas residuales de la industria destilera, llamadas vinazas, poseen altos contenidos de materia orgánica, son altamente coloreadas y presentan valores de pH inferiores a 4,0, por lo que son difíciles de tratar por medio de los procedimientos biológicos convencionales (ICIDCA 1990).

Normalmente, las aguas residuales son procesadas por medio de plantas de tratamiento biológico o por absorción en lagunas activadas, o a través de tratamientos químicos convencionales (oxidación térmica, cloración, ozonación, etc.). Sin embargo, en algunos casos, como el de la vinaza y el LN, estos procedimientos resultan ineficientes en disminuir la carga orgánica del efluente. En estos casos, se puede hacer uso de lo que se conoce como procesos de oxidación avanzada (POAs), los cuales son muy pocos conocidos en América Latina y se han usado en países industrializados para la remediación de efluentes con elevada carga orgánica, contenido de color y de compuestos fenólicos tóxicos (Chong *et al.* 2010).

Uno de los POAs más estudiados es la reacción de Fenton, descubierta hace unos 100 años pero extensamente utilizada solo en los últimos 30 años (Huang *et al.* 1993). La reacción de Fenton consiste en la disociación del agente oxidante y la formación del altamente reactivo radical hidroxilo, el cual ataca y degrada la materia orgánica, según el mecanismo presentado en la Ecuación 1 (Huston y Pignatello 1999, Neyens y Baeyens 2003). La reacción de Fenton puede ser más catalítica si se realiza la fotoreducción de uno de sus productos, el Fe(III), en la región cercana al UV del espectro de luz, en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de acuerdo a la Ecuación 2 (Huston y Pignatello 1999).



Este proceso foto-activado es conocido como foto-Fenton y ha sido usado extensamente en la remediación de una gran variedad de aguas residuales (Wu *et al.* 1999, Rodríguez *et al.* 2000, Chen *et al.* 2001, Gernjak *et al.* 2003, Galvao *et al.* 2006, de Oliveira *et al.* 2007, Xu *et al.* 2007), y otros tipos de contaminantes especiales como TNT (Yardin y Chiron 2006), aguas residuales de refinerías (Coelho *et al.* 2006) y explosivos (Liou *et al.* 2003).

Por otra parte, desde la década de 1980, se ha propuesto el uso de hongos de pudrición blanca como una alternativa para llevar a cabo la decoloración de efluentes y la degradación de xenobióticos y compuestos recalcitrantes (Murugesan *et al.* 2003, Wsenberg *et al.* 2003, Field y Sierra-Alvarez 2008, Gao *et al.* 2010). Este tipo de hongos efectúan sus reacciones de degradación gracias a un sistema enzimático extracelular de carácter no específico, capaz de escindir una amplia variedad de enlaces, degradando de este modo una amplia gama de compuestos orgánicos. *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* y *Pleurotus* spp. son los hongos identificados con mayores potenciales para ser usados en procesos de bioremediación (Rodríguez *et al.* 2003), debido a que pueden degradar efluentes altamente contaminantes a bajos costos de aplicación (Aust y Benson 1993). El amplio rango de contaminantes que son capaces de degradar incluye pesticidas poliaromáticos, hidrocarburos, algunos colorantes, TNT y otros nitroexplosivos, además de otros compuestos tóxicos como cianuro, azidas, tetracloruro y pentaclorofenol (Aust y Benson 1993).

Debido al alto poder contaminante de la vinaza y el LN, se ha desarrollado una amplia variedad de métodos de tratamiento. Para el LN, se encuentran diversos procesos de oxidación avanzada ( $O_3/UV$ ,  $O_3/UV/ZnO$ ,  $O_3/UV/TiO_2$ ,  $O_2/UV/ZnO$ ,  $O_2/UV/TiO_2$ ) (Yeber *et al.* 1999), tratamientos con algas (Tarlan *et al.* 2002), tratamiento con reactores anaerobios (Buzzini *et al.* 2005), tratamientos bajo condiciones de digestión aerobia (Bishnoi *et al.* 2006), oxidación electroquímica (Buzzini *et al.* 2006), entre otros. En el caso de la vinaza, se ha desarrollado el tratamiento integrado ozono-tratamiento biológico (Beltran *et al.* 1999), tratamiento con las bacterias *Xanthomonas fragariae*, *Bacillus megaterium* y *Bacillus cereus* (Jain *et al.* 2001), tratamiento con ultrasonido (Sangave y Pandit 2004), decoloración por medio de hongos de pudrición blanca termo tolerantes (Chairattanananokorn *et al.* 2005), digestión anaeróbica (Moletta 2005) y tratamiento enzimático (Sangave y Pandit 2006). Sin embargo, ninguna de estas secuencias de tratamiento logra disminuir la materia orgánica de estos efluentes hasta los valores aceptados en las regulaciones ambientales vigentes, por lo cual es necesario diseñar secuencias de tratamiento más efectivas.

En vista de lo mencionado anteriormente, en este trabajo se realizó la estandarización de la aplicación de un sistema combinado entre foto-Fenton y los hongos de pudrición blanca *P. chrysosporium* y *T. elegans* para el tratamiento de la vinaza y el licor negro, con el propósito de explorar mejores alternativas para el tratamiento de efluentes.

## Materiales y Métodos

Los parámetros físico-químicos de las muestras de vinaza y LN se resumen en la tabla 1. Ambos efluentes exhibieron bajos valores de  $DBO_5$ , alta  $DQO$  y eran muy coloreados. La relación  $DBO_5/DQO$  ha sido utilizada por muchos autores como un índice de biodegradabilidad de las aguas residuales, pudiendo este índice tomar los

siguientes valores: >0,8 muy biodegradable, entre 0,7–0,8 biodegradable, 0,3–0,7 poco biodegradables, y 0,3 muy poco o no biodegradable (Vlyssides *et al.* 1999, Rodríguez *et al.* 2000, Jefferson *et al.* 2004, Dhadse *et al.* 2010). La relación DBO<sub>5</sub>/DQO fue de 0,23 y 0,02 para la vinaza y el LN, respectivamente, lo que indica que dichos efluentes son muy poco o no biodegradables.

Se emplearon muestras de LN al 10% (p/v) de sólidos disueltos provenientes de la fábrica de papel Smurfit-Mocapel, ubicada en la carretera de San Felipe-Morón (Yaracuy, Venezuela). La extracción de la pulpa en esta fábrica se basa en la actualidad en el proceso *kraft* y la fuente vegetal es el pino caribe (*Pinus caribaea*). La fábrica reportó que las muestras de LN contenían 10% (p/v) de sólidos disueltos. Las muestras de LN estaban compuestas esencialmente por materia orgánica. El contenido orgánico estaba formado por lignina *kraft* al 8,21% (p/v).

Tabla 1. Parámetros físico-químicos de las muestras de vinaza y LN. (DQO= demanda química de oxígeno; DBO= demanda biológica de oxígeno)

Parámetro	Vinaza	Licor Negro
pH	3,9±0,3	12,5±0,3
Densidad (g/ml)	1,008±0,001 <i>a</i>	1,033±0,001 <i>a</i>
Fenoles (mg/l)	5.245±655	9.350±655
DBO <sub>5</sub> (mg/l)	10.799±327	1.866±294
DQO (mg/l)	38.000–55.000±718	75.000–110.000±2.395
Relación DBO <sub>5</sub> /DQO	0,23±0,01	0,02±0,00

Media±DE (n= 6). Los valores en la misma fila que comparten la misma letra no son estadísticamente diferentes de acuerdo a test de comparación múltiple de Newman-Keuls (p <0,05).

Las muestras de vinaza se obtuvieron de la destilería Campo Elías (Mérida, Venezuela), una industria que utiliza melaza de caña como materia prima para la producción de etanol y genera vinaza como agua residual. Las muestras se tomaron de un contenedor que recibe vinaza caliente (70 °C), fueron embotelladas y mantenidas en refrigeración (4 °C). La vinaza contiene agua y una gran cantidad de minerales y materia orgánica.

El contenido total de fenoles fue determinado por espectrofotometría a 765 nm, utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma, EE.UU.). A cada muestra de 250 l pura o diluida, se le agregaron 1,25 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu (diluido 1/10). Esta mezcla fue agitada y se incubó durante 3 min a temperatura ambiente (TA). A continuación, se añadió 1 ml de carbonato de sodio 7% (p/v) y se agitó vigorosamente. Fue registrada la absorbancia a 765 nm en un Espectrofotómetro UV/Vis Genova Plus (JenWay), después de 2 h de incubación a TA, contra un blanco preparado con agua. La concentración total de fenoles se determinó mediante una curva de calibración utilizando fenol puro como estándar. Para ello, la solución madre de fenol se preparó a 2 g/l, a partir de la cual se prepararon diluciones de 10, 20, 50, 100 y 200 mg/l.

Con el fin de determinar la demanda química de oxígeno (DQO) de la vinaza y el LN, a 2,5 ml de muestra se le añadieron 1,5 ml de la solución de digestión (25 mM de dicromato de potasio y 100 mM de sulfato de mercurio) y 3,5 ml de ácido sulfúrico con 32 mM de sulfato de plata. Las muestras se incubaron durante 2 horas a 150 °C en un reactor COD HACH (modelo 45600) y se midió la absorbancia a 600 nm en el Espectrofotómetro HACH (Modelo DR/2500). Para calcular la DQO (mg/l) se realizó una curva de calibración utilizando biftalato de potasio como estándar, a concentraciones de 100, 200, 400, 600 y 900 mg/l. Antes de determinar la DQO fue necesario eliminar el peróxido de hidrógeno presente en la muestra, añadiendo 10 mg de óxido de manganeso, incubándolas por 15–20 min y filtrándolas a través de un filtro Millipore de 0,22 m.

La remoción de color fue determinada por el método descrito por Livernoche *et al.* (1983). Cada muestra fue diluida en tampón tetraborato de sodio 20 mM (pH 9,1). La muestra diluida fue centrifugada a 3000 xg por 10 min. Finalmente se midió la absorbancia a 440 nm en un Espectrofotómetro UV/Vis Genova Plus (Jenway), y se determinó la remoción de color de acuerdo a la ecuación:

$$\% \text{ Remoción color} = \frac{(\text{D.O. 440 Muestra sin tratamiento} - \text{D.O. 440 Muestra tratada}) \times 100\%}{\text{D.O.440 Muestra sin tratamiento}}$$

Los hongos *P. chrysosporium* y *T. elegans* se mantuvieron en medio sólido maltaagar, en placas de Petri estériles. El medio líquido de crecimiento, denominado HCM, contenía (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/l, KCl 0,5 g/l, MgSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O 0,2 g/l, CaCl<sub>2</sub> 0,1 g/l (Colubaly *et al.* 2003) y glucosa 10 g/l. La vinaza y el LN se utilizaron como medio de cultivo para los hongos de pudrición blanca durante 32 días, (previa esterilización a 100 °C durante 15 min), a temperatura ambiente (TA) para *T. elegans* y a 39 °C para *P. chrysosporium*. Los valores iniciales de pH de las muestras de vinaza y LN fueron de 5 y 5,5, respectivamente. Los hongos fueron inoculados en una proporción 3:1 (3 ml de medio/1 ml de inóculo en medio HCM, después de 15 días de crecimiento). Para el seguimiento del proceso biodegradativo se midieron la concentración de fenoles, color y DQO al final del tratamiento.

La vinaza y el LN fueron tratados usando el método de foto-Fenton durante 120 min, con iluminación continua con una lámpara de luz UV de 120 Watts y 325 nm. Para las muestras de vinaza se usaron concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y sulfato ferroso de 1,5 y 0,015 M, respectivamente, a un pH inicial de 3,0. Para las muestras de LN se usaron concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y sulfato ferroso de 1 y 0,002 M, respectivamente, a un pH inicial de 9,0. Para la integración del proceso de foto-Fenton y la biodegradación de *T. elegans* y *P. chrysosporium*, en el tratamiento de la vinaza y el LN, las muestras de ambas fueron tratadas con las siguientes secuencias de los procesos químicos y biológicos: foto-Fenton/biodegradación y biodegradación/foto-Fenton. Para evaluar la efectividad del proceso, se determinaron la concentración de fenoles, la DQO y el porcentaje de remoción de color, reportándose los porcentajes de remoción de los tres parámetros.

Cada experiencia fue llevada a cabo al menos por triplicado. Los datos fueron analizados usando el Análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) y el test de comparación múltiple Newman-Keuls (Graph PAD Prism package, version 2.01, GraphPad Software Incorporated).

## Resultados

En la tabla 2 se resumen los porcentajes de remoción de contenido de fenoles, DQO y color de las muestras de vinaza y LN tratadas independientemente con los hongos de pudrición blanca *Trametes elegans* y *Phanerochaete chrysosporium*. En el caso del tratamiento de la vinaza con *T. elegans* y *P. chrysosporium* se observó que ambos hongos producen porcentajes de remoción de color, fenoles y DQO muy similares, siendo los reportados para *T. elegans* 53,6; 79,6 y 32,9%, respectivamente; y para *P. chrysosporium* 48,6; 79,6 y 33,9%. Es importante destacar que el análisis estadístico permite afirmar que no existen diferencias significativas entre los porcentajes de remoción de fenoles y DQO de las muestras de vinaza tratadas con ambos hongos, mientras que los porcentajes de remoción de color son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). En cuanto al tratamiento biológico del LN, se alcanzaron porcentajes de remoción de los parámetros en estudio muy superiores, en el orden del doble, usando al hongo de pudrición blanca *T. elegans*, en comparación con los porcentajes obtenidos con *P. chrysosporium* (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentajes de remoción de color, contenido de fenoles y DQO de las muestras de vinaza y LN tratadas con *T. elegans* y *P. chrysosporium*.

Efluente	Parámetro	Porcentaje de remoción (%)	
		<i>T. elegans</i>	<i>P. chrysosporium</i>
Vinaza	Color	53,6±0,1	48,6±0,9
	Fenoles	79,6±0,9a	79,6±0,8a
	DQO	32,9±0,9a	33,9±1,10a
Licor Negro	Color	66,6±0,5	29,3±0,7
	Fenoles	65,2±0,9	39,4±0,9
	DQO	78,7±0,2	36,8±0,7

Media±DE (n= 6). Los valores en la misma fila que comparten la misma letra no son estadísticamente diferentes de acuerdo a test de comparación múltiple de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ).

Los resultados de los tratamientos combinados de las muestras de vinaza y LN con *Trametes elegans* y *Phanerochaete chrysosporium* y foto-Fenton, para el establecimiento de la secuencia más efectiva para el tratamiento de estas aguas residuales son mostrados en las tablas 3 y 4. En líneas generales, los porcentajes de remoción obtenidos con el post-tratamiento con *T. elegans* fueron superiores a los alcanzados con el tratamiento con *P. chrysosporium*.

En el caso de la vinaza (Tabla 3), la secuencia más eficiente para la remoción de color y DQO fue el pre-tratamiento con foto-Fenton y post-tratamiento con *T. elegans*,

aunque es la secuencia contraria (*T. elegans*/foto-Fenton), la que produce los mayores porcentajes de remoción del contenido de fenoles. En lo que se refiere al tratamiento de la vinaza con *P. chrysosporium*, se obtuvieron los mayores porcentajes de remoción de color con la combinación foto-Fenton/*P. chrysosporium*, mientras que para la DQO y el contenido de fenoles la combinación más efectiva fue *P. chrysosporium*/foto-Fenton (Tabla 3).

Tabla 3. Porcentajes de remoción de color, contenido de fenoles y DQO de las muestras de vinaza tratadas con diferentes secuencias de tratamientos con *Trametes elegans*, *Phanerochaete chrysosporium* y foto-Fenton.

Tratamiento	Porcentaje de remoción (%)		
	Color	Fenoles	DQO
<i>T. elegans</i>	55,6±0,2	79,6±0,4	32,9±0,9a
foto-Fenton/ <i>T. elegans</i>	94,8±0,2	95,6±0,8a	68,8±1,1b
<i>T. elegans</i> /foto-Fenton	81,0±0,6	99,6±0,8	66,6±1,3b
<i>P. chrysosporium</i>	46,3±0,9	75,7±0,5	33,9±1,1a
foto-Fenton/ <i>P. chrysosporium</i>	89,9±0,8	90,7±0,5	57,5±1,2
<i>P. chrysosporium</i> /foto-Fenton	69,3±0,8	95,6±0,2a	79,1±1,0

Media±DE (n= 6). Los valores en la misma columna que comparten la misma letra no son estadísticamente diferentes de acuerdo a test de comparación múltiple de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ).

Los resultados de la combinación de procesos químicos y biológicos para el tratamiento de muestras de LN son presentados en la tabla 4. Con respecto a la combinación de los procesos biodegradativos de *T. elegans* con la metodología de foto-Fenton, se observó que los mayores porcentajes de remoción de fenoles y DQO son obtenidos con la secuencia foto-Fenton/*T. elegans*, mientras que para el color la más efectiva fue *T. elegans*/foto-Fenton (Tabla 4). La secuencia foto-Fenton/*P. chrysosporium* resultó ser la más efectiva para la reducción del contenido de fenoles, DQO y color de las muestras de LN (Tabla 4). En líneas generales, el proceso de foto-Fenton parece ser más efectivo como pre-tratamiento de muestras de vinaza y LN.

Tabla 4. Porcentajes de remoción de color, contenido de fenoles y DQO de las muestras de LN tratadas con diferentes secuencias de tratamientos con *Trametes elegans*, *Phanerochaete chrysosporium* y foto-Fenton.

Tratamiento	Porcentaje de remoción (%)		
	Color	Fenoles	DQO
<i>T. elegans</i>	66,5±0,6a	61,5±0,6	78,7±1,2a
foto-Fenton/ <i>T. elegans</i>	70,1±1,1	77,9±1,3a	78,9±0,9a
<i>T. elegans</i> /foto-Fenton	80,7±1,9	74,3±1,5	56,0±0,9b
<i>P. chrysosporium</i>	24,8±0,3	42,6±0,9b	36,8±0,9
foto-Fenton/ <i>P. chrysosporium</i>	66,9±0,9a	76,7±0,9a	69,2±1,3
<i>P. chrysosporium</i> /foto-Fenton	41,2±1,0	43,5±0,8b	56,5±1,2b

Media±DE (n= 6). Los valores en la misma columna que comparten la misma letra no son estadísticamente diferentes de acuerdo a test de comparación múltiple de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ).

## Discusión

### **Los procesos biodegradativos de *Trametes elegans* y *Phanerochaete chrysosporium* para el tratamiento de la vinaza y el licor negro**

Al realizar el tratamiento de las muestras de vinaza y LN con los hongos de pudrición blanca *T. elegans* y *P. chrysosporium*, se observa que ninguno de los tratamientos remueve por completo el contenido de fenoles, DQO y color de los efluentes en estudio (Tablas 3 y 4), a pesar de que se alcanzan porcentajes de remoción de los parámetros antes mencionados superiores al 50%.

En cuanto al uso de hongos de pudrición blanca para el tratamiento de efluentes contaminados, se ha reportado su uso como inóculos líquidos desde temperatura ambiente (Nazareno *et al.* 2000) hasta los 39 °C (Roldan-Carrillo *et al.* 2001). Se ha reportado que numerosas enzimas oxidativas extracelulares de este tipo de hongos, tales como peroxidases, lacasas, celulosa deshidrogenasas, metil-transferasas membranales, enzimas productoras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (glioxal oxidasa, glucosa oxidasa, veratril alcohol oxidasa, metanol oxidasa), están relacionadas con los procesos biodegradativos de una gran variedad de compuestos recalcitrantes de origen natural (ligninas y ácidos húmicos) y xenobióticos (fenoles clorados, hidrocarburos policíclicos poliaromáticos) (Aust y Benson 1993, Field *et al.* 1993, Martínez *et al.* 2005, Gao *et al.* 2010). Estas enzimas llevan a cabo una actividad inespecífica y son capaces de producir radicales libres, propiedades que determinan su capacidad de oxidar y degradar compuestos de alto peso molecular. Este grupo de enzimas poseen diferentes características que dependen de la especie de aislamiento, de la cepa y de las condiciones de cultivo, y se desconoce su función específica en los procesos biodegradativos llevados a cabo por los hongos de pudrición blanca (Christian *et al.* 2005, Gao *et al.* 2010).

Nazareno *et al.* (2000) evaluaron la capacidad de producción de oxidorreductasas en una gran variedad de hongos de pudrición blanca, logrando dividir a los organismos estudiados en cuatro grandes grupos: I) ausencia de actividad, II) baja actividad, III) actividad moderada y IV) alta actividad. Los autores encontraron que los hongos *T. elegans* y *P. chrysosporium* se encontraban en el grupo con alta actividad de enzimas oxidativas. En trabajos similares, se demostró que la decoloración y reducción de grupos fenólicos de efluentes altamente contaminantes llevados a cabo por *T. elegans* y *P. chrysosporium* estaba relacionada con la producción de enzimas oxidativas como las lacasas y peroxidases (Muzariri *et al.* 2002).

Los resultados presentados en este trabajo se encuentran en concordancia con los encontrados por Muzariri *et al.* (2002) y Colubaly *et al.* (2003), quienes encontraron que *T. elegans* y *P. chrysosporium* son capaces de disminuir significativamente el contenido de agentes contaminantes de una gran variedad de efluentes, entre los que se encuentran residuos coloreados, agroindustriales y con altos contenidos de metales. Efluentes como la vinaza y el LN, los cuales son altamente coloreados y tienen un alto contenido de materia orgánica, pueden ser atacados por este complejo de enzimas oxidativas, resultando en la disminución del color, DQO y contenido de fenoles

reportados en la tabla 2, siendo más efectivo el tratamiento con *T. elegans* que con *P. chrysosporium* en el caso del LN. Aunque Nazareno *et al.* (2000) los identifica como hongos con alta actividad biodegradativa, no existen reportes en la literatura que indiquen que alguno de los dos hongos usados en este trabajo tenga una actividad biodegradativa mayor.

Los valores de DQO de las aguas residuales usadas en este trabajo se encuentran entre 35.000 y 110.000 mg/l, lo que las convierte en residuos muy difíciles de tratar por metodologías biológicas convencionales, lo que concuerda con los resultados aquí obtenidos. Además, el tratamiento químico también resulta ser muy ineficiente, como lo demuestran Pérez-Pérez *et al.* (2012) quienes trataron la vinaza y LN por medio de foto-Fenton, alcanzando porcentajes de remoción de 66, 70 y 70% en el contenido de fenoles, DQO y color de las muestras de vinaza; y de 31, 13 y 24% para las muestras de LN, respectivamente. Según lo mencionado anteriormente, se sugiere el uso de metodologías combinadas entre tratamientos químicos y biológicos para la remediación de este tipo de efluentes con elevada carga orgánica. Para estos casos se ha propuesto que los POAs pueden ser especialmente útiles como pre-tratamiento, de modo de adaptar el efluente para el procedimiento biológico posterior, en particular aquellos efluentes resistentes al tratamiento biológico; o como post-tratamiento, llevado a cabo para el procesamiento final de aguas residuales antes de ser descargadas en el ambiente (Neyens y Baeyens 2003).

### **Integración de los procesos de foto-Fenton y biodegradativos para el tratamiento de la vinaza y el licor negro**

Una vez que se llevó a cabo el tratamiento combinado entre foto-Fenton y los hongos de pudrición blanca *Trametes elegans* y *Phanerochaete chrysosporium*, se decidió escoger como secuencia más efectiva aquella combinación que lograra una mayor disminución de la DQO de los efluentes en estudio, ya que este es un parámetro universalmente utilizado para determinar la potencialidad contaminante de un efluente, considerándose que mientras mayor es el valor de DQO de una muestra, ésta es menos degradable, necesitando un mayor contenido de oxidantes que puedan mineralizar la materia orgánica presente en la muestra (Aust y Benson 1993). Teniendo esto en cuenta, se determinó que en el caso de las muestras de vinaza las secuencias más efectivas fueron foto-Fenton/*T. elegans* y *P. chrysosporium*/foto-Fenton (Tabla 3); mientras que para el LN fueron foto-Fenton/*T. elegans* y foto-Fenton/*P. chrysosporium* (Tabla 4).

Existen reportes en la literatura en los cuales se ha usado a *P. chrysosporium* en secuencia con procedimientos químicos para la remediación del LN. Por ejemplo, Helmy *et al.* (2003) desarrollaron un método de tratamiento para la mineralización del LN que consistió en la aplicación de tres metodologías: una primaria, incubación del efluente con *P. chrysosporium*; una secundaria, aplicación de foto-Fenton; y una terciaria, de coagulación de las muestras. Con la aplicación de este sistema de tratamiento se obtuvieron porcentajes de reducción de DQO, carbono orgánico total y

color entre 90 y 100%. *Phanerochaete chrysosporium* también ha sido utilizado como pre-tratamiento para la mineralización de aguas residuales de la industria agrícola (Keller *et al.* 2003) y de la industria textil (Kunz *et al.* 2001). Estos resultados se encuentran en concordancia con los encontrados en este estudio, en cuanto a que el sistema de foto-Fenton funciona como un tratamiento secundario para las muestras de vinaza previamente mineralizadas con *P. chrysosporium* (Tabla 3). Sin embargo, en el resto de los casos, el procedimiento de foto-Fenton es más útil como pre-tratamiento (Tabla 3 y 4).

En cuanto a la utilización de hongos de pudrición blanca como post-tratamiento, secuencia más efectiva reportada en este estudio, Kim *et al.* (2003) utilizaron la secuencia filtros de zeolita/*P. chrysosporium* para el tratamiento de efluentes sanitarios, obteniendo reducciones en el carbono orgánico total y color de 72 y 25%, respectivamente. En otro ejemplo, Huang *et al.* (2002) llevaron a cabo la degradación de soluciones de alcoholes polivinílicos por medio de la combinación reacción de Fenton/*P. chrysosporium*, alcanzando porcentajes de remoción de 63,7% en la DQO y 57,7% del contenido de materia orgánica.

En el caso de los procesos combinados de foto-Fenton con hongos de pudrición blanca aplicados en este estudio, para el caso de la vinaza, las combinaciones más eficientes fueron foto-Fenton/*T. elegans* y *P. chrysosporium*/ foto-Fenton; mientras que en el caso del tratamiento del LN, las combinaciones que produjeron mayores porcentajes de remoción de fenoles, DQO y color fueron foto-Fenton/*T. elegans* y foto-Fenton/*P. chrysosporium*. En líneas generales, el proceso de foto-Fenton es más efectivo como pre-tratamiento para las muestras de vinaza y LN, aunque el proceso puede ser usado como post-tratamiento dependiendo de la naturaleza de las aguas residuales. En efecto, la combinación de los tratamientos químicos y biológicos usados en este estudio produce mayores porcentajes de remoción de fenoles, color y DQO que los mismos tratamientos aplicados de manera independiente, justificándose el uso de un sistema combinado para lograr una mayor mineralización de estos efluentes, los cuales no son remediados en la actualidad en nuestro país. La demostración de que el uso de tratamientos combinados entre hongos de pudrición blanca y foto-Fenton es altamente efectiva para la mineralización de la vinaza y el licor negro producidos en Venezuela, más allá de lo demostrado en la literatura con otro tipo de efluentes producidos en diferentes condiciones, representa una posibilidad para la aplicación de una combinación biotecnológica que no tiene precedentes en nuestro país y que ayudaría a resolver los problemas de contaminación asociados a estos efluentes.

**Agradecimientos.** Queremos agradecer al CDCHT (ULA), al FONACIT, al Ministerio para el Poder Popular de Ciencia y Tecnología, y al Banco Mundial (Premio N° 2001001363) por el financiamiento del trabajo.

**Bibliografía.**

- AUST, S. D. Y J. T. BENSON. 1993. The fungus among us: use of white rot fungi to biodegrade environmental pollutants. *Environmental Health Perspective* 101: 232–241.
- BISHNOI, N. R., R. K. KHUMUKCHAM Y R. KUMAR. 2006. Biodegradation of pulp and paper mill effluent using anaerobic followed by aerobic digestion. *Journal of Environmental Biology* 27: 405–408.
- BUZZINI, A. P., E. P. GIANOTTI Y E. C. PIRES. 2005. UASB performance for bleached and unbleached kraft pulp synthetic wastewater treatment. *Chemosphere* 59: 55–61.
- BUZZINI, A. P., D. W. MIWA, A. J. MOTHEO, Y E. C. PIRES. 2006. Use of electrochemical oxidation process as post-treatment for the effluents of a UASB reactor treating cellulose pulp mill wastewater. *Water Science Technology* 54: 207–213.
- CHAIRATTANAMANOKORN, P., T. IMAI, R. KONDO, M. SEKINE, T. HIGUCHI Y M. UKITA. 2005. Decolorization of alcohol distillery wastewater by thermotolerant white-rot fungi. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 41: 662–667.
- CHEN, F., Y. XIE, J. HE, Y J. ZHAO. 2001. Photo-Fenton degradation of dye in methanolic solution under both UV and visible irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 138: 139–146.
- CHONG, M. N., B. JIN, C. W. CHOW Y C. SAINT. 2010. Recent developments in photocatalytic water treatment technology: a review. *Water Research* 44(10): 2997–3027.
- COELHO, A., A. V. CASTRO, M. DEZOTTI, Y G. L. SANT ANNA. 2006. Treatment of petroleum refinery sourwater by advanced oxidation processes. *Journal of Hazardous Materials* 137: 178–184.
- COLUBALY, L., G., GOURENE Y N. AGATHOS. 2003. Utilization of fungi for biotreatment of raw wastewaters. *African Journal of Biotechnology* 2: 620–630.
- CHRISTIAN, V., R. SHRIVASTAVA, D. SHUKLA, D., H. A. MODI, Y B. R. VYAS. 2005. Degradation of xenobiotic compounds by lignin-degrading white-rot fungi: enzymology and mechanisms involved. *Indian Journal of Experimental Biology* 43(4): 301–312.
- DHADSE, S., S. SATYANARAVAN, P. R., CHAUDHARI Y S. R. WATE. 2010. Vermifilters: a tool for aerobic biological treatment of herbal pharmaceutical wastewater. *Water Science Technology* 61: 2375–2380.
- DE OLIVIERA, I. S., L. VIANA, C. VERONA, V. L. FALLAVENA, C. M. AZEVEDO, Y M. PIRES. 2007. Alkydic resin wastewaters treatment by fenton and photo-Fenton processes. *Journal of Hazardous Materials* 14: 132–147.
- DUDGEON, D. 2000. Large-scale hydrological changes in tropical Asia: prospects for riverine biodiversity. *Bioscience* 50(9): 793–806.
- FIELD, J. A., E. DE JONG, E., FEIJOO-COSTA Y J. A. M. DE BONT. 1993. Screening for lignolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Trends in Biotechnology* 11: 44–49.
- FIELD, J. A. Y R. SIERRA-ÁLVAREZ. 2008. Microbial degradation of chlorinated dioxins. *Chemosphere* 71(6): 1005–10018.
- GAO, D., L. DU, J. YANG, W. M. WU, Y H. LIANG. 2003. A critical review of the application of white rot fungus to environmental pollution control. *Critical Review in Biotechnology* 30(1): 70–77.
- GALVAO, S. A., A. L. MOTA, D. N. SILVA, J. E. MORAES, C. A. NASCIMENTO Y O. CHIAVONE-FILHO. 2006. Application of the photo-Fenton process to the treatment of wastewaters contaminated with diesel. *Science Total Environmental* 15: 42–49.
- GERNJAK, W., A. KRUTZLER, A. GLSER, S. MALATO, J. CACERES, R. BAUER Y A. R. FERNANDEZ-ALBA. 2003. Photo-Fenton treatment of water containing natural phenolic pollutants. *Chemosphere* 50: 71–83.

- HELMY, S., S. EL RAFIE, Y M. GHALY. 2003. Remediation post-photo-oxidation and coagulation for black liquor effluent treatment. *Desalination* 158: 331–339.
- HUANG, C. P., C. DONG Y Z. TANG. 1993. Advanced chemical oxidation: its present role and potential future in hazardous waste treatment. *Waste Management* 13: 361–377.
- HUANG, M. H., Y. P. SHIH Y S. M. LIU. 2002. Biodegradation of polyvinyl alcohol by *Phanerochaete chrysosporium* after pretreatment with Fenton's reagent. *Journal of Environmental Science and Health Part A: Toxic and Hazardous Substances and Environmental Engineering* 37: 29–41.
- HUSTON, P. L. Y J. J. PIGNATELLO. 1999. Degradation of selected pesticide active ingredients and commercial formulations in water by the photo-assisted Fenton reaction. *Water Research* 33: 1238–1246.
- ICIDCA. 1990. Manual de los derivados de la caña de azúcar. La Habana, GEPLACEAICIDCA-PNUD (Eds.). pp. 213–236.
- JAIN, N., C. NANJUNDASWAMY, A. K. MINOCHA Y C. L. VERMA. 2001. Isolation, screening and identification of bacterial strains for degradation of predigested distillery wastewater. *Indian Journal of Experimental Biology* 39: 490–492.
- JEFFERSON B., A. PALMER P. JEFFREY R. STUETZ Y S. JUDD. 2004. Grey water characterisation and its impact on the selection and operation of technologies for urban reuse. *Water Science Technology* 50: 157–164.
- KELLER, F. A., HAMILTON, J. E., Y Q. A., NGUYEN. 2003. Microbial pretreatment of biomass: potential for reducing severity of thermochemical biomass pretreatment. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 105: 27–41.
- KIM, Y. K., S. K. PARK Y S. D. KIM. 2003. Treatment of landfill leachate by white rot fungus in combination with zeolite filters. *Journal of Environmental Science and Health Part A: Toxic and Hazardous Substances and Environmental Engineering* 38: 671–683.
- KUNZ, A., V. REGINATTO, Y N. DURAN. 2001. Combined treatment of textile effluent using the sequence Phanerochaete chrysosporium-ozone. *Chemosphere* 44: 281–287.
- LIU, M. J., M. C. LU Y J. N. CHEN. 2003. Oxidation of explosives by Fenton and photo-Fenton processes. *Water Research* 37: 3172–3179.
- LIVERNOCHE, D., L. JURASEK, M. DESROCHERS, Y J. DORIKI. 1983. Removal of color from kraft mill wastewaters with cultures of white-rot fungi and with immobilized mycelium of *Coriolus versicolor*. *Biotechnology and Bioengineering* 25: 2055–2065.
- MARTÍNEZ, A. P., M. SPERANZA, F. J. RUIZ-DUEÑAS, P. FERREIRA, S. CAMARERO, F. GUILLÉN, M. J. MARTÍNEZ, A. GUTIÉRREZ Y J. C. DEL RÍO. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology* 8(3): 195–204.
- MOLETTA, R. 2005. Winery and distillery wastewater treatment by anaerobic digestion. *Water of Science Technology* 51: 137–144.
- MURUGESAN, K. 2003. Bioremediation of paper and pulp mill effluents. *Indian Journal of Experimental Biology* 41(11): 1239–1248.
- MUZARIR MAZORODZE, H., Y J. MAINGIRE. 2002. 3<sup>rd</sup> Water Net Warfsa Symposium “Water Demand Management for Sustainable Development. Dar es Salaam. 256–259.
- NAZARENO, M., A. MARGARITA, H. TOURNIER, M. CABELLO, Y T. A. ARAMBARRI. 2000. Extracellular ABTS-oxidizing activity of autochthonous fungal strains from Argentina in solid médium. *Revista Iberoamericana de Micología* 17: 64–68.
- NEYENS, E. Y J. BAEYENS. 2003. A review of classical Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. *Journal of Hazardous Materials* 98: 33–50.
- PÉREZ-PÉREZ, E. M., E. ARAUJO, Y A. J. RODRÍGUEZ-MALAYER. 2012. Optimización del tratamiento del licor negro y la vinaza por medio de Foto-Fenton. *Memoria de la Fundación La Salle de Ciencias Naturales* 173-174: 253–269.

- RODRÍGUEZ, M., A. KIRCHNER, S. CONTRERAS, E. CHAMARRO Y S. ESPLUGAS. 2000. Influence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Fe(III) in the photodegradation of nitrobenzene. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 133: 123–127.
- RODRÍGUEZ, S., M. FERNANDEZ, R. BERMÚDEZ Y H. MORRIS. 2003. Treatment of coloured industrial effluents with *Pleurotus* spp. *Revista Iberoamericana de Micología* 20: 164–168.
- ROLDÁN-CARRILLO, T., R. RODRÍGUEZ-VÁSQUEZ, H. VÁSQUEZ-TORRES, J. CARDOZO-MARTÍNEZ Y A. TORRES-DOMÍNGUEZ. 2001. Remoción de estireno por *Phanerochaete chrysosporium* en cultivo líquido. *INCI* 26: 12–18.
- SANGAVE, P. C. Y A. B. PANDIT. 2004. Ultrasound pre-treatment for enhanced biodegradability of the distillery wastewater. *Ultrason Sonochemistry* 11: 197–203.
- SANGAVE, P. C. Y A. B. PANDIT. 2006. Enhancement in biodegradability of distillery wastewater using enzymatic pretreatment. *Journal of Environmental Management* 78: 77–85.
- SARKANEN, S. 1997. Progress report means for producing 100% Kraft lignin based biodegradable plastics. University of Minnesota. 45 pp.
- SHIKLOMANOV, I. A. 1996. World fresh water resources. Pp. 13–24. In: Gleick PH, (Ed.) *Water in Crisis. A Guide to the World's Fresh Water Resources*. New York: Oxford University Press.
- TIBBETS, J. 2000. Water World. *Environmental Health Perspectives* 108: A68–A73.
- TARLAN, E., U. YETIS Y F. B. DILEK. 2002. Algal treatment of pulp and paper industry wastewaters in SBR systems. *Water Science and Technology* 45: 151–158.
- VLYSSIDES, A. G., M. LOIZIDOU, P. K. KARLIS, A. A. ZORPAS Y D. PAPAIONNOU. 1999. Electrochemical oxidation of a textile dye wastewater using a Pt/Ti electrode. *Journal of Hazardous Materials* 70: 41–52.
- WESENBERG, D., I. KYRIAKIDES, Y S. N. AGATHOS. 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances* 22: 161–187.
- WU, K., Y. XIE, J. ZHAO Y H. HIDAKA. 1999. Photo-Fenton degradation of dye under visible light irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 144: 77–84.
- XU, M., Q. WANG Y Y. HAO. 2007. Removal of organic carbon from wastepaper pulp effluent by lab-scale solar photo-Fenton process. *Journal of Hazardous Materials* 34: 236–249.
- YARDIN, G., Y S. CHIRON. Photo-Fenton treatment of TNT contaminated soil extract solutions obtained by soil flushing with cyclodextrin. *Chemosphere* 62: 1395–402.
- YEGER, M. C., J. RODRÍGUEZ, J. FREER, J. BAEZA, N. DURÁN Y H. D. MANSILLA. 1999. Advanced oxidation of a pulp mill bleaching wastewater. *Chemosphere* 39: 1679–1688.

Recibido: 30 noviembre 2009

Aceptado: 19 octubre 2012

Publicado en línea: 24 noviembre 2015

---

Elizabeth M. Pérez-Pérez<sup>1\*</sup> María Fernanda Potentini<sup>2</sup>, Elisa Araujo<sup>3</sup> y Antonio Rodríguez-Malaver<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioanálisis.

<sup>2</sup> Laboratorio de Bioquímica Adaptativa, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida 5101, Venezuela.

<sup>3</sup> Autor de correspondencia: Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida 5101, Venezuela. elimariana@ula.ve. Telefono 0274-2401311.

