



BIODEGRADACIÓN DE VINAZAS DE CAÑA DE AZÚCAR MEDIANTE EL HONGO DE PUDRICIÓN BLANCA *Pleurotus ostreatus* EN UN REACTOR DE LECHO EMPACADO

[BIODEGRADATION OF SUGARCANE VINASSES BY THE WHITE-ROT FUNGI *Pleurotus ostreatus* IN A PACKED BED REACTOR]

W.A. Tapie¹, D. Prato Garcia² and H. Sánchez Guerrero^{2*}

Universidad Nacional de Colombia-Sede Palmira.¹Facultad de Ciencias Agropecuarias-Departamento de Ciencia Animal.²Facultad de Ingeniería y Administración-Departamento de Ingeniería-Carrera 32 No 12-00 Chapinero, Vía Candelaria, Palmira, Colombia. E-mail: hsanchezgu@unal.edu.co

*Corresponding author

SUMMARY

Sugarcane vinasses are considered a complex effluent because of its organic load, low pH, high temperature, and by the presence of recalcitrant substances such as melanoidins and phenolic compounds. The aim of this work was to evaluate the potential of the fungus *Pleurotus ostreatus* to carry out the biodegradation of sugarcane vinasses in a fixed-bed bioreactor. The experiments evidence the potential of the fungus *Pleurotus ostreatus* to carry out the decolorization (83%), the removal of the Chemical Oxygen Demand (COD=87%) and the Biochemical Oxygen Demand (BOD₅=92%), the reduction of total suspended solids (83%) and volatile suspended solids (72%) of vinasses. The technical simplicity of the proposed alternative as well as process performance reveals the potential of the fungus *Pleurotus ostreatus* for the treatment of sugarcane mill effluents.

Key words: bioremediation; decolorization; fungus; melanoidins; *Pleurotus ostreatus*; vinasses.

RESUMEN

Las vinazas de caña han sido consideradas un efluente complejo debido a su carga orgánica, bajo pH, elevada temperatura, y por la presencia de sustancias recalcitrantes como las melanoidinas y los compuestos fenólicos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial del hongo *Pleurotus ostreatus* para llevar a cabo la biodegradación de una vinaza de caña en un biorreactor de lecho fijo. Los experimentos evidencian el potencial del hongo *Pleurotus ostreatus* para realizar la decoloración (83%), la remoción de la Demanda Química de Oxígeno (DQO=87%) y de la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅=92%), la reducción de los sólidos suspendidos totales (83%) y los sólidos suspendidos volátiles (72%) de las vinazas. La simplicidad técnica de la alternativa así como el desempeño del proceso propuesto revelan el potencial del hongo *Pleurotus ostreatus* para el tratamiento de los efluentes de los ingenios azucareros.

Palabras clave: biorremediación; decoloración; hongo; melanoidinas; *Pleurotus ostreatus*; vinazas.

INTRODUCCIÓN

Las vinazas de la industria de la caña de azúcar se caracterizan por su alto contenido de sólidos (100-150 gL⁻¹), por sus valores elevados de Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅=40-100 gL⁻¹) y de Demanda Química de Oxígeno (DQO=10-200 gL⁻¹), bajo pH (3-5) y coloración intensa (Retes-Pruneda *et al.*, 2014; Arimi *et al.*, 2015). Las vinazas son el subproducto que se obtiene tras separar el alcohol del jugo de caña fermentado por medio de un proceso de destilación convencional. La composición de las vinazas depende de la variedad y el grado de maduración de la caña, del sustrato empleado, del tipo y la eficiencia del proceso de fermentación, y de las

características del proceso de destilación aplicado (Arimi *et al.*, 2015). Por cada litro de etanol producido se obtienen de 10 a 18 litro de vinaza, la cual está compuesta por agua (85-90%), materia orgánica (13-15%), y sales (1-2%) (Ferreira *et al.*, 2010; Christofolletti *et al.*, 2013; Arimi *et al.*, 2015; Moraes *et al.*, 2015). La coloración oscura de las vinazas es atribuida a la presencia de compuestos de alto peso molecular, principalmente melanoidinas y caramelos, los cuales se forman por la reacción de Maillard (Pant y Adholeya, 2007; Naik *et al.*, 2008). Dicha reacción es de naturaleza no enzimática y ocurre de manera eficiente a pH ácido (4-7) y a temperaturas mayores a 50 °C (Pant y Adholeya,

2007). Las melanoidinas son sustancias de naturaleza polimérica que poseen pesos moleculares que varían entre 5.000 y 40.000 (Da). Adicionalmente, las melanoidinas presenta carga negativa debido a la presencia de ácidos carboxílicos y compuestos fenólicos disociados (Pant y Adholeya, 2007; Satyawali y Balakrishnan, 2008; Arimi *et al.*, 2014). Las melanoidinas resultan difíciles de caracterizar debido a que su estructura depende también de los azúcares y de los aminoácidos involucrados en la reacción de Maillard (Pant y Adholeya, 2007; Arimi *et al.*, 2015). Los procesos biológicos (anaerobios y aerobios) han sido considerados alternativas eficientes, económicas, y de bajo impacto ambiental para la gestión de efluentes provenientes de la agroindustria del alcohol (Pant y Adholeya, 2007; Mohana *et al.*, 2009; Robles-González *et al.*, 2012; Moraes *et al.*, 2015). El uso de procesos anaerobios en condiciones mesofílicas (35 °C) resulta bastante ventajoso, teniendo en cuenta que permite eliminar entre el 60-85% de la materia orgánica presente en las vinazas. Adicionalmente, en dicho proceso se obtiene una corriente gaseosa rica en metano ($\text{CH}_4=65-85\%$) y dióxido de carbono ($\text{CO}_2=15-35\%$). Sin embargo, la recalcitrancia y/o toxicidad de algunas de las sustancias presentes en las vinazas reducen la eficiencia de remoción de materia orgánica, el porcentaje de decoloración, y la estabilidad de este tipo de procesos de tratamiento (Raghukumar *et al.*, 2004; Mohana *et al.*, 2009; Moraes *et al.*, 2015).

Los procesos aerobios pueden alcanzar eficiencias de remoción de carga orgánica (expresada como DQO y DBO₅) en el rango comprendido entre el 80-90%. Asimismo, los procesos aerobios presentan eficiencias de remoción de color superiores al 90% durante el tratamiento de aguas residuales agroindustriales (Raghukumar *et al.*, 2004; Mohana *et al.*, 2009; Fuess y Garcia, 2014). En los procesos aerobios, por cada kg de materia orgánica (expresada en mg O₂/L o DQO) que entra al proceso se generan 0.5 kg de biomasa microbiana, los cuales deberán ser dispuestos de manera segura dentro de la planta de tratamiento de aguas o en un relleno sanitario (Tchobanoglous *et al.*, 2003; Kumar, 2008). Se debe destacar que aproximadamente el 50% de la materia orgánica que entra al proceso es oxidada hasta productos como el dióxido de carbono y el agua (Tchobanoglous *et al.*, 2003; Kumar, 2008; Moraes *et al.*, 2015). Lo anterior conduce a un incremento de los costos operacionales, ya que la disposición de los lodos o biomasa pueden representar entre el 20-30% de los costos del proceso (Tchobanoglous *et al.*, 2003; Kumar, 2008). Por otro lado, los procesos aerobios requieren de grandes cantidades de oxígeno para asegurar la transformación de la materia orgánica hasta productos más estables (CO_2 , H_2O , HNO_3 , H_2SO_4). Se debe mencionar que en los sistemas aerobios, el

suministro de oxígeno para el proceso consume entre el 30-50% de la energía requerida por todo el sistema de tratamiento (Tchobanoglous *et al.*, 2003; Kumar, 2008). Los hechos antes mencionados son considerados como una barrera adicional para promover su aplicabilidad a gran escala (Pant y Adholeya, 2007; Fuess y Garcia, 2014).

Los hongos poseen una capacidad notable para sintetizar proteínas, ácidos orgánicos y para adaptarse a condiciones ambientales severas (Mohana *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2010, 2011; Majeau *et al.*, 2010; Fuess y Garcia, 2014). Los hongos son muy eficientes para la degradación de residuos agroindustriales debido a la presencia de enzimas lignocelulolíticas (lacasas, ligno-peroxidasas y manganeso-peroxidasas). Factores como la similitud estructural de los sustratos (melanoidinas, ácidos húmicos y lignina) y la inespecificidad de las enzimas hacia los sustratos mencionados sugieren que los hongos podrían tener la capacidad de degradar los compuestos fenólicos y las melanoidinas presentes en las vinazas de caña (Majeau *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2011; Arimi *et al.*, 2014).

Una vez descargadas las vinazas a un cuerpo de agua, la reducción de la actividad fotosintética y el aumento de la actividad microbiana disminuyen los niveles de oxígeno disuelto. Factores como el pH bajo, la temperatura elevada, y la presencia de sales y de sustancias tóxicas podrían modificar el potencial de óxido-reducción del cuerpo de agua; lo cual afectaría la reactividad la solubilidad y la toxicidad de las especies químicas presentes (Gad y El Sayaad, 2010; Ferreira *et al.*, 2011; Retes-Pruneda *et al.*, 2014). Durante el año 2014, se produjeron al menos 1100 (m^3d^{-1}) de etanol en el departamento de Valle del Cauca (Colombia) con el objetivo de satisfacer los requerimientos establecidos por la Ley 639 de 2001 (ASOCAÑA, 2015). Lo anterior supone la generación de al menos 16500 (m^3d^{-1}) de vinazas, las cuales deberán ser dispuestas de manera segura y eficiente por los ingenios azucareros de la región. Un aumento en la producción de alcohol implicaría la necesidad de desarrollar nuevas tecnologías y/o alternativas para la gestión eficiente de las vinazas producidas tras el proceso de purificación del bioetanol. Teniendo en cuenta que los compuestos tóxicos y/o recalcitrantes presentes en las vinazas afectan la robustez y la eficiencia de los procesos de tratamiento convencionales (Mohana *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2010, 2011; Arimi *et al.*, 2014; Fuess y Garcia, 2014; Moraes *et al.*, 2015). En este trabajo se plantea como objetivo evaluar una alternativa para el tratamiento de vinazas de caña con el hongo *Pleurotus ostreatus* en un biorreactor de lecho empacado a temperatura ambiente (25 °C).

MATERIALES Y MÉTODOS

El hongo *Pleurotus ostreatus* se obtuvo del laboratorio de insumos biológicos FUNGICOL S.A.S. (Palmira, Valle del Cauca, Colombia). La etapa de multiplicación del hongo se realizó en un medio de Agar Papa Dextrosa (APD), de acuerdo a la metodología propuesta por Ferreira *et al.* (2010). El proceso se inicia con la adición de 30 g de extracto de malta (FUNGICOL S.A.S.), 3 g de peptona de harina de soja (FUNGICOL S.A.S.) y 15 g de agar (FUNGICOL S.A.S.) a 1 L de agua. Posteriormente, el medio resultante se llevó a una autoclave a 121 °C durante 15 minutos y se incubó de 6-7 días en cajas de Petri (10 mL). El contenido de las cajas de Petri fue inoculado a 500 g de trigo esterilizado con una humedad del 65±5%. Para el cultivo en sustrato sólido (lecho fijo) se utilizó tamo de arroz esterilizado (121 °C durante 1h) con una humedad del 65±5%; seguidamente se inoculó el tamo con el hongo presente en el trigo (250 g trigo en 5 kg de tamo) (CENICAFE, 2004). Se debe destacar que el reactor de lecho fijo tenía un volumen útil de 19 L y un volumen total de 24 L. Transcurridos 20 días, se agregó vinaza de caña esterilizada a los reactores a razón de 1:2 (Peso-Volumen) en dos niveles experimentales: diluida (70%) y sin diluir. El pH fue corregido a 6.5 usando una solución de CaCO₃ (Fisher Scientific®) y H₂SO₄ (Sigma-Aldrich®). Las vinazas fueron obtenidas de la planta de destilación de alcohol del Ingenio Providencia (Palmira, Valle del Cauca, Colombia). El porcentaje de decoloración de la vinaza (PD%) se evaluó durante 36 días. La longitud de onda de referencia seleccionada para el análisis de decoloración fue 475 nm. La muestra inicial fue diluida con agua destilada con el objetivo de reducir la densidad óptica de la muestra a menos de una unidad. Las mediciones se llevaron a cabo en un espectrofotómetro UV-visible (Spectroquant®, Pharo 300, Merck) en celdas de cuarzo de 10 mm de trayectoria óptica. El PD% se determinó usando la siguiente ecuación:

$$PD(\%)=100*(A_0-A_t)/A_0$$

Dónde: A_0 representa la absorbancia inicial de la muestra y A_t la absorbancia medida a un tiempo t .

El efecto de la concentración de la vinaza en la eficiencia de decoloración se evaluó en dos niveles o tratamientos (vinaza sin diluir y vinaza diluida al 70% en volumen) usando un diseño experimental completamente al azar que constaba de 6 observaciones para cada nivel o tratamiento. El tamaño mínimo de la muestra y el número de réplicas requeridas en el experimento se determinó a partir de las curvas de operación características reportadas en la literatura (Montgomery, 2005). La variable de

respuesta seleccionada para el diseño experimental fue el porcentaje de decoloración o su equivalente la reducción de la absorbancia de la muestra. Los análisis de absorbancia para cada observación se realizaron al menos cuatro veces. Las medias obtenidas fueron comparadas con una prueba de Duncan usando el paquete estadístico Statistical Analysis System SAS® versión 9.13. El análisis estadístico del diseño experimental se realizó de acuerdo a lo sugerido en la literatura especializada (Tallarida y Murray, 1987). Los ensayos de Carbono Orgánico Total (COT), de Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅) de Demanda Química de Oxígeno (DQO), de Sólidos Totales (ST) y de Sólidos Volátiles (SV) fueron realizados de acuerdo a las metodologías sugeridas en métodos estándar para el análisis de aguas (APHA, 2005). Los análisis anteriores fueron realizados al menos por duplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se encontró que el hongo *P. ostreatus* fue capaz de remover la fracción de sustancias que causan la coloración de una vinaza de caña (Figura 1) debido a la acción de lacasas y peroxidases (Ferreira *et al.*, 2010). La mayor reducción en la absorbancia en las muestras se presentó durante los primeros 7 días de tratamiento y alcanzó valores del 80±2% (con dilución) y 74±2% (sin dilución). En general, los picos de actividad de las lacasas son alcanzados durante los días 6 y 9 después de iniciado el cultivo y están asociados a grandes remociones de color y de sólidos totales en el caso de vinazas de caña (González *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2010). Las eficiencias de decoloración obtenidas en este trabajo (~80%) son equivalentes a las alcanzadas por hongos del tipo *Phanerochaete chrysosporium* (85%), *Pleurotus shimeji* (85%), *Ganoderma sp* (65%), *Aspergillus niger* (63%) y *Trichoderma reesei* (55%) durante el tratamiento de vinazas de caña en condiciones controladas de temperatura (Satyawali y Balakrishnan, 2008; Ferreira *et al.*, 2010). Sin embargo, los porcentajes de remoción reportados en esta investigación fueron obtenidos a temperatura ambiente (25 °C) y en ausencia de cualquier control de temperatura. Esto último resulta bastante ventajoso a nivel industrial, puesto que reduciría de forma apreciable los costos del proceso de tratamiento.

El proceso de decoloración de la vinaza se puede dividir en tres etapas. En la primera etapa (0-10 días), se observa una rápida reducción de la absorbancia de la muestra, lo cual coincide con el periodo de mayor actividad de las lacasas (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2010). Posteriormente, se observa una reducción paulatina de la actividad enzimática entre los días 10 y 30, lo cual concuerda con los datos reportados en la literatura para la decoloración de

efluentes de la industria azucarera mediante *P. chryso sporium* (Dahiya et al., 2001). La reducción marginal en la decoloración observada entre los días 30 y 36 obedece a una reducción de la actividad enzimática, la cual es causada generalmente por la acumulación de subproductos que inhiben la actividad metabólica del hongo.

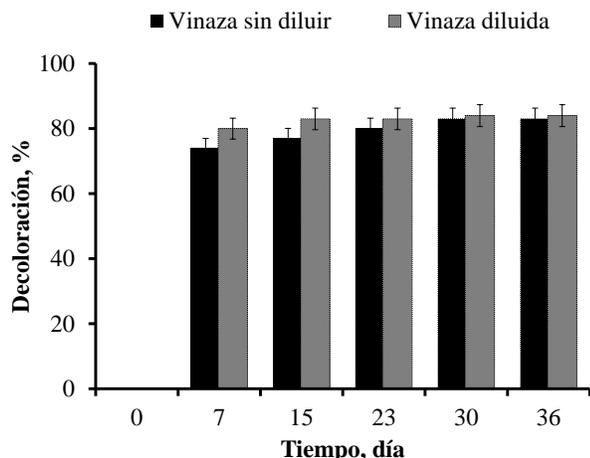


Figura 1. Remoción del color en una vinaza de caña mediante *Pleurotus ostreatus*.

Teniendo en cuenta que la dilución de las vinazas conduce a eficiencias de decoloración semejantes, se procedió a estudiar el efecto del proceso de tratamiento con *P. ostreatus* en la eficiencia de remoción de la carga orgánica (DQO, DBO₅ y COT). Los datos mostrados en la Figura 2 indican una reducción significativa en la DQO (87±3%), en la DBO₅ (92±5%) y en el COT (45±3%) de la muestra de vinaza después de 36 días de tratamiento. Hongos del género *Aspergillus* (*niger*, *niveus*, *fumigatus*) conducen a eficiencias de remoción de color y de materia orgánica del 70% y 80%, respectivamente. Mientras que los ascomicetos (*Penicillium*, *Decumbens*, *Lignorum*) logran reducciones en la DBO₅ y del color cercanas al 50%. En el caso del género *Pleurotus* las eficiencias del proceso de tratamiento son ampliamente variables tanto para la DQO (50-80%) como para la remoción de color (50-95%) (Pérez et al., 2006; Rodríguez-Pérez et al., 2006).

El uso de *P. ostreatus* redujo en un 83±2% el contenido de sólidos totales, los cuales pasaron de 33.8 (gL⁻¹) a 5.6 (gL⁻¹). Asimismo, el contenido de sólidos volátiles pasó de 15.1 (gL⁻¹) a 4.2 (gL⁻¹) (una reducción cercana al 72±2% en el contenido de material volátil). Sin embargo, es importante mencionar que no se presentaron diferencias estadísticas significativas (p<0.05) para las condiciones experimentales estudiadas (con dilución

y sin dilución) durante los ensayos de decoloración de vinazas con *P. ostreatus*. La reducción de sólidos es de gran importancia ya que son responsables del aumento de la turbidez en las aguas. Una turbiedad elevada reduce la actividad fotosintética y podría generar depósitos sobre el fondo de los cauces favoreciendo la aparición de condiciones anaerobias.

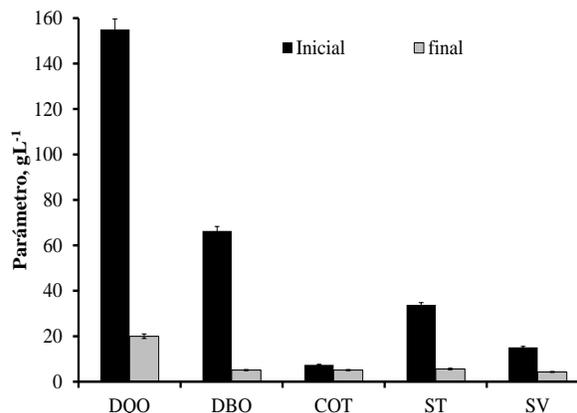


Figura 2. Características de la vinaza antes y después del tratamiento por *Pleurotus ostreatus*

Las vinazas de la industria alcoholera son consideradas como un efluente agresivo para el medio ambiente por su alto potencial de contaminación asociado a su pH, la temperatura y la carga orgánica. El color impartido por sustancias como las melanoidinas y los caramelos conducen a problemas de tipo estético, afectan la capacidad fotosintética del cuerpo de agua, y conducen a la pérdida y/o afectación de la biodiversidad. Asimismo, la presencia de tales sustancias podría limitar los posibles usos y aplicaciones del cuerpo de agua. El tratamiento con *Pleurotus ostreatus*, se convierte en una alternativa viable para la reducción o eliminación del color, para la eliminación de la fracción biodegradable de las vinazas de caña y para la reducción del contenido de sustancias de naturaleza recalcitrante como las melanoidinas y compuestos fenólicos. Esto último contribuiría a mitigar el impacto causado a los ecosistemas donde se liberen las vinazas de caña.

CONCLUSIONES

El hongo *Pleurotus ostreatus* fue capaz de remover los compuestos responsables de la coloración en una vinaza proveniente de la industria de la caña de azúcar hasta en un 84% después de 36 días de tratamiento a temperatura ambiente (25 °C). Adicionalmente, hace posible la remoción del COT, la DQO y la DBO₅ en un 45%, 87% y 92%, respectivamente. La mayor degradación de los

compuestos responsables del color de la vinaza sucede durante los primeros 7 días, tiempo en el cual se presenta la mayor actividad enzimática para el sistema bajo estudio.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer al personal técnico y científico del Ingenio Providencia S.A. por el apoyo prestado durante el desarrollo del proyecto. Asimismo, se agradece al Laboratorio de Insumos Biológicos FUNGICOL S.A.S por la colaboración prestada durante la investigación.

REFERENCIAS

- APHA, AWWA, WPCF, in: A.D. Eaton, A.E. Clesceri, E.W. Rice, A.E. Greenberg (Eds.), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21st ed., American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation, Washington, D.C, 2005.
- Arimi, M.M., Zhang, Y., Götz, G., Kiriamiti, K., Geiben, S.U. 2014. Antimicrobial colorants in molasses distillery wastewater and their removal technologies. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 87: 34–43.
- Arimi, M.M., Zhang, Y., Geiben, S.U. 2015. Color removal of melanoidin-rich industrial effluent by natural manganese oxides. *Separation and Purification Technology*. 150: 286–291.
- ASOCAÑA, Aspectos Generales del Sector Azucarero 2014-2015, 2015. Santiago de Cali, Colombia.
- CENICAFE, 2004. Centro Nacional De Investigaciones de Café. Cultivo de Hongos Comestibles del Género *Pleurotus* Sobre Residuos Agrícolas de la Zona Cafetera. Chinchiná. Caldas. Colombia. 61p.
- Christofolletti, C.A., Escher, J.P., Correia, J.E., Urbano, J.F., Fontanetti, C.S. 2013. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. *Waste Management*. 38: 2752–2761.
- Dahiya, J. Singh, D., Nigam, P. 2001. Decolorisation of synthetic and spentwash melanoidins using the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* JAG-40. *Bioresource Technology*. 78: 95–98.
- Ferreira, L.F., Aguiar, M., Pompeu, G., Messias, T.G., Monteiro, R.R. 2010. Selection of vinasse degrading microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 26: 1613–1621.
- Ferreira, L.F., Aguiar, M.M., Messias, T.G., Pompeu, G.B., Queijeiro Lopez, A.M., Silva, D.P., Monteiro, R.T. 2011. Evaluation of sugarcane vinasse treated with *Pleurotus sajor-caju* utilizing aquatic organisms as toxicological indicators. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 74: 132–137.
- Fuess, L.T., Garcia, M.L. 2014. Implications of stillage land disposal: A critical review on the impacts of fertigation. *Journal of Environmental Management*. 145: 210–229.
- Gad, A.S., El Saaad, H. 2010. Biosorption of Molasses Pigments by Sludge. *Agriculture Residues and Fungal. Journal of Applied Sciences Research*. 6: 1722–1729.
- González, T., Terrón, M.C., Yagüe, S., Junca, H., Carbajo, J.M., Zapico, E.J., Silva, R., Arana-Cuenca, A., Téllez, A., González, A.E. 2008. Melanoidin-containing wastewaters induce selective laccase gene expression in the white-rot fungus *Trametes* sp. I-62. *Research in Microbiology*. 159: 103–109.
- Kumar, S.K., 2008. *Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production: Principles and Application*, John Wiley & Sons, Inc., Singapore.
- Majeau, J.A., Brar, S.K., Tyagi, R.D. 2010. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresource Technology*. 101: 2331–2350.
- Mohana, S., Acharya, B.K., Madamwar, D. 2009. Distillery spent wash: Treatment technologies and potential applications. *Journal of Hazardous Materials*. 163: 12–25.
- Montgomery, D.C., 2005. *Design and analysis of experiments*, 6th ed., John Wiley & Sons, Inc., United States.
- Moraes, B.S., Zaiat, M., Bonomi, A. 2015. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 44: 888–903.
- Naik, N.M., Jagadeesh, K.S., Alagawadi, A.R. 2008. Microbial decolorization of spentwash: a review. *Indian Journal of Microbiology*. 48: 41–48.
- Pant, D., Adholeya, A. 2007. Biological approaches for treatment of distillery wastewater: A review. *Bioresource Technology*. 98: 2321–2334.

- Pérez, S.R.; Savón, R.C.; Diaz, M.S.; Kourouma, A. 2006. Selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* para la decoloración de efluentes industriales. *Revista Mexicana de Micología*, México. 23: 9-15.
- Raghukumar, C., Mohandass, C., Kamat, S., Shailaja, M.S. 2004. Simultaneous detoxification and decolorization of molasses spent wash by the immobilized white-rot fungus *Flavodon flavus* isolated from a marine habitat. *Enzyme and Microbial Technology*. 35: 197-202.
- Retes-Pruneda, J.L., Davila-Vazquez, G., Medina-Ramírez, I., Chavez-Vela, N.A., Lozano-Alvarez, J.A., Alatraste-Mondragon, F., Jauregui-Rincón, J. 2014. High removal of chemical and biochemical oxygen demand from tequila vinasses by using physicochemical and biological methods. *Environmental Technology*. 35: 1773-1784.
- Robles-González, V., Galíndez-Mayer, J., Rinderknecht-Seijas, N. Poggi-Varaldo, H.M. 2012. Treatment of mezcal vinasses: A review. *Journal of Biotechnology*. 157: 524-546.
- Rodríguez-Pérez, S., Bermúdez-Savón, R.C., Serrat-Díaz, M., Kourouma, A. 2006. Selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* para la decoloración de efluentes industriales. *Revista Mexicana de Micología*. 23: 9-15.
- Satyawali, Y., Balakrishnan, M. 2008. Wastewater treatment in molasses-based alcohol distilleries for COD and color removal: A review. *Journal of Environmental Management*. 86: 481-497.
- Tallarida, R.J., Murray, R.B., 1987. *Manual of pharmacologic calculations with computer programs*, Second Edition, Springer-Verlag, United States.
- Tchobanoglous, G., Burton, F. L., Stensel, H. D. 2003. *Wastewater engineering: Treatment and reuse*, 4th ed., McGraw-Hill, United States.

Submitted March 19, 2016 – Accepted June 22, 2016