

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

TÍTULO DEL TRABAJO:
**TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE LA INDUSTRIA DE LA
CELULOSA Y PAPEL UTILIZANDO HONGOS LIGNINOLITICOS**

INFORME TÉCNICO DE LA OPCIÓN CURRICULAR EN LA MODALIDAD DE:
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERA AMBIENTAL

PRESENTA:
DIANA OCHOA OLVERA

DIRECTOR EXTERNO: Dr. Héctor M.-Poggi Varaldo

DIRECTOR INTERNO: Dr. Gustavo Valencia del Toro

México, D. F. Mayo de 2006

**Este trabajo se desarrollo en el Laboratorio 33
del Grupo de Biotecnología Ambiental del DBB-
CINVESTAV, bajo la dirección del Dr. Héctor M.
Poggi-Varaldo**

TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE LA INDUSTRIA DE LA CELULOSA Y PAPEL UTILIZANDO HONGOS LIGNINOLITICOS

ÍNDICE

	Página
Índice de tablas.....	ii
Índice de figuras.....	iii
Notación.....	iii
1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
2.1. La lignina.....	4
2.2. Hongos bacidiomicetos.....	4
2.3. Tratamiento de efluentes contaminados con licor negro de la industria de la celulosa y papel Kraft.....	7
2.4. Microorganismos inmovilizados.....	9
2.5. Hongos inmovilizados.....	10
2.6. Hongos utilizados en el tratamiento de efluentes de la industria de la celulosa y papel.....	10
3. Justificación.....	11
4. Hipótesis.....	11
5. Objetivos.....	11
5.1. Objetivo general.....	11
5.2. Objetivos específicos.....	11
6. Metodología.....	12
7. Resultados y Discusión.....	16
7.1. Caracterización del efluente anaerobio.....	16
7.2. Ensayos de inmovilización.....	17
7.3. Determinación de los efectos depuradores del hongo en ensayos semicontinuos a nivel matraz.....	19
8. Conclusiones.....	35
9. Recomendaciones.....	37
10. Referencias.....	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Pagina
Tabla1. Cargas unitarias típicas.....	3
Tabla 2. Seguimiento y análisis para el experimento de inmovilización.....	14
Tabla 3. Caracterización del efluente anaerobio.....	16
Tabla 4. Resultados del primer ensayo de inmovilización, soporte grueso.....	17
Tabla 5. Resultados del primer ensayo de inmovilización, soporte fino.....	18
Tabla 6. Resultados del segundo ensayo de inmovilización, soporte grueso.....	18
Tabla 7. Resultados del segundo ensayo de inmovilización, soporte fino.....	18
Tabla 8. Resultados de los promedios de eficiencias unitarias netas y eficiencias específicas unitarias netas de color, ligninoides y DQO.....	24
Tabla 9. Resultados de promedios de eficiencias unitarias netas (η_{un}) y eficiencias específicas unitarias netas (η_{sun}) de color, ligninoides y DQO, en los ciclos 3-5, 7-9 y 13-15.....	25
Tabla 10. Comparación de medias para η_{un} DQO para ciclos selectos.....	25
Tabla 11. Resultados de actividades enzimaticas.....	28
Tabla 12. Correlaciones multiples de DQO con actividades enzimaticas.....	29
Tabla 13. Resultados de promedios de eficiencias unitarias netas y eficiencias específicas unitarias netas de color, ligninoides y DQO (28 días).....	32
Tabla 14. Resultados del análisis de varianza.	32
Tabla 15. Resultados de promedios de actividades enzimáticas presentes en <i>Trametes versicolor</i> inmovilizado en aserrín de encino/carbón activado (pellets triple), con y sin inhibidor de proteasas (28 días).....	35
Tabla 16. Correlaciones múltiples de Parámetro contaminante (DQO) y actividades enzimáticas (28 días). Unidades con inhibidor (C/I).....	35
Tabla 17. Correlaciones múltiples de Parámetro contaminante (DQO) y actividades enzimáticas (28 días). Unidades sin inhibidor (S/I).....	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Ciclo catalítico de la manganeso peroxidasa.....	6
Figura 2. Eficiencia unitaria neta de color, ligninoides y DQO.....	20
Figura 3. Eficiencia específica unitaria neta para color, ligninoides y DQO.....	23
Figura 4. Actividades enzimáticas de MnP, LiP, Lac y Prot, pellets triple y mixto.....	
Figura 5. Eficiencia unitaria neta en % de color, ligninoides y DQO para pellets triples con y sin inhibidor de proteasas.....	26
Figura 6. Eficiencia específica unitaria neta de color, ligninoides y DQO, pellets triples con y sin inhibidor de proteasas.....	29
Figura 7. Actividades enzimáticas, pellets triples con y sin inhibidor de proteasas.....	33

NOTACIÓN

EAn	Efluente anaerobio
ICP	Industria de la Celulosa y Papel
Lac	Lacasa
LiP	Ligninoperoxidasa
MnP	Manganesoperoxidasa
Pro	Proteasa
Tv	<i>Trametes versicolor</i>

TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE LA INDUSTRIA DE LA CELULOSA Y PAPEL UTILIZANDO HONGOS LIGNINOLITICOS

1. RESUMEN.

La industria de la celulosa y del papel (ICP), en México, Canadá y los Estados Unidos, generan grandes cantidades de aguas residuales que tienen el potencial de contaminar nuestros recursos de agua. Los efluentes de la ICP son altamente contaminantes debido a su aporte de materia orgánica. Así, esto se traduce en descargas de sólidos suspendidos orgánicos e inorgánicos, material orgánico coloidal y soluble degradable y persistente, sales solubles y compuestos solubles tóxicos).

La lignina se caracteriza por ser un complejo aromático (no carbohidrato) del que existen muchos polímeros estructurales (ligninas). Resulta conveniente utilizar el término lignina en un sentido colectivo para señalar la fracción que no es celulosa de la madera. Los hongos basidiomicetos han demostrado ser un grupo de microorganismos con una capacidad única de degradación biológica efectiva de la celulosa y la lignina mediante un proceso oxidativo.

El Efluente anaerobio es el resultado del pretratamiento a las aguas residuales de la ICP utilizando bacterias anaerobias.

El objetivo principal de este trabajo es determinar los niveles de remoción de contaminante del Efluente Anaerobio, utilizando *Trametes versicolor* inmovilizado en aserrín de encino-carbón activado en ensayos semi-continuos y la asociación de la enzimas MnP, LiP y Lac con la remoción.

Para lograr esto, el proyecto se dividió en dos etapas que son:

FASE 1. Preparación de biocatalizadores y postratamiento a nivel matraz.

FASE 2. Evaluación de ensayos de remoción a nivel matraz.

Como resultados de este trabajo, se tiene entre otras cosas:

Que a partir de los dos ensayos de inmovilización, se ha podido establecer un protocolo de formación de biocatalizadores, el cual no existía hasta ahora.

Gracias a este experimento se pudo demostrar que es posible la remoción de contaminantes durante periodos largos de tiempo sin la adición de fuente de carbono como glucosa.

La inhibición de las proteasas permite alcanzar niveles de remoción mucho más altos, sin embargo, agregar un inhibidor de proteasas a nivel industrial sería incosteable, por lo que se deben buscar medios más baratos para inhibir a las proteasas.

2. INTRODUCCIÓN.

La producción de celulosa y papel es una actividad económica muy importante a escala mundial. A nivel mundial se producen 65 millones de toneladas de celulosa Kraft blanqueada. México produce un promedio de 334,600 toneladas de celulosa de la cual un 50% es celulosa Kraft y un 70% de ese 50% es blanqueada. El total de la capacidad se distribuye entre 44 empresas que representan 64 plantas distribuidas a lo largo del país. La producción de celulosa ha decaído en cerca del 20 % en los últimos años, reflejando las condiciones recesivas que vive la industria a nivel mundial. Sin embargo, la proporción relativa de celulosa blanqueada se ha incrementado y la producción de papel ha aumentado en términos absolutos en cerca de 4, 080,200 toneladas en los últimos seis años, (Cámara Nacional de las Industrias de la Celulosa y del Papel, 2003).

La industria de la celulosa y del papel (ICP), en México, Canadá y los Estados Unidos, generan grandes cantidades de residuos que tienen el potencial de contaminar nuestros recursos de agua. Los efluentes de la ICP son altamente contaminantes debido a su aporte de materia orgánica (degradable y recalcitrante). Así, esto se traduce en descargas de sólidos suspendidos orgánicos e inorgánicos, material orgánico coloidal y soluble degradable y persistente, sales solubles y compuestos solubles tóxicos (dioxinas cloradas, clorofenoles, compuestos derivados de resinas, taninos, sulfuros, etc.) (Poggi-Varaldo, 1994).

Cerca de la mitad de la madera se disuelve durante la manufactura de celulosa por métodos químicos. El ataque químico sobre la lignina y hemicelulosa dan lugar a una gran variedad de compuestos orgánicos disueltos. En el proceso Kraft, la mayor parte de ellos son concentrados y recuperados como subproductos o energía. Sin embargo, los arrastres y derrames ocasionales o calculados de ese material, junto con el proceso de blanqueo convencional donde se utiliza cloro en varias de sus formas, las operaciones de descortezado, y la manufactura de papel en caso de fábricas integradas, producen un agua residual compleja cuyos tratamientos presenta grandes retos (Poggi-Varaldo, 1994).

Como ejemplo podemos mencionar el efluente residual proveniente del proceso de celulosa Kraft no integrada, es decir, que elaboran celulosa, papel y cartón no blanqueado; el cual está contaminado principalmente con licor negro, proveniente de la digestión química de la lignina de las astillas de madera (Ramírez-Canseco *et al.*, 1998) a lo cual llamaremos licor diluido (LD).

El licor diluido (LD) fue caracterizado por Estrada- Vázquez *et al.*; (1997), el cual tiene una concentración moderada-alta de materia orgánica de 2255 mg/L como DQO,

coloreado (absorbancia 0.510 a 465 nm) y una concentración de ligninoides 46.277 mg/L (a 254 nm).

La presencia y proporciones de los contaminantes dependen del tipo de producto y proceso que tenga la planta; por lo que, las descargas unitarias típicas (Tabla 1) nos dan una idea del impacto que tiene la ICP sobre el ambiente (Poggi-Varaldo, 1994).

En México, las descargas de aguas residuales provenientes de la ICP es de $42 \cdot 10^6$ m³/año, lo que significa el 12% de las descargas residuales totales del sector industrial ocupando el segundo lugar en este rubro (Poggi-Varaldo, 1994). Existen diversas experiencias sobre el tratamiento de efluentes de la ICP (EICP), con condensados (Poggi-Varaldo *et al.*, 1989), aguas provenientes de las máquinas de papel (Poggi-Varaldo y Rinderknecht., 1996), aguas de blanqueo (Poggi-Varaldo y Rinderknecht, 1996; Poggi-Varaldo *et al.* 1994), y efluentes contaminados con licor negro (Hernández –Vera 1994; Estrada-Vázquez *et al.*, 1997, 1998).

Tabla 1. Cargas contaminantes unitarias típicas ^{a, b} adaptado de Poggi-Varaldo, 1994

	SST	DBO ₅	DQO ^c	GASTO
	(Kg. Parámetro/ ton producto)		(m ³ /ton producto)	
Producción celulosa Kraft blanqueada	52	55	165	100
Fábrica integrada papel-celulosa blanqueada	85	67	201	130
Fábrica integrada papel-celulosa no blanqueada	25	55	163	80

^a Plantas sin medidas de prevención de la contaminación.

^b Los valores deben considerarse promedios, sus intervalos son muy amplios dependiendo de muchos factores.

^c Basado en una relación DQO/DBO₅ 0 3

EL LD se puede considerar como un material difícil desde el punto de vista de su tratamiento biológico. Contiene una alta proporción de materia orgánica recalcitrante (aproximadamente un 55%, que se considera que son derivados de ligninoides), que le dan la característica de toxicidad para los consorcios bacterianos metanogénicos, además de ser efluentes de un color café oscuro (Estrada-Vázquez *et al.*, 1999).

Los efluentes de la ICP son de difícil tratamiento debido principalmente a su alto contenido de materia orgánica recalcitrante la cual esta compuesta principalmente de compuestos derivados de la lignina. Los hongos basidiomicetos representan una alternativa viable para la remoción de lignina, la cual se puede ver incrementada por las ventajas que ofrecen su inmovilización, desde luego manteniendo las condiciones de cultivo adecuadas para la producción de las enzimas responsables de dicha remoción.

El efluente residual a tratar proviene del proceso de celulosa Kraft no integrada, es decir, que elaboran celulosa, papel y cartón no blanqueado; el cual está contaminado principalmente con licor negro, proveniente de la digestión química de la lignina de las astillas, llamado Licor Diluido.

2.1. La Lignina.

La palabra lignina proviene del término latino *lignum*, que significa madera; así, a las plantas que contienen gran cantidad de lignina se las denomina “leñosas”. La lignina se caracteriza por ser un complejo aromático (no carbohidrato) del que existen muchos polímeros estructurales (ligninas). Resulta conveniente utilizar el término lignina en un sentido colectivo para señalar la fracción lignina de la fibra.

La molécula de lignina es una macromolécula, con un elevado peso molecular, que resulta de la unión de varios ácidos y alcoholes fenilpropiónicos (cumarílico, coniferílico y sinapílico). El acoplamiento aleatorizado de estos radicales da origen a una estructura tridimensional, polímero amorfo, característico de la lignina.

La lignina es el polímero natural más complejo en relación a su estructura y heterogeneidad. Por esta razón no es posible describir una estructura definida de la lignina; sin embargo, se han propuesto numerosos modelos que representan una “aproximación” de dicha estructura.

Este polímero aromático da resistencia y rigidez a la estructura de la madera y la protege del ataque microbiano (Waldner *et al.*, 1998). Esta molécula es estereoquímicamente compleja y de alto peso molecular. Debido a esto, relativamente pocos microorganismos pueden degradarla (Paszczynski *et al.*, 1996).

2.2. Hongos Basidiomicetos.

Los hongos basidiomicetos han demostrado ser un grupo de microorganismos con una capacidad única de degradación biológica efectiva de la celulosa y la lignina mediante un proceso oxidativo y el mecanismo no es específico, dado que se han encontrado diferentes productos aislados de la degradación de la madera y de cultivos ligninolíticos. Estos hongos usan la fracción de la celulosa como una fuente de carbono y tienen la

habilidad para degradar completamente la lignina para tener acceso a la molécula de celulosa. Con niveles bajos de nitrógeno y carbono se induce la actividad ligninolítica en los hongos ligninolíticos, durante la cual desarrollan actividades enzimáticas extracelulares. Dentro de estas enzimas, se encuentran: Ligninoperoxidasa (LiP), la manganesperoxidasa (MnP) y la lacasa (Lac) (Kuwahara *et al.*; Hatakka, 1994). Estas enzimas se producen durante su metabolismo secundario (Eriksson y Pettersson, 1988). Los hongos basidiomicetos han sido extensamente estudiados debido a su alta capacidad degradadora.

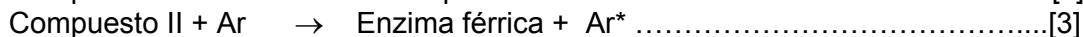
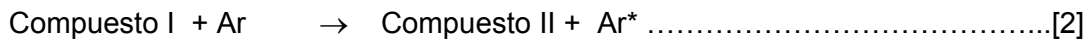
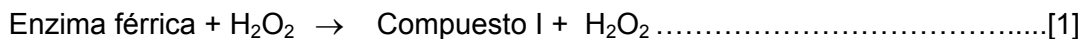
Así mismo, se ha demostrado que los hongos basidiomicetos muestran mejores eficiencias de remoción de color que otros microorganismos, aunque el pH óptimo para la actividad depuradora de los hongos es aproximadamente 4.5 siendo que el efluente anaerobio (EAn) tiene un pH aproximado de 8.5, lo cual implica un gasto al acidificar el EAn y un reto a la resistencia. Dentro de los estudios de remoción de color, se ha observado que *Lentinula edodes* (Le) posee una gran eficiencia de degradación, por encima de otras especies de hongos basidiomicetos (Esposito *et al.*; 1991; Estrada *et al.*, 1999; Ramírez-Canseco *et al.*, 2000).

Se sabe que las enzimas ligninolíticas son principalmente del tipo oxido-reductasa que catalizan reacciones de oxido-reducción por la transferencia de hidrógeno o de electrones de un donador en estado oxidado, hacia un receptor en estado reducido. Sin embargo, aun no se han podido determinar todas las enzimas que intervienen en la degradación de la lignina y compuestos tóxicos.

La **ligninoperoxidasa (LiP)** es una glicoproteína que contiene un grupo hemo la cual requiere de peróxido de hidrógeno como oxidante. Su peso molecular es de entre 41-42 Kda, contiene un mol de fierro protoporfirina IX. La LiP oxida las subestructuras de lignina no fenólicas eliminando un electrón y generando radicales cationes los que son descompuestos químicamente (Bonnamme y Jeffries, 1990). Debido al alto potencial redox, los sustratos preferidos para la LiP son subunidades sustituidas con grupos metoxi no fenólicos. Por otro lado, es una enzima inespecífica extracelular dependiente de H_2O_2 y cataliza gran variedad de reacciones, por ejemplo, oxida los alcoholes bencílicos, oxida los fenoles hasta radicales copulantes, hidroxilación de ciertos grupos bencil metilenos.

Como todo sistema ligninolítico, **LiP** es una enzima específica la cual es oxidada por peróxido de hidrógeno (H_2O_2) formando el llamado compuesto I, un catión ferril- π -porfirinico, que puede oxidar una molécula-sustrato formando radicales (generalmente

arilos), y el compuesto II; la enzima completa su ciclo catalítico cuando el compuesto II reacciona con otra molécula-sustrato (Alleman *et. al.* 1992).



La característica que les permite a las **LiP's** degradar compuestos aromáticos que otras peroxidasa no pueden es su potencial de ionización (Livernoche, *et. al.* 1983). Las **LiP's** son inhibidas competitivamente por cloruros a una concentración de 29.4 mM y por azida de sodio, cianuros y EDTA a una concentración de 1mM (Kuwahara *et al.*, 1990).

La **Manganeso Peroxidasa (MnP)** también es una glicoproteína que contiene un grupo Hemo, la cual requiere de peróxido de hidrógeno como oxidante. La MnP oxida Mn(II) a Mn(III), este último oxida los anillos fenoles a radicales fenoxi, los cuales actúan en la descomposición de los compuestos. Esta peroxidasa, a diferencia de la LiP, actúa exclusivamente sobre sustratos fenólicos y no oxida al alcohol vetrátrico. También cataliza reacciones adicionales que incluyen oxidaciones que requieren H_2O_2 para poder reducir el glutatoniato, DHM, GSH y NADPH (Paszczynski *et al.*, 1986).

Durante su acción produce H_2O_2 pues los protones y electrones que son removidos del sustrato oxidado son aceptados por el oxígeno. Los iones manganeso participan en la reacción como un par redox en lugar de actuar como un activador enzimático, como se muestra en la figura 1.

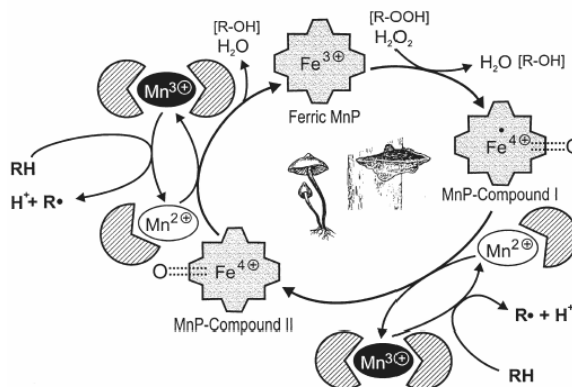


Figura 1. Ciclo catalítico de Manganesoperoxidasa (Martin Hofrichter, 2002).

La **Lacasa (Lac)** es también una glicoproteína que contiene cantidades iguales de carbohidratos enlazados al oxígeno o al nitrógeno. Esta enzima es una oxidasa que contiene cuatro iones de cobre y utiliza al oxígeno molecular como oxidante.

Al igual que la MnP, también oxida los anillos fenólicos a radicales fenoxi, oxida fenoles y estructuras fenólicas derivadas de la lignina eliminando un electrón y la subsecuente formación de radicales que pueden ser repolimerizados y permite así la despolimerización (Tuor *et al.*, 1995). También es capaz de oxidar los compuestos fenólicos bajo ciertas condiciones de reacción, por ejemplo, si la mezcla de reacción es suplementada con ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico).

La producción de **proteasas** extracelulares es también una actividad común que presentan los hongos basidiomicetos degradadores de madera. Cuando el hongo es cultivado en celulosa, se presenta actividad de endo-1,4- β glucanasa, acompañada también por una alta actividad de proteasas en cultivos en solución (Erikson y Peterson, 1982).

El incremento de la actividad proteolítica esta acompañada por una rápida lisis de la pared celular del hongo. La producción de proteasas depende de la disponibilidad de fuentes de nitrógeno y carbono en el medio; tanto a niveles bajos como en exceso de nitrógeno puede causar una inhibición en la biosíntesis de proteasas (Erikson y Peterson, 1988). La producción de proteasas también puede ser inhibida por niveles altos de fuente de carbono. Las enzimas proteolíticas juegan un papel importante en la fisiología del hongo, incluyendo su metabolismo, como la germinación, y la esporulación (Asit Data; 1991).

2.3. Tratamiento de efluentes contaminados con licor negro de la Industria de la Celulosa y Papel Kraft.

Los procesos de tratamiento empleados están determinados en gran medida por las normas de descargas y por el costo de inversión y operación. En general existen dos formas para el tratamiento de estos efluentes: tratamientos fisicoquímicos y tratamientos biológicos (Estrada-Vázquez *et al.*, 1999).

Los primeros utilizan métodos como: floculación, filtración, adsorción, etc., que se logran adicionando sustancias químicas al agua o mediante el paso del efluente a través de un lecho inorgánico (arena, resina, etc.) mientras que los segundos utilizan consorcios microbianos (Bacterias) y algunos organismos (Microorganismos "hongos"), para remover

a los contaminantes. Estos últimos constituyen una aplicación de la Biotecnología, teniendo una gran área de aplicación en este campo (Buchtman, *et. al.* 1997). Puesto que los sistemas fisicoquímicos tienen una participación muy costosa para eliminar contaminantes orgánicos, es mejor utilizar los biológicos para tal fin; dentro de los cuales tenemos los procesos aerobios y los procesos anaerobios. Tomando en cuenta que los efluentes ICP tienen como componentes mayoritarios derivados de ligninas (Livernoche *et al.*, 1983; Estrada *et al.*, 1999), ocasionan un aumento en color y materia orgánica como la DBO y DQO. En México, el endurecimiento de la reglamentación ambiental está haciendo que la industria adopte en forma generalizada el tratamiento secundario y parcialmente incluye procesos de tratamiento avanzado o terciario, cuando no hace muchos años solo era necesario el tratamiento primario.

La presión de los costos a su vez está induciendo a la aplicación de los tratamientos biológicos anaerobios y aerobios, especialmente utilizando configuraciones de reactores con biomasa inmovilizada. Dentro de los procesos aerobios podemos encontrar típicamente las lagunas aireadas y los lodos activados, mientras que para los procesos anaerobios encontraremos principalmente los reactores anaerobios de biomasa adherida. Estos procesos exhiben gran capacidad para reducir DBO y DQO, más no así una reducción en el color y otros componentes recalcitrantes producidos por la lignina en los efluentes.

Dentro de las experiencias obtenidas en el Grupo de Biotecnología Ambiental, del departamento de biotecnología y bioingeniería (DBB) del CINVESTAV-IPN, destacan estudios realizados para el tratamiento anaerobio de LD usando un reactor anaerobio de lecho fluidizado (RANLEF), un filtro biológico anaerobio de flujo descendente (FIBAN), el postratamiento del efluente anaerobio (EAn) en un reactor de biodiscos rotatorios (RBDR), donde se emplearon consorcios bacterianos heterogéneos, evaluando la remoción de carga orgánica y la toxicidad (Hernández-Vera 1994) y el postratamiento del EAn en un reactor de aerobio de lecho fluidizado (RLF) con *Lentinula edodes* inmovilizado en alginato de calcio obteniéndose las mejores eficiencias de remoción en las unidades suplementadas con maltosa (0.3%) en forma continua (Ramírez-Canseco *et al.*; 2000).

Dichos estudios determinaron que los tratamientos anaerobios reducen la carga orgánica, aunque la reducción de toxicidad es moderada-baja; mientras que la etapa aerobia no removió DQO ni toxicidad.

Se ha encontrado que los hongos Basidiomicetos, tienen capacidad de biodegradación de lignina, y que además de metabolizar y degradar lignina natural

también degrada lignina del proceso Kraft y lignosulfonatos (Livernoche *et al.*, 1983). En estudios realizados posteriormente (Estrada-Vázquez *et al.*, 1999), se evaluaron las eficiencias de color y ligninoides mediante un tratamiento realizado en un RANLEF, utilizando como material de soporte carbón activado granular (CAG) y como inóculo la biomasa de un digestor anaerobio (Ean), seguido por dos tipos de postratamiento, uno biológico y otro fisicoquímico.

El post-tratamiento biológico se realizó en lotes con hongos (*Trametes versicolor* y *Lentinula edodes*) utilizando micelio libre, micelio inmovilizado en alginato de calcio y CAG; y para el tratamiento fisicoquímico se acondicionaron tres columnas empacadas con CAG en serie para el tratamiento de los EAn. Los resultados obtenidos muestran que existen una mayor eficiencia en la remoción de color y ligninoides con los hongos inmovilizados en alginato de calcio, destacando *Le*. Sin embargo, se observó que las eficiencias de remoción de éstos parámetros en el tratamiento anaeróbico con un RANLEF fueron mas altas que las encontradas en bibliografía para el reactor anaerobio de mantos de lodos (RANMAL), (Estrada-Vázquez *et al.*, 1997); demostrando con esto que los RANLEF tiene una mayor capacidad de remoción de materia orgánica, además de diversas ventajas operacionales.

2.4. Microorganismos inmovilizados.

La inmovilización de células es un método bien establecido en los campos científico e industrial. El punto realmente importante es que en general la actividad removedora del microorganismo no se pierde y es estable por largos periodos de tiempo (Rodríguez *et. al.* 2002).

La inmovilización de enzimas permite una mejora significativa de su estabilidad, lo que hace posible su empleo en la obtención a nivel industrial de productos químicos, farmacéuticos, alimentos, tratamiento de residuos, diagnóstico y tratamiento de enfermedades (Cornwell, 1990).

En últimos años los procesos con biomasa inmovilizada se han desarrollado intensivamente. Existen diferentes materiales que pueden servir como soporte para la inmovilización de células, tomando en cuenta que la célula debe quedar atrapada de forma física sobre un soporte, algunos investigadores proponen el alginato como un medio de soporte para la inmovilización, el cual en la actualidad es ampliamente utilizado.

Por otro lado el carbón activado granular (CAG) ha demostrado poseer una gran capacidad de adsorción, debido a su gran área superficial (Alleman, *et. al.* 1992) por lo que se ha usado ampliamente como soporte de bacterias en el tratamiento de aguas. También se ha observado que puede remover gran parte de la materia orgánica presente en ella. Aprovechando estas características el CAG se ha empleado como material de inmovilización para hongos (Estrada *et al.*, 1999) y bacterias o mezclado con alginato de calcio para la inmovilización de bacterias teniendo la ventaja de contar con una bio-regeneración provocada por los microorganismos inmovilizados en él alginato de calcio (Staszczak, 2002).

2.5. Hongos inmovilizados.

Ya existen diversos estudios en los que se reportan la inmovilización de enzimas o microorganismos (Rodríguez, *et. al.* 2002). En uno de estos estudios se encontró que la inmovilización del hongo tiene mejores eficiencias de remoción de contaminantes que el micelio libre (Estrada-Vázquez, 1997) independientemente de la gran ventaja económica que esto representa.

En los ensayos de postratamiento del efluente anaerobio (EAn) en matraz, se pudo constatar que en general las remociones de los parámetros contaminantes fueron significativamente mayores a pH 4.5 que a pH 7. El efecto del tipo de madera sobre dichas respuestas fue diverso: la remoción de materia orgánica como DQO fue superior con *Tv* inmovilizado sobre encino, mientras que las remociones de color y ligninoides resultaron significativamente superiores con *Tv* en pino. A nivel matraz, se consiguió mantener la actividad depuradora del hongo durante 8 ciclos de 7 días, es decir, durante un período de 56 días sin necesidad de adicionar fuentes de carbono solubles.

Respecto al postratamiento del EAn en reactor fúngico empacado se presentó un periodo de transición en los primeros 10 días de operación en donde las remociones de los parámetros contaminantes fueron pobrísimas. A partir de ese punto las remociones brutas fueron de 27.19 ± 5.96 % DQO, 62.59 ± 3.91 % color, 46.85 ± 5.29 % ligninoides para TRH de 5 días, y 32.08 ± 4.26 % DQO, 69.22 ± 3.88 % color, 54.52 ± 2.93 % ligninoides para TRH de 2.5 día. Se notó un ligero incremento en las remociones a TRH 2.5 días, pero no fue estadísticamente significativo.

2.6. Hongos utilizados en el tratamiento de Efluentes de la Industria de la Celulosa y Papel

Se ha demostrado que los hongos basidiomicetos de la Pudrición Blanca degradan la lignina, un polímero en la madera ambientalmente persistente, teniendo una utilidad potencial en la biocatalización de la remoción de compuestos orgánicos tóxicos de las aguas residuales de la industria de la celulosa y papel (Cornwell *et al.*; 1990). Uno de estos organismos en particular, *Phanerochaete chrysosporium*, se tiene reportado la degradación de compuestos de ligninas cloradas resultado de la producción de celulosa Kraft de madera. También se encuentra reportado la mineralización de una gran variedad de otros compuestos policíclicos aromáticos y clorados; demostrando mejores eficiencias de remoción de color que otros microorganismos (Esposito *et al.*; 1991) aunque el pH óptimo para la actividad depuradora de los hongos es de aproximadamente 4.5 siendo que los EAn tienen un pH aproximado de 8.5, lo cual implica un gasto al acidificar el efluente anaerobio. Dentro de los estudios de remoción de color, se ha observado que *Tv* posee una gran eficiencia de degradación superior a otras especies de hongos basidiomicetos (Esposito *et al.*, 1991; Estrada; 1997).

3. JUSTIFICACIÓN

Se ha observado que el licor diluido proveniente de la ICP, aun después de haber sido tratado de manera anaerobia, es de difícil tratamiento debido a su alto contenido de derivados de la lignina. Los hongos basidiomicetos representan una alternativa viable para la remoción de la lignina y sus derivados, lo cual se puede ver incrementado por las ventajas de su inmovilización.

4. HIPÓTESIS

General.

Habrá una mayor remoción de contaminante durante el postratamiento del efluente anaerobio usando *Trametes versicolor* inmovilizado en aserrín-carbón activado (pellets tripes), en comparación con el postratamiento usando *Trametes versicolor* inmovilizado en aserrín (pellets mixtos).

Específica

Hay una asociación entre la presencia de enzimas típicas de los hongos basidiomicetos (MnP, LiP, Lac), especialmente con MnP y la remoción de contaminantes

durante el postratamiento del Efluente Anaerobio utilizando *Trametes versicolor* inmovilizado en aserrín de encino-carbón activado en ensayos semi-continuos.

5. OBJETIVOS.

5.1. OBJETIVO GENERAL.

Determinar los niveles de remoción de contaminantes del Efluente Anaerobio utilizando *Trametes versicolor* inmovilizado en aserrín de encino-carbón activado en ensayos semi-continuos y la asociación de la enzimas MnP, LiP y Lac con la remoción.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 5.2.1 Conformar un protocolo de formación de biocatalizadores para el tratamiento de efluente anaerobio.
- 5.2.2 Determinar los parámetros de DQO, color y Ligninoides en los ensayos semi-continuos.
- 5.2.3 Determinar las actividades enzimáticas de MnP, LiP, Lac y Pro en ensayos semi-continuos.

6 METODOLOGÍA.

FASE 1. PREPARACIÓN DE BIOCATALIZADORES Y POSTRATAMIENTO A NIVEL MATRAZ.

Actividad 1. Determinación de la capacidad de inmovilización del micelio (*Trametes versicolor*), aserrín de encino (pellets mixtos) y aserrín de encino/carbón activado (pellets triples).

En esta primera actividad es necesario la propagación de la cepa *Trametes versicolor* que nos permita contar con el micelio suficiente para los ensayos de inmovilización, así como la procuración de los soportes (aserrín de encino, carbón activado, cubos de encino).

- a) Propagación de cepas y mantenimiento.

En esta actividad se realizó la resiembra y verificación de la pureza de la cepa de acuerdo a las técnicas empleadas en microbiología para el mantenimiento y propagación de hongos. Se cuenta con la cepa *Trametes versicolor* (CDBB-h-1051), proveniente de la colección de cultivos microbianos del CINVESTAV-IPN. Esta cepa fue gentilmente donada por el Dr. Ian Reid de Paprican Canadá, 1994.

Para la propagación de *Trametes versicolor* en medio sólido se cultivo en cajas Petri conteniendo agar de papa y dextrosa (PDA). La cajas se incubaron a 28 °C durante 7 días, tiempo requerido para observar un cubrimiento de la placa de agar; una vez cubierta la placa con micelio se procedió a cortar cuadritos de agar de aproximadamente 5mm por 5mm e inocular en tubos inclinados conteniendo PDA.

Los tubos inclinados se incubaron a 28°C por 7 días. La propagación en medio líquido se realizo mediante el lavado de tubos con 3ml de agua destilada para separar el micelio crecido en los tubos. El líquido del lavado se utilizo para inocular los matraces (3 tubos por matraz) con aproximadamente 9 ml por matraz conteniendo medio líquido de extracto de malta (EMA) y se incubaron a 28°C y 100 rpm durante 7días. Esto sirve para crecimiento. Para inducir el sistema ligninolítico, se ha reportado que los hongos necesitan crecer en medio deficiente de nitrógeno. Para *Trametes versicolor* se ha recomendado el medio micológico (MM), por lo que se incubaron en MM durante 7 días a 28 °C a 100 rpm.

b) Preparación del soporte.

En esta actividad se determino el tamaño promedio de la partícula de aserrín de encino y carbón activado granular en μm , mediante el uso de un tamaño de malla; para soporte grueso se utilizo malla 35 – 60 y para soporte fino malla 60-150.

c) Formación de biocatalizadores.

En esta actividad se realizo un estudio para determinar la relación hongo/aserrín de encino (pellets mixtos) hongo/aserrín de encino/carbón activado (pellets triples) en las proporciones que se presentan a continuación, expresados en base seca, buscando la formación de pellets discretos con una cantidad de 40 mg de micelio inmovilizado (T_v).

Proporción masa micelio / masa soporte (s)

30 mg Aserrín/ 30 mg Hongo

15 mg Aserrín/ 15 mg Carbón activado/30 mg Hongo

Las proporciones antes mencionadas para el estudio de inmovilización se eligieron en base al artículo presentado por Zhang y Yu 2000, quienes trabajaron con un sistema similar para la decoloración del colorante violeta 7 inmovilizando hongo sobre carbón activado, así como los tipos de inmovilización.

Para iniciar la formación de los pellets es necesario dar un tratamiento previo al soporte, con la finalidad de acelerar la adhesión del micelio (T_v) sobre el soporte. El tratamiento consistió en poner primero en contacto el soporte (aserrín de encino solo y aserrín de encino-carbón activado) en un matraz (250 mL) con 100 mL de medio de

inducción (líquido) para la formación de pellets, embebiéndose el soporte con el medio para posteriormente esterilizar a 121 °C (15 psi) por 15 min., dejando reposar el medio estéril con el soporte por 24 hrs. antes de inocular los matraces con 10 ml de micelio (7 días de crecimiento) previamente disgregado en un homogenizador (licuadora), todo en condiciones de esterilidad.

Como control, se colocaron matraces con hongo solo para ver la formación de pellets normales.

En la Tabla 2, se muestra el seguimiento de análisis que se llevo para el experimento de inmovilización de *Trametes versicolor* sobre aserrín de encino (pellets mixtos) y aserrín de encino /carbón activado (pellets triples), así como determinar el tiempo requerido y la forma para inmovilizar 8 mg de biomasa/mg de aserrín (pellets mixtos) y 8 mg de biomasa /mg se aserrín de encino / mg de carbón activado (pellets triples).

Tabla 2. Tabla de seguimiento y análisis para el experimento de inmovilización de *Trametes versicolor* sobre aserrín de encino (pellets mixtos) y aserrín de encino/carbón activado (pellets triples) en medio líquido.

PARÁMETRO	INICIO	INTERMEDIO	FINAL	OBS.
Masa Hongo en pellet y suspendido	X		X	Incubación de 7 días a 28 °C y 80 rpm en medio líquido
Masa Aserrín en pellet y suspendido	X		X	
Masa Carbón activado en pellet y suspendido	X		X	
Número de pellets			X	
Tamaño de pellets			X	

FASE 2. EVALUACIÓN DE ENSAYOS DE REMOCIÓN A NIVEL MATRAZ.

Actividad 2. Determinación de la capacidad y duración de la actividad depuradora de efluente anaerobio tratado con biocatalizadores en ensayos de lotes repetidos a nivel matraz.

Esta actividad consistió en tres vertientes:

2.1. Preparación de biocatalizadores.

De acuerdo con los resultados de la Actividad 1, se preparo un número suficiente de pellets mixtos y triples para conformar todos los matraces del experimento de depuración.

2.2. Depuración del efluente anaerobio (Semi-continuo).

Esta es el núcleo de la actividad, donde los pellets están en contacto semi-continuo con efluente anaerobio acondicionado para efectuar su depuración.

2.3. Determinación de actividades enzimáticas extracelulares presentes en el ensayo matraz (MnP, LiP, Lac, Proteasas) y determinación de la remoción de contaminantes (DQO, color y ligninoides).

La remoción de contaminantes se estableció sobre la base de eficiencia unitaria neta y eficiencia específica unitaria neta (η_{un} y η_{sun}). Este segundo tipo de variable tiene la ventaja que determina la proporción relativa (unitaria) de remoción de contaminante referida por unidad de biomasa en el sistema (específica), y descontando la remoción del control estéril (neta). Provee más información, esta puede ser útil para un eventual escalado, e indica hasta cierto punto la remoción biológica de contaminante.

Las respuestas fueron medidas en ciclos de 7 días, a: día 0; b: día 3; c: día 7.

La η_{sun} expresa la eficiencia específica unitaria neta. Para cálculos de la η_{sun} de los principales parámetros contaminantes (DQO, color, ligninoides) es:

$$\eta_{sun} = [(P_i - P_f) - (P_{ic} - P_{fc})] / (P_i * B_0) \dots\dots\dots [4]$$

Donde:

η_{sun} : Eficiencias específicas unitarias netas.

P_i = Valor inicial del parámetro.

P_f = Valor final del parámetro.

P_{ic} = Valor inicial del control.

P_{fc} = Valor final del control.

B_0 = Biomasa inicial por matraz, en mg

Las unidades para cada η_{sun} son: color, (Abs) / ((mg biomasa)*(Abs)); ligninoides, (mg lig) / ((mg lig)*(mg biomasa)) y para DQO: (mg DQO) / ((mg DQO)*(mg biomasa)).

La η_{un} expresa la eficiencia unitaria neta (es unitaria por que es por cada parámetro y neta por que se descuenta el control)

La formula empleada para el cálculo de las eficiencias unitarias netas (η_{un}): DQO, color, ligninoides.

$$\eta_{un} = [(P_i - P_f) - (P_{ic} - P_{fc})] / (P_i) * 100 \dots\dots\dots [5]$$

Donde:

η_{un} : Eficiencias unitaria neta.

P_i = Valor inicial del parámetro.

P_f = Valor final del parámetro.

P_{ic} = Valor inicial del control.

P_{if} = Valor final del control.

Las unidades de η_{un} son porcentaje del parámetro correspondiente. Las técnicas analíticas se muestran en el anexo A.

Actividad 3. Determinación de la capacidad depuradora de efluente anaerobio tratado con biocatalizadores en ensayo a nivel matraz agregando inhibidor de proteasas (fenilmetanosulfonilfluorida) en los días de mayor actividad de estas (4 y 14).

Esta actividad consistió en tres vertientes:

3.1. Preparación de biocatalizadores.

Se preparo un número suficiente de pellets triples para conformar los matraces del experimento de depuración.

De acuerdo a los resultados de la actividad 2, se agrego un inhibidor de proteasas los días que estas presentaron una mayor actividad.

3.2. Depuración de efluente anaerobio

3.3. Determinación de actividades enzimáticas extracelulares presentes en el ensayo matraz (MnP, LiP, Lac, Proteasas) y determinación de la remoción de contaminantes (DQO, color y ligninoides).

Las respuestas fueron medidas diariamente durante 28 días, de igual manera que en la actividad 2, se determino eficiencia unitaria neta y eficiencia específica unitaria neta (η_{un} y η_{sun}).

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Caracterización del efluente anaerobio.

En la Tabla 3, se muestran los resultados de la caracterización del EAn. El efluente anaerobio proviene de un pretratamiento de agua residual contaminada con licor negro (licor diluido) en reactor metanogénico de lecho fluidizado (Estrada-Vázquez et al., 1998). Los resultados muestran que el EAn tiene un pH de 8.2 es un efluente residual de carga orgánica moderada, donde aproximadamente el 85-90 % son derivados de lignina; es pobre en nitrógeno y tiene una conductividad moderada-alta.

Para los ensayos de remoción este es un problema, siendo necesario ajustar el pH a 4.5 ya que este pH es optimo para el crecimiento del hongo, en todas las unidades según corresponde.

Tabla 3. Caracterización del efluente anaerobio.

PARÁMETRO (unidades)	VALOR
DQO (mg O ₂ / L)	1260 ± 84.85
DBO (mg O ₂ / L)	513 ± 27.35
Color (Absorbancia a 436 nm)	0.570
Ligninoides (Absorbancia a 254 nm)	3.595
pH	8.2
NKT(mg N /L)	2
Conductividad (μS/cm)	10000
Alcalinidad (mg/L CaCO ₃)	135
Dureza (mg/L CaCO ₃)	120

7.2 Ensayos de inmovilización de *Trametes versicolor* en soporte de aserrín de encino (Pellets Mixtos), aserrín de encino-carbón activado (pellets triples)

Durante la inmovilización de *Trametes versicolor* en los ensayos de cultivo líquido, se pudo observar que es necesario realizar un disgregado del micelio de manera física con ayuda de una licuadora e inocular los matraces conteniendo el soporte (aserrín de encino y aserrín de encino-carbón activado) previamente esterilizados en 100 ml de medio de inducción de pellets de crecimiento; sin embargo se realizó un segundo ensayo de inmovilización (formación de Pellets) adicionando al medio de inducción de formación de pellets de crecimiento 5 g/L de peptona de soya como fuente de nitrógeno, teniendo un efecto en la velocidad de crecimiento de manera positiva.

En las Tablas 4 y 5, se muestran los resultados de los primeros ensayos presuntivos de inmovilización en soporte de aserrín de encino (pellets mixtos) y aserrín de encino-carbón activado (pellets triples), la contabilización del micelio inmovilizado se realizó al 7° día de crecimiento sobre el soporte, esto debido; a que la máxima velocidad de crecimiento reportada se presenta en los primeros 7 días de incubación. Los soportes utilizados para la inmovilización se caracterizaron según su tamaño aproximado en base a

la malla utilizada para su separación; para soporte grueso se utilizó las mallas 35-60 y para soporte fino las mallas 60-150.

La cantidad de micelio y soporte inmovilizado corresponden a un promedio de 2 pellets formados por matraz con un tamaño promedio por pellets de 2 ± 0.3 cm de diámetro.

Tabla 4. Resultados del primer ensayo de inmovilización de *Trametes versicolor* en las diferentes combinaciones de soportes gruesos.

Clave	Soporte inmovilizado (mg)	Micelio inmovilizado (mg)	Micelio libre (mg)	$\eta_{\text{inm.}}/\text{soporte}$ (%)	$\eta_{\text{inm.}}/\text{micelio}$ (%)
30 ^a /30H (Mixto)	6.2 ± 5	25.4 ± 9.2	79.7 ± 6.0	20.5 ± 16.7	23.8 ± 5.34
15 ^a /15CA/30H (Triple)	21.4 ± 0	162.4 ± 25.4	36.2 ± 4.3	71.3 ± 0.00	81.5 ± 4.13
10 ^a /20CA/30H (Triple)	19.3 ± 0.2	239.0 ± 12.2	12.5 ± 4.8	64.2 ± 0.70	95.1 ± 1.57

Tabla 5. Resultados del primer ensayo de inmovilización de *Trametes versicolor* en las diferentes combinaciones de soportes finos.

Clave	Soporte inmovilizado (mg)	Micelio inmovilizado (mg)	Micelio libre (mg)	$\eta_{\text{inm.}}/\text{soporte}$ (%)	$\eta_{\text{inm.}}/\text{micelio}$ (%)
30A/30H (Mixto)	12.6 ± 0.9	177.5 ± 45.9	29.7 ± 4.2	42 ± 3.29	85.2 ± 5.03
15A/15CA/30H (Triple)	25.3 ± 2.2	117.8 ± 14.9	17.2 ± 11.2	84.3 ± 7.54	87.8 ± 5.97
10A/20CA/30H (Triple)	18.4 ± 0.7	95.9 ± 14.3	13.1 ± 0.3	61.3 ± 2.35	87.9 ± 1.87

En la Tabla 6 y 7, se muestran los resultados de los segundos ensayos presuntivos de inmovilización en soporte de aserrín de encino (pellets mixtos) y aserrín de encino-carbón activado (pellets triples), en este caso se agrego 5 g de peptona de soya por litro, la contabilización del micelio inmovilizado se realizo al 7^o día de crecimiento.

La cantidad de micelio y soporte inmovilizado corresponden a un promedio de 10 ± 2 pellets formados por matraz con un tamaño promedio por pellets de 0.5 ± 0.02 cm de diámetro.

Tabla 6. Resultados del segundo ensayo de inmovilización de *Trametes versicolor* en las diferentes combinaciones de soportes gruesos

Clave	Soporte inmovilizado (mg)	Micelio inmovilizado (mg)	Micelio libre (mg)	$\eta_{\text{inm.}}/\text{soporte}$ (%)	$\eta_{\text{inm.}}/\text{micelio}$ (%)
-------	---------------------------	---------------------------	--------------------	---	---

30A/30H (Mixto)	21.0 ± 1.0	98.4 ± 9.4	188.6 ± 42.5	70.16 ± 3.53	34.71 ± 7.27
15A/15CA/30H (Triple)	23.5 ± 0.7	268.3 ± 27.5	50.6 ± 11.8	78.33 ± 2.35	84.02 ± 4.51
10A/20CA/30H (Triple)	18.9 ± 1.7	207.3 ± 6.0	88.5 ± 12.7	63.16 ± 5.89	70.11 ± 3.64

Tabla 7. Resultados del segundo ensayo de inmovilización de *Trametes versicolor* en las diferentes combinaciones de soportes finos.

Clave	Soporte inmovilizado (mg)	Micelio inmovilizado (mg)	Micelio libre (mg)	$\eta_{inm./soporte}$ (%)	$\eta_{inm./micelio}$ (%)
30A/30H (Mixto)	24.5 ± 2.8	179.2 ± 6.4	167.0 ± 11.8	81.83 ± 9.66	51.76 ± 2.66
15A/15CA/30H (Triple)	27.0 ± 0.7	216.6 ± 17.6	38.4 ± 0.0086	90.16 ± 2.59	84.85 ± 3.95
10A/20CA/30H (Triple)	21.8 ± 2.6	237.0 ± 40.9	109.9 ± 40.8	72.66 ± 8.95	67.82 ± 11.95

Al comparar los resultados de biomasa inmovilizada de las Tabla 7 y 8, y analizarlos podemos observar que la suplementación del medio de formación de pellets con 5g/L de peptona de soya parece mejorar y acelerar la formación tanto de pellets mixtos como triples.

Los mayores porcentajes de inmovilización de soporte y micelio en pellets mixtos y triples se presentan en los ensayos con el uso soporte fino, presentándose el mismo comportamiento en los dos ensayos de inmovilización llevados a cabo.

7.3 Determinación de los efectos depuradores del hongo en ensayos a nivel matraz

Se han realizado los ensayos de remoción de color, ligninoides y DQO durante 15 ciclos que duró el ensayo. El EAn fue suplementado (Anexo B) y llevado a pH 4.5 (como las condiciones óptimas de crecimiento del hongo).

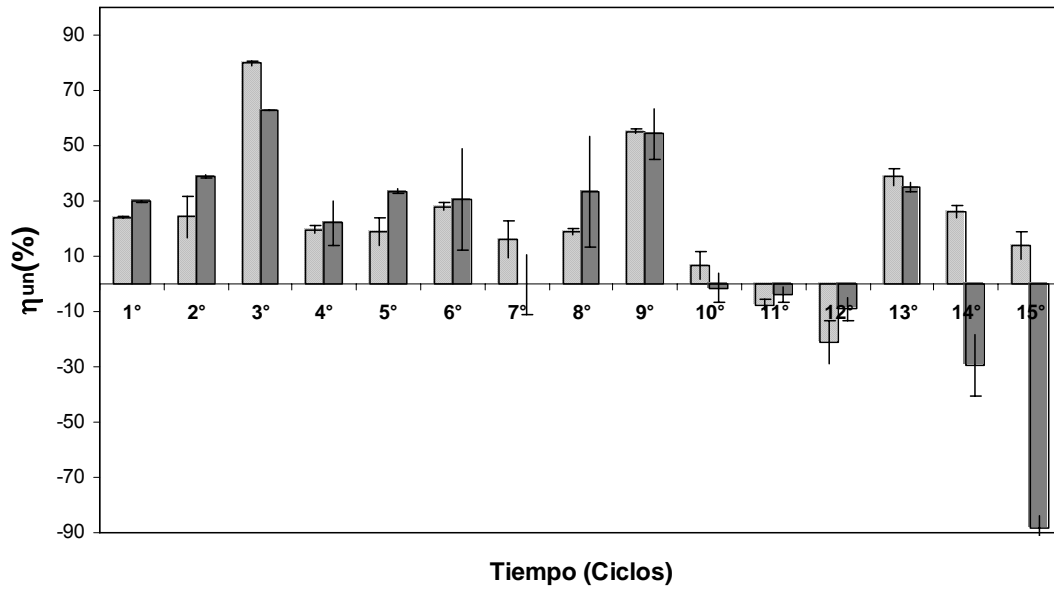
7.3.1. Determinación de las eficiencias unitarias netas (η_{un}) de color, ligninoides y DQO

En la Figura 2a, se muestran los resultados del porcentaje de las eficiencias unitarias netas (η_{un}) de color realizado para ambos tipos de pellets a pH 4.5. Los resultados presentados en esta figura, nos muestran que existen diferencias en los porcentajes de remoción para los dos tipos de pellets (triples y mixtos). Las eficiencias de pellets triples son de 10 a 15 % mayores que pellets mixtos. Sin embargo esa diferencia

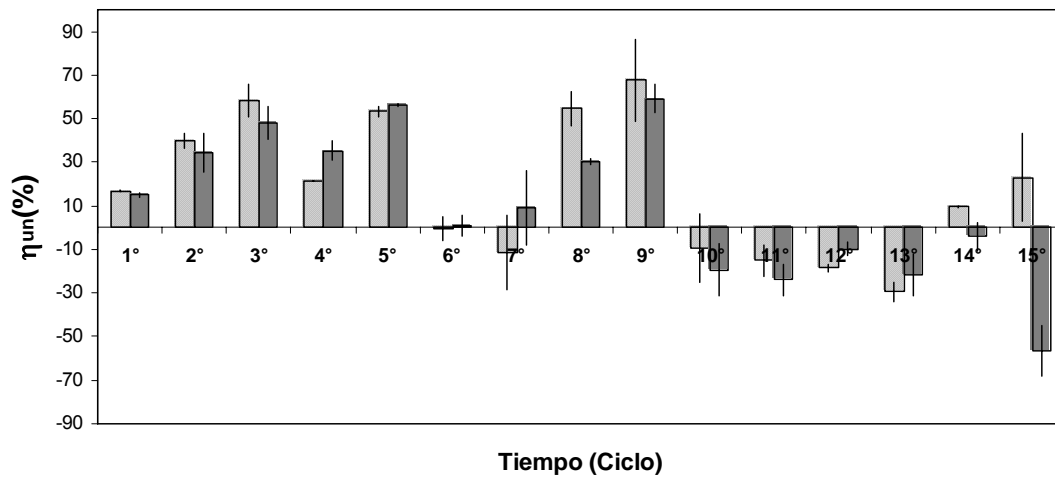
no es estadísticamente significativa debido al ruido experimental. Cabe mencionar que los picos de mayor porcentaje remoción de color por ciclo se presentan 3°, 8° y 9° para los dos tipos de pellets respectivamente con una notable caída en el 10° ciclo presentando porcentajes negativos, esta caída continua para pellets triples hasta el 13° ciclo, recuperándose en los ciclos 14° y 15°, mientras que para pellets mixtos ya no se registro recuperación.

En la Figura 2b, se muestran los resultados del porcentaje de las eficiencias unitarias netas (η_{un}) de ligninoides realizado por *Trametes versicolor* inmovilizado en aserrín de encino/carbón activado (pellets triples) y aserrín de encino (pellets mixtos) a pH 4.5. Los resultados correspondientes a ligninoides presentan el mismo comportamiento que color. Las eficiencias de pellets triples son de 10 a 15 % mayores que pellets mixtos, esa diferencia no es estadísticamente significativa por el ruido experimental presentado (Tabla 10), con porcentajes de mayor remoción en los ciclos 3° y 9° en pellets triples, presentando también la notable caída en el 10° ciclo. Se repite el comportamiento de la eficiencia unitaria neta de color, para pellets triples recuperación en los ciclos 14° y 15°, mientras que para pellets mixtos ya no se registro recuperación.

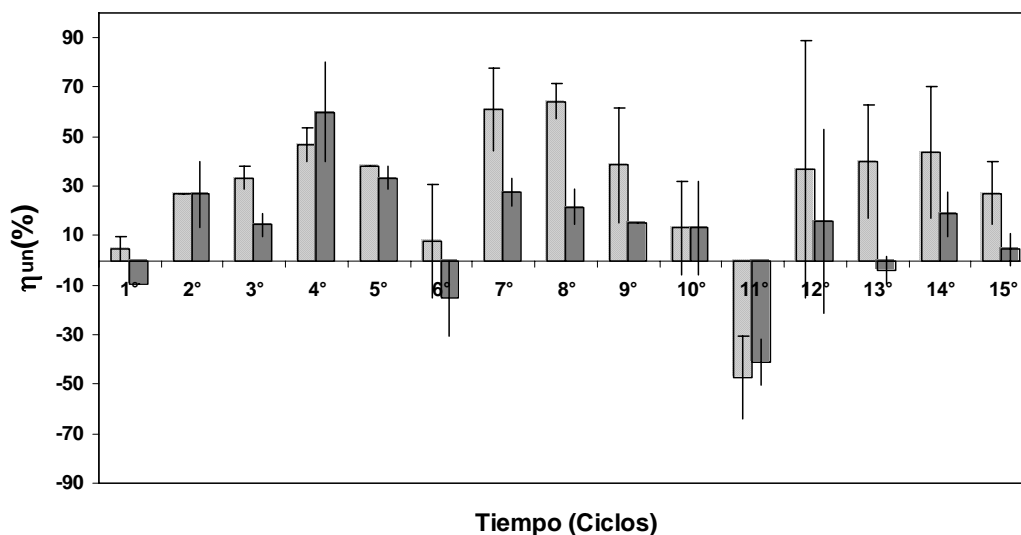
En la Figura 2c, se muestran los resultados del porcentaje de las eficiencias unitarias netas (η_{un}) de DQO para pellets mixtos y triples a pH 4.5. A diferencia de los resultados presentados en las anteriores gráficas correspondientes a η_{un} de color y ligninoides, η_{un} de DQO presenta los mayores % de remoción de materia orgánica en los ciclos 7°, 8° y 9° en pellets triples, observándose diferencia apreciable con respecto a pellets mixtos. Sin embargo de manera general comparando los porcentajes de remoción de materia orgánica promedio de todo el ensayo en ambos tipos de pellets, esa diferencia no es estadísticamente significativa por el ruido experimental presentado, en este parámetro se ve una diferencia de comportamiento con respecto a los otros dos, ya que aquí la caída se registro en el ciclo 11°, recuperándose en los siguientes la remoción para ambos tipos de pellets.



a)



b)



c)

□ Pellets Triples (15/15/30) ■ Pellets Mixtos(30/30)

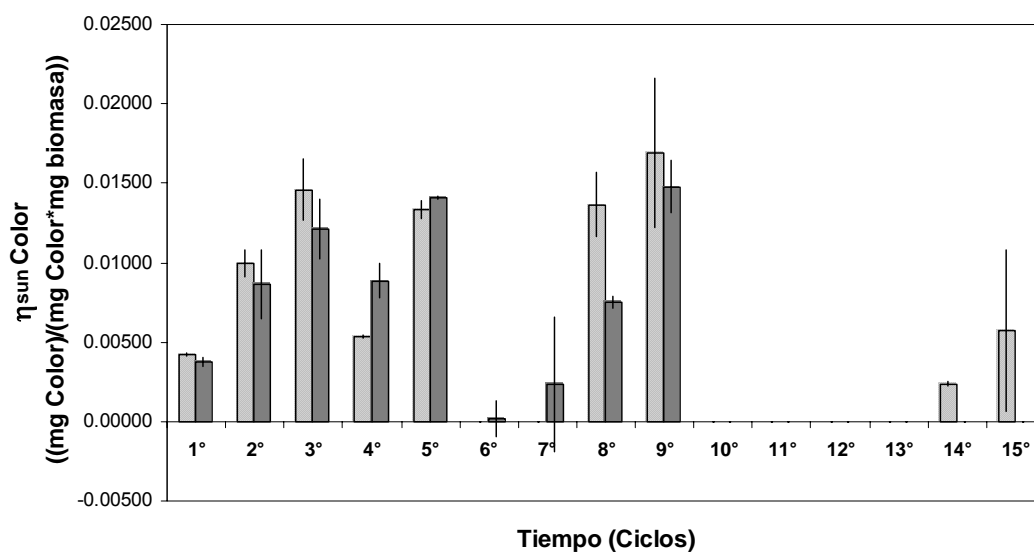
Figura 2. a) Eficiencia unitaria neta (η_{un}) en % de color para pellets triples y pellets mixtos a pH 4.5. b) Eficiencia unitaria neta (η_{un}) en % de ligninoides para pellets triples y pellets mixtos a pH 4.5. c) Eficiencia unitaria neta (η_{un}) en % de DQO para pellets triples y pellets mixtos a pH 4.5.

7.3.3. Determinación de las Eficiencias específicas unitarias netas (η_{sun}), color, ligninoides y DQO

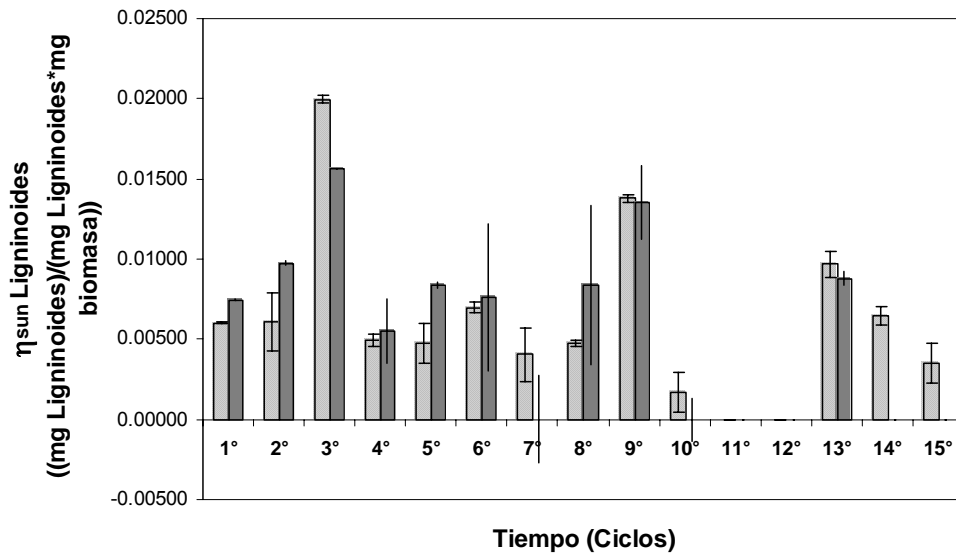
En la Figura 3a, se muestran los resultados de las eficiencias específicas unitarias netas (η_{sun}) de remoción de color realizado por *Trametes versicolor* inmovilizado en aserrín de encino/carbón activado (pellets triples) y aserrín de encino (pellets mixtos) a pH 4.5. Los resultados presentados en esta figura, nos muestran que existen muchas fluctuaciones en las eficiencias a lo largo de todo el ensayo, con tendencia a incrementos en la eficiencia en ciclos continuos; con caídas al siguiente ciclo, esto a lo largo de todo en ensayo. Cabe mencionar que este comportamiento se presenta dos veces, en los primeros 4 ciclos, caída en el 6° y recuperación en 7°, 8° y 9° con caída en el 10°. Las mayores eficiencias presentadas a lo largo de todo el ensayo fueron en los ciclos 3°, 5°, 8° y 9° en pellets triples con una caída total en el 10°, con recuperación parcial durante los dos últimos ciclos (14° y 15°) para pellets triples.

En la Figura 3b, se muestran los resultados de las eficiencias específicas unitarias netas (η_{sun}) para ligninoides en los dos tipos de pellets a pH 4.5. Los resultados mostrados en esta figura no varían mucho con respecto a los presentados en las η_{sun} para color. Los picos donde se presentan las mayores eficiencias en todo el ensayo son en los ciclos 3° y 9° en pellets triples, observándose una caída de la eficiencia por completo para pellets mixtos en el 10° ciclo, la caída sigue durante los ciclos 11° y 12° para ambos tipos de pellets, habiendo una recuperación en el ciclo 13° para ambos tipos de pellets, y para pellets triples continua así hasta el ciclo 15° sin embargo, la remoción de pellets mixtos vuelve a caer en los siguientes ciclos.

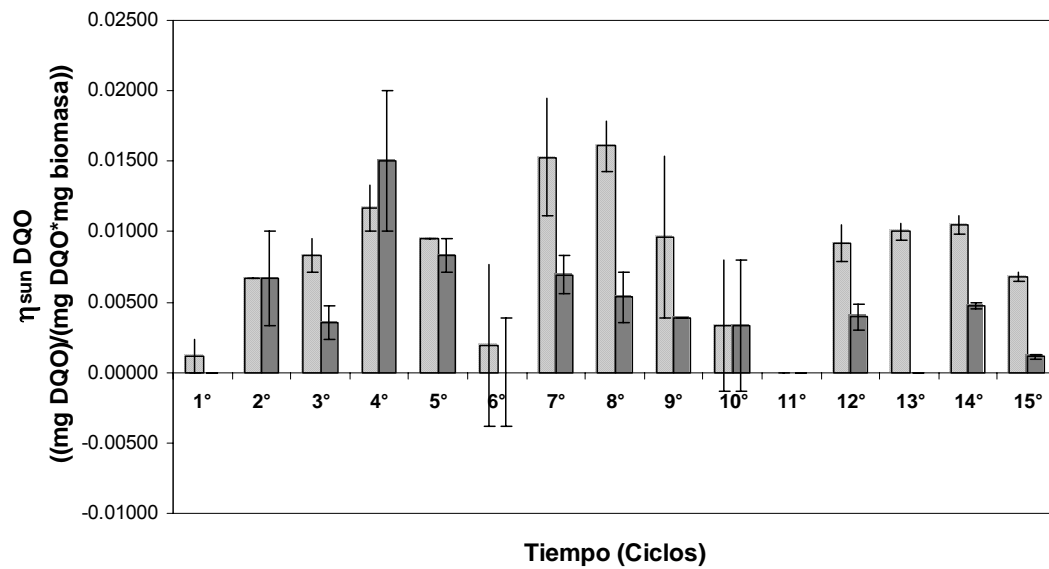
En la Figura 3c, se muestran los resultados de las eficiencias específicas unitarias netas (η_{sun}) para DQO realizado por *Trametes versicolor* inmovilizado en aserrín de encino/carbón activado (pellets triples) y aserrín de encino (pellets mixtos) a pH 4.5. Los picos de mayor η_{sun} para DQO se presentan en los ciclos 7°, 8° y 9°. Cabe mencionar que a diferencia de color y ligninoides, en el 10° ciclo la eficiencia sigue presente, registrándose la caída durante el 11° ciclo, habiendo una recuperación durante los siguientes ciclos para ambos tipos de pellets.



a)



b)



c)

□ Pellets Triples (15/15/30) ■ Pellets Mixtos(30/30)

Figura 3. a) η_{sun} de color, pellets triples y pellets mixtos a pH 4.5. b) η_{sun} de ligninoides, pellets triples y pellets mixtos a pH 4.5. c) η_{sun} de DQO, pellets triples y pellets mixtos a pH 4.5.

En la tabla 8 se muestran los resultados promedios de las remociones para los 15 ciclos, como se ve no hay una diferencia significativa entra ambos tipos de pellets.

Tabla 8. Resultados de promedios de eficiencias unitarias netas (η_{un}) y eficiencias específicas unitarias netas (η_{sun}) de color, ligninoides y DQO

Condición	η_{un} Color (%)	η_{un} Ligninoides (%)	η_{un} DQO (%)	η_{sun} color	η_{sun} ligninoides	η_{sun} DQO
Pellets Triples	29.05± 20.97	29.19± 15.44	33.44± 14.67	0.0078± 0.00471	0.0073± 0.00385	0.00836± 0.00367
Pellets Mixtos	26.98± 17.91	30.34± 14.39	18.73± 15.07	0.00723± 0.00387	0.00713± 0.00355	0.00531± 0.0031

En la tabla 9 se muestran los promedios de eficiencias en los ciclos donde hubo una mayor remoción para ambos tipos de pellets, de este modo se puede observar que los pellets triples tienen eficiencias de remoción de hasta un 50% mas que pellets mixtos, para el caso de DQO. Es por esto que para continuar con el experimento agregando inhibidor de proteasas, se eligieron los pellets triples.

Tabla 9. Resultados de promedios de eficiencias unitarias netas (η_{un}) y eficiencias específicas unitarias netas (η_{sun}) de color, ligninoides y DQO, en los ciclos 3-5, 7-9 y 13-15

Condición	η_{un} Color (%)	η_{un} Ligninoides (%)	η_{un} DQO (%)	η_{sun} color	η_{sun} ligninoides	η_{sun} DQO
Pellets Triples	20.22± 8.23	31.94±2.95	43.66± 13.37	0.00799± 0.00161	0.00726± 0.00073	0.01086± 0.00179
Pellets Mixtos	17.33± 9.18	13.69±7.35	18.84± 7.02	0.00663± 0.00105	0.00675± 0.0014	0.00543± 0.00121

Para confirmar que la remoción es estadísticamente más alta usando pellets triples que mixtos, se realizó Comparación de medias para η_{un} de DQO, Prueba t suponiendo varianzas desiguales, los resultados se pueden observar en la tabla 10, con lo que podemos ver que para los ciclos donde la remoción es alta, hay una diferencia estadísticamente significativa al utilizar pellets triples.

Tabla 10. Comparación de medias para η_{un} DQO para ciclos selectos.

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>		<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	48.188	23.044	Media	-1.528	-5.443
Varianza	316.225	504.980	Varianza	786.591	250.115
Observaciones	12	12	Observaciones	10	10
Diferencia hipotética de las medias	0		Diferencia hipotética de las medias	0	

Grados de libertad	21		Grados de libertad	14	
Estadístico t	3.039		Estadístico t	0.385	
P (T<=t) una cola (0.05)	0.003		P (T<=t) una cola (0.05)	0.353	
Valor crítico de t (una cola)	1.323		Valor crítico de t (una cola)	1.345	
P (T<=t) dos colas	0.006		P (T<=t) dos colas	0.706	
Valor crítico de t (dos colas)	1.721		Valor crítico de t (dos colas)	1.761	

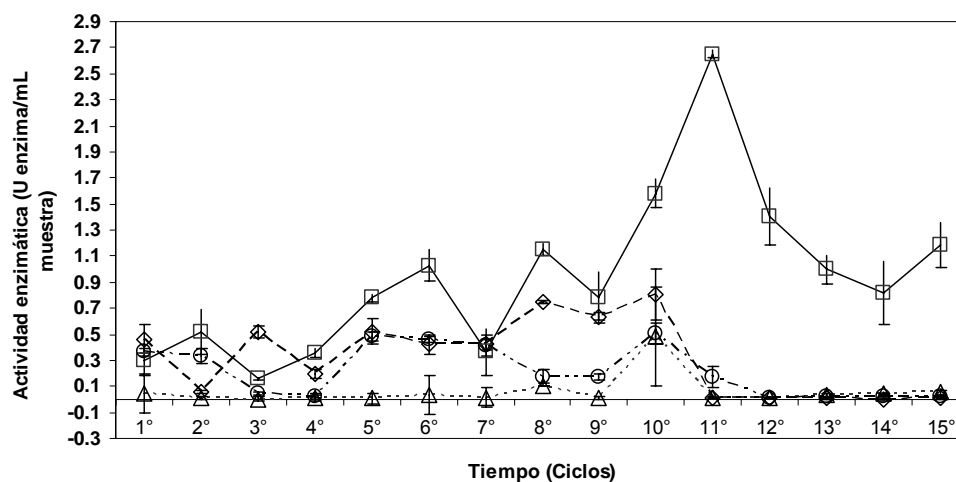
Comparación de medias para η un DQO para ciclos selectos donde la remoción es alta (3,4, 7, 8, 13,14)

Comparación de medias para η un DQO para ciclos selectos donde la remoción es baja (1,6, 10,11, 16)

7.3.4. Determinación de las actividades enzimáticas de: Manganoperoxidasa, Ligninoperoxidasa, Lacasa y Proteasas

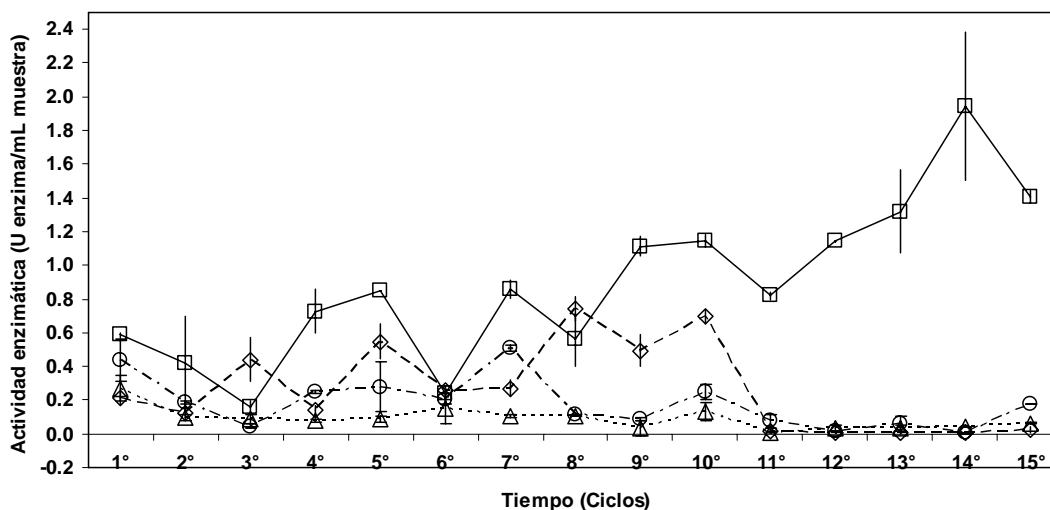
En la Figura 4a, se muestran los resultados de la actividad enzimáticas de Manganoperoxidasa (MnP), Ligninoperoxidasa (LiP), Lacasa (Lac) y Proteasas de *Trametes versicolor* inmovilizado en aserrín de encino/carbón activado (pellets triples) a pH 4.5.

Actividad enzimática en Pellets Triples (15/15/30)



a)

Actividad enzimática en Pellets Mixtos (30/30)



b)

—◇— MnP --△-- LiP —□— Proteasa —○— Lac

Figura 4. a) Actividades enzimáticas de MnP, LiP, Lac y Prot de *Trametes versicolor* inmovilizado sobre soporte de aserrín de encino/carbón activado (pellets triples) en ensayos a nivel matraz. b) Actividades enzimáticas de MnP, LiP, Lac y Prot de *Trametes versicolor* inmovilizado sobre soporte de aserrín de encino (pellets mixto) en ensayos a nivel matraz.

En la Figura 4b, se muestran los resultados de la actividad enzimáticas de Manganoperoxidasa (MnP), Ligninoperoxidasa (LiP), Lacasa (Lac) y Proteasas de *Trametes versicolor* inmovilizado en aserrín de encino (pellets mixtos) a pH 4.5.

Como se puede observar en la Figura 4 a y b, tanto pellets triples, mixtos como libres siguen el mismo patrón de comportamiento.

De manera general se observa presencia de las enzimas MnP, LiP, Lac, enzimas típicas de los basidiomicetos, así como presencia de Proteasas. MnP mostró actividad a lo largo de todo el ensayo. Los ciclos 1°, 3°, 5°, 8° y 10° son los ciclos donde MnP presenta picos de mayor actividad, mientras que a partir del 11° ciclo se presenta una caída en la actividad enzimática en ambos tipos de pellets.

Para LiP los picos de mayor actividad fueron los ciclos 2°, 7° y 9° y caída total en los siguientes ciclos, esto pudiera deberse a que durante el ciclo catalítico inicial en la degradación de la lignina se producen moléculas de H_2O_2 el cual es utilizado como co-sustrato por la enzima LiP. Lac presenta picos de mayor actividad en los ciclos 1°, 3° y

7°, con una caída completa en los siguientes ciclos, registrando comportamientos similares en los dos tipos de pellets (mixtos y triples).

En la Figura 4 a y b se puede observar que la actividad proteolítica se presenta a lo largo de todo el ensayo en ambos tipos de pellets (mixtos y triples) con picos de mayor actividad en los ciclos 5°, 6°, 8° y 10° para ensayos con pellets triples y 5°, 7°, 9° y 10° para pellets mixtos hasta el 10° ciclo, ya que los pellets triple presentan una mayor actividad en el 11° ciclo, mientras que para los pellets mixtos el ciclo de mayor actividad es el 14°.

Sin embargo se esperaba que cuando la actividad proteolítica fuera alta las actividades de las enzimas Ligninolíticas fueran bajas. Esto solo sucede con MnP y Proteasas en los primeros 4 ciclos del ensayo y en los últimos cinco con todas las enzimas, en ambos tipos de pellets, no así en los restantes ciclos (5° al 10°) del ensayo, donde se presenta una correlación de actividades enzimáticas entre MnP y Proteasas, hecho que no se esperaba. La presencia de proteasas en el medio posiblemente se deba a un sistema de regulación en su metabolismo de crecimiento (requerimiento de nutrientes), esto es que requiera de fuente de nitrógeno para la producción de biomasa y secrete proteasas que ataquen a las enzimas presentes (MnP, LiP, Lac entre otras) para obtener la fuente de nitrógeno, por esta razón se esperaba una anticorrelación de proteasas con las enzimas ligninolíticas.

En la Tabla 11, se presentan los resultados de promedios de las actividades enzimáticas de MnP, LiP, Lac y Proteasas en ensayos semi-continuos (matraz) durante los 15 ciclos que duró el ensayo con *Trametes versicolor* inmovilizado en aserrín de encino (Pellets mixto), aserrín de encino/carbón activado (Pellets triple) a pH 4.5. En esta tabla se puede observar que MnP presentó el promedio más alto de actividad en pellets triples (0.479 ± 0.162), aunque no presenta diferencia significativa con pellets mixtos. LiP es quien presenta en pellets mixtos el promedio más alto de actividad (0.024 ± 0.028). Sin embargo no se presenta diferencia significativa con pellets triples por el orden de error presentado, andan en el mismo orden en ambos tipos de pellets. La actividad presentada por Lac sigue el mismo patrón de comportamiento que las enzimas anteriores, no se observa diferencia significativa en ambos tipos de pellets. La actividad de Proteasas presentada durante los ensayos es la misma en los dos tipos de pellets, no se observó diferencia significativa.

Tabla 11. Resultados de promedios de actividades enzimáticas presentes en *Trametes versicolor* inmovilizado en aserrín de encino (pellets mixto) y aserrín de encino/carbón activado (pellets triple), a pH 4.5.

Condición	MnP U MnP/L	LiP U LiP/L	Lac U Lac/L	Prot U/mg Proteína
Pellets Triples	3.0±2.0	0.2±0.1	4.0±3.0	0.937±0.447
Pellets Mixtos	2.0±1.0	0.3±0.2	3.0±3.0	0.886±0.336

En la Tabla 12 se muestran las correlaciones múltiples de DQO como parámetro con actividades enzimáticas en pellets triples. En esta tabla podemos observar que existe una correlación aunque baja de Proteasas con las enzimas MnP, LiP, Lac. Correlación no esperada, lo que se esperaba era lo contrario una anticorrelación, esto es, que a valores altos de actividad proteolítica se presentaran valores bajos de actividad ligninolítica. De la misma manera se esperaba una correlación entre la presencia de enzimas ligninolíticas con las eficiencias de remoción (η_{un} , η_{sun}). Esta correlación se presento, aunque con valores muy bajos principalmente con MnP y LiP, no así con Lac donde si hay un valor de correlación mas alto.

Tabla 12. Tabla de correlaciones múltiples de DQO con actividades enzimáticas en pellets Triples.

Parámetro	η_{un} (DQO)	η_{sun} (DQO)	MnP	LiP	Lac	Proteasas
η_{un} (DQO)	1	1	0.199	0.206	0.819	0.631
η_{sun} (DQO)	1	1	0.107	0.393	0.568	0.416
MnP	0.199	0.107	1	0.140	0.173	0.195
LiP	0.206	0.393	0.140	1	0.039	0.160
Lac	0.819	0.568	0.173	0.039	1	0.754
Proteasas	0.631	0.416	0.195	0.160	0.754	1

7.4. Resultados del ensayo de 28 días agregando inhibidor de proteasas.

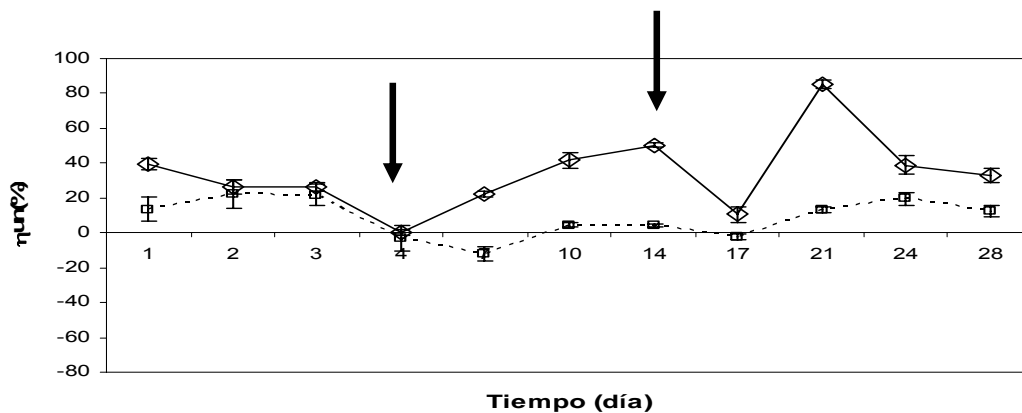
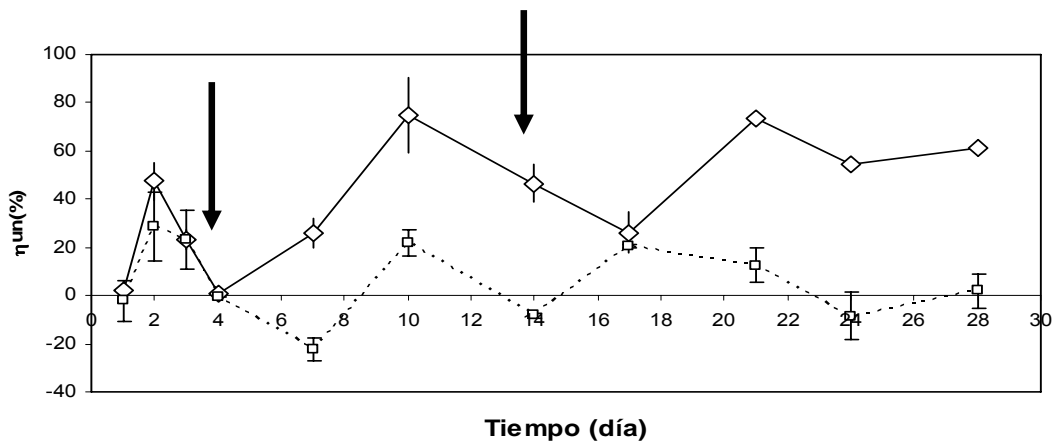
7.4.1. Determinación de las eficiencias unitarias netas (η_{un}) de color, ligninoides y DQO

Se utilizaron 6 matraces, 3 a los que se les adiciono el inhibidor de proteasas (fenilmetanosulfonilfluorida en una concentración de 10 mg/L) los días 4 y 14 (C/I), los

cuales son los días de mayor actividad proteolítica según el experimento anterior, y otros 3 a los que no se agrego inhibidor de proteasas (S/I), con sus respectivos controles.

En la figura 5a se muestra la eficiencia unitaria neta de remoción de color, notándose una mayor remoción en el ensayo al que se le agrego inhibidor, teniendo la mayor remoción en el día 10 y 21 del ensayo.

En la figura 5 b y c se puede ver la eficiencia unitaria neta para la remoción de ligninoides y DQO, respectivamente, observándose un comportamiento similar al de color, de nuevo se ve que el ensayo con inhibidor presento mas altas remociones que al que no se agrego inhibidor.



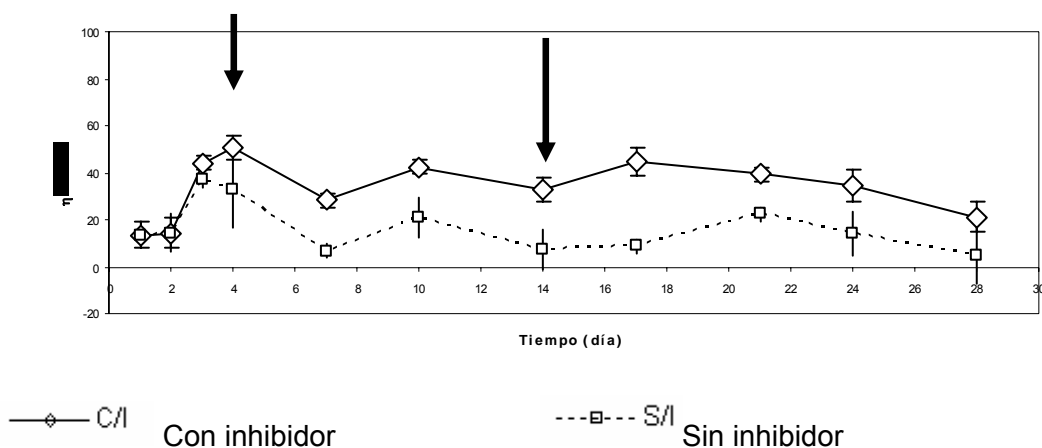


Figura 5. a) Eficiencia unitaria neta (η_{un}) en % de color para pellets triples con y sin inhibidor de proteasas. b) Eficiencia unitaria neta (η_{un}) en % de ligninoides para pellets triples con y sin inhibidor de proteasas. c) Eficiencia unitaria neta (η_{un}) en % de DQO para pellets triples con y sin inhibidor de proteasas. Las flechas indican los días en que se agrego el inhibidor de proteasas (fenilmetanosulfonilfluorida en una concentración de 10 mg/L).

7.4.2. Determinación de las Eficiencias específicas unitarias netas (η_{sun}), color, ligninoides y DQO.

En la figura 6a se puede observar la eficiencia específica unitaria neta para la remoción de color, la mayor eficiencia se dio durante el día 3, y aunque en general parece ser mayor para el ensayo con inhibidor, esta diferencia no parece ser muy significativa.

En la figura 6b se muestra la eficiencia específica unitaria neta para la remoción de ligninoides, se puede notar un aumento significativo en la remoción en el ensayo al que se agrego inhibidor a partir del día 4, teniendo la máxima eficiencia en el día 21.

En la figura 6c se muestra la eficiencia específica unitaria neta para la remoción de DQO, se puede ver un comportamiento similar al de η_{sun} para ligninoides, sin embargo, aquí la máxima eficiencia se obtuvo en el día 4.

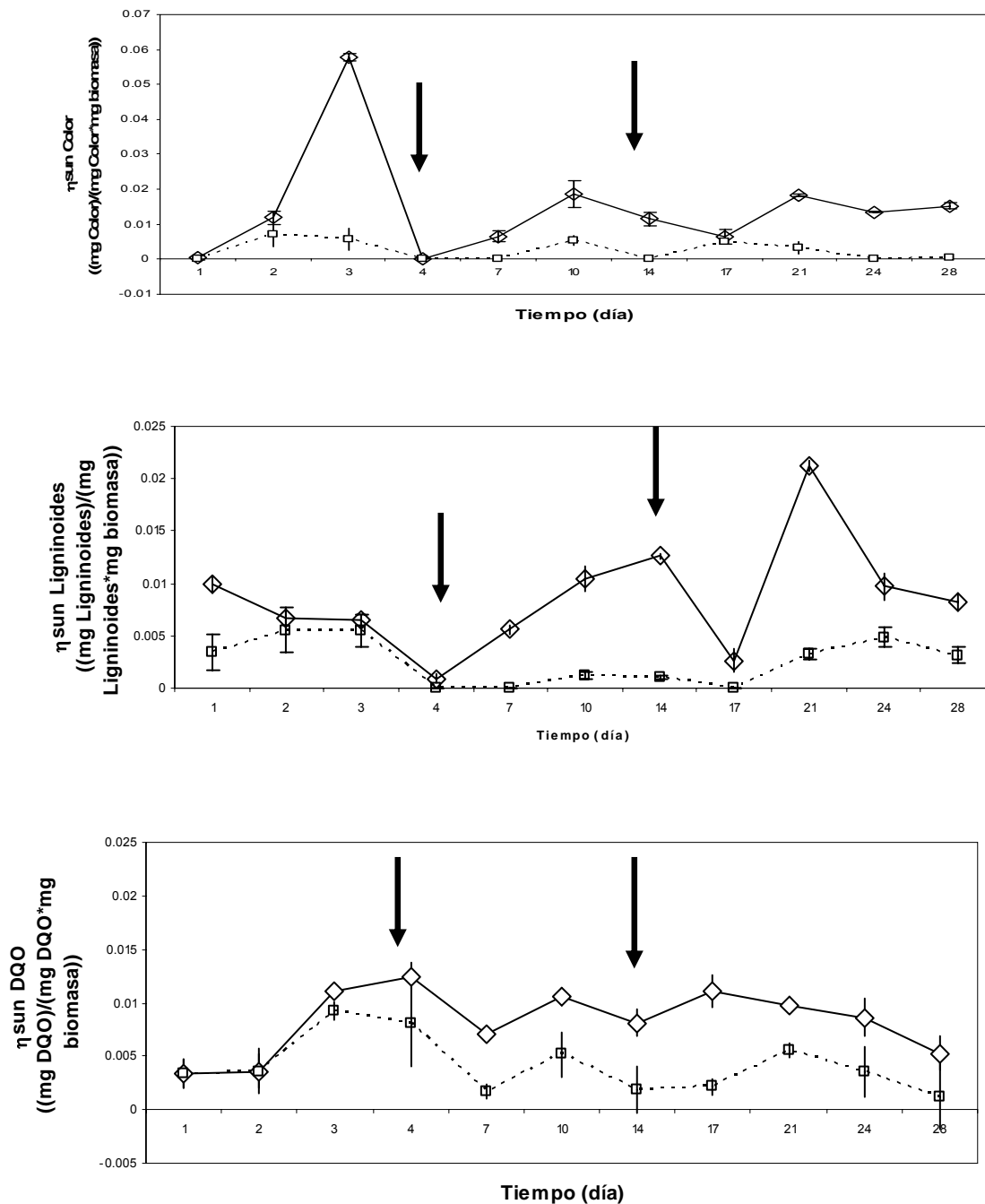


Figura 6. a) η_{sun} de color, pellets triples con y sin inhibidor de proteasas; b) η_{sun} de ligninoides, pellets triples con y sin inhibidor de proteasas; c) η_{sun} de DQO, pellets triples con y sin inhibidor de proteasas. Las flechas indican los días en que se agregó el inhibidor de proteasas (fenilmetanosulfonilfluorida en una concentración de 10 mg/L).

En la tabla 13 se muestran los resultados promedios de las eficiencias unitarias netas y específicas unitarias netas para color, ligninoides DQO. Las remociones se

muestran más altas para el ensayo con inhibidor, en comparación con las unidades a las que no se agregó el inhibidor.

Tabla 13. Resultados de promedios de eficiencias unitarias netas (η_{un}) y eficiencias específicas unitarias netas (η_{sun}) de color, ligninoides y DQO (28 días)

Condición	η_{un} Color (%)	η_{un} Ligninoides (%)	η_{un} DQO (%)	η_{sun} Color (%)	η_{sun} Ligninoides (%)	η_{sun} DQO (%)
C/I	39.61±18.36	34.04±15.68	33.19±8.89	0.0146±.0111	0.0086±0.0038	0.0083±0.0022
S/I	6.09±11.56	8.58±7.9	16.56±7.46	0.0025±.0021	0.0025±0.0015	0.0041±.0019

Se realizó un análisis de varianza para determinar si la adición del inhibidor de proteasas influye de manera significativa en la remoción de contaminantes usando pellets triples. Los resultados obtenidos muestran que, efectivamente la adición del inhibidor aumenta de manera significativa la remoción de contaminante; esto se puede observar en la tabla 14, donde se muestran los resultados del análisis de varianza.

Tabla 14. Resultados del análisis de varianza.

	η_{un} Color	η_{un} Ligninoides	η_{un} DQO	η_{sun} Color	η_{sun} Ligninoides	η_{sun} DQO
P(f)	<0.0001	0.0001	0.0009	0.0002	<0.0001	0.0014
significativo	✓	✓	✓	✓	✓	✓

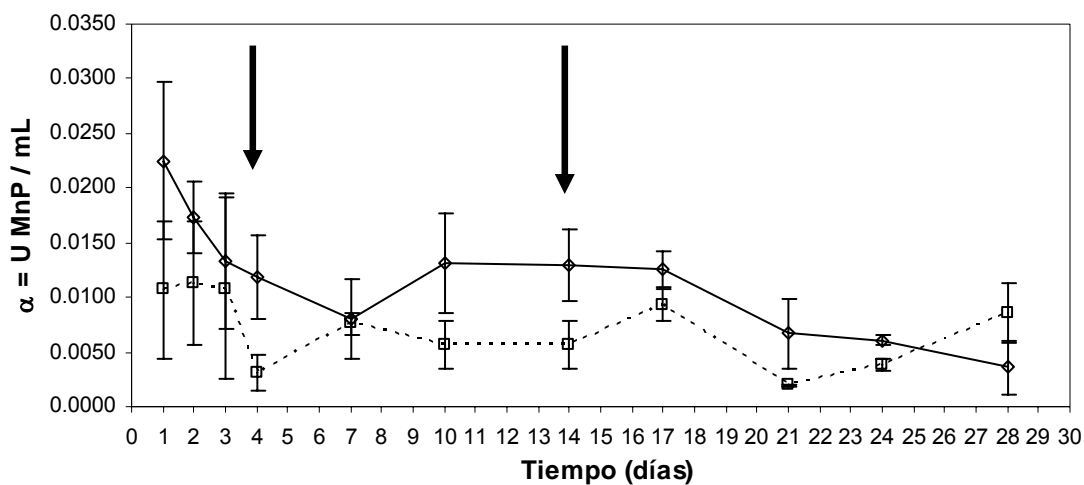
7.4.3. Determinación de las actividades enzimáticas de Manganoperoxidasa, Ligninoperoxidasa, Lacasa y Proteasas

En la figura 7a se puede ver el comportamiento de la actividad de MnP durante los 28 días que duró el ensayo, la actividad fue más alta para el ensayo con inhibidor de proteasas que para el ensayo sin inhibidor durante prácticamente todo el ensayo, disminuyendo la actividad del ensayo C/I a partir del día 25, mientras que sucedió lo contrario para el ensayo S/I.

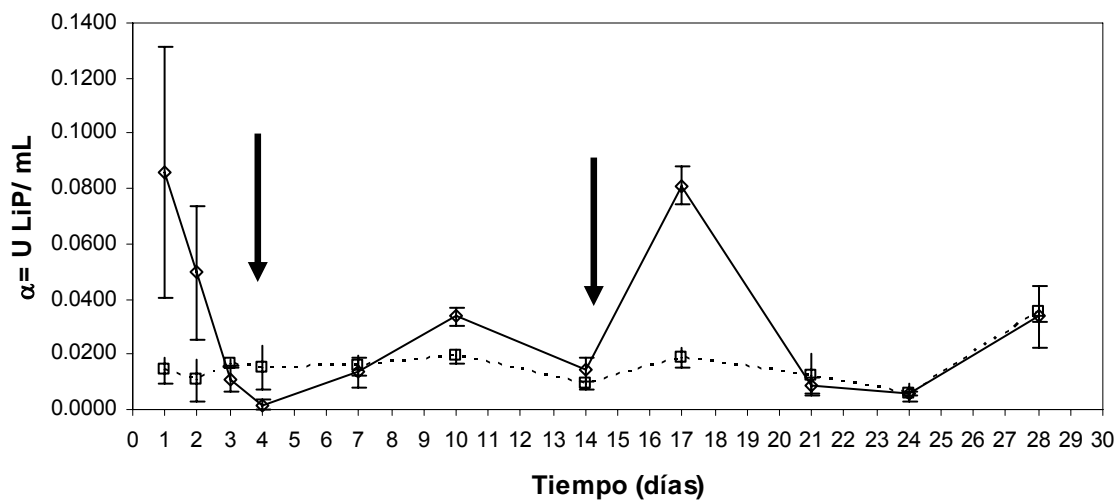
En la figura 7b se muestra el comportamiento de LiP durante el ensayo, en este caso, la actividad de ambos experimentos se mantuvo muy parecida, hasta el día 14, cuando se agregó por segunda vez el inhibidor, en el día 17 el experimento C/I tuvo un pico en actividad de LiP, volviendo a caer a partir de ahí para regresar al comportamiento del experimento S/I en el día 21.

En la figura 7c se observa el comportamiento de la actividad de lacasa durante el ensayo, en este caso no se ve gran diferencia entre la actividad de esta enzima en los dos experimentos, sin embargo, podemos notar que en el experimento C/I la actividad de Lac se mantuvo más constante durante todo el ensayo, mientras que para el experimento S/I hubo grandes fluctuaciones de la actividad.

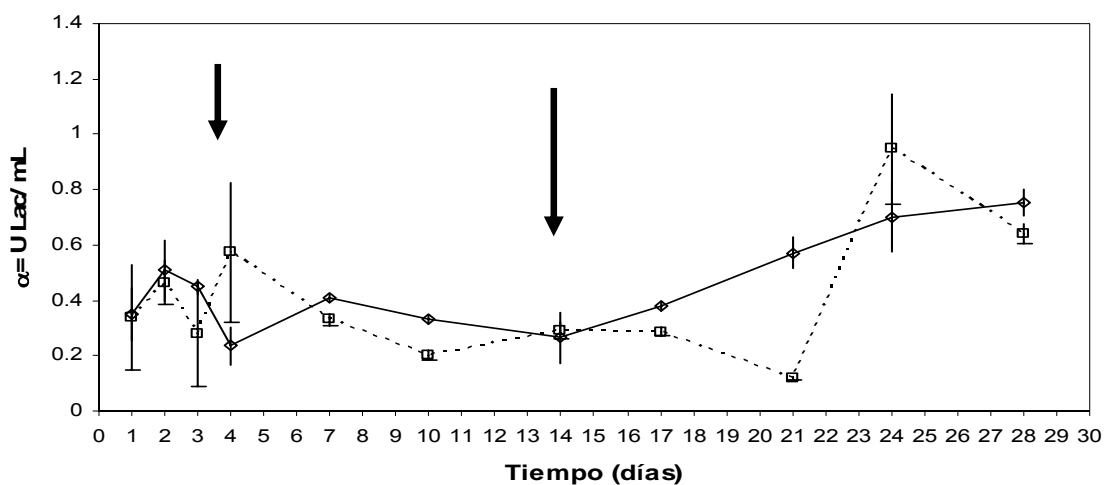
En la figura 7d se puede ver el comportamiento de la actividad proteolítica durante el ensayo, como era de esperarse, la actividad se mantuvo baja durante todo el ensayo en el caso de el experimento C/I, mientras que para el experimento S/I se presentaron picos de esta actividad en los días 7 y 14.



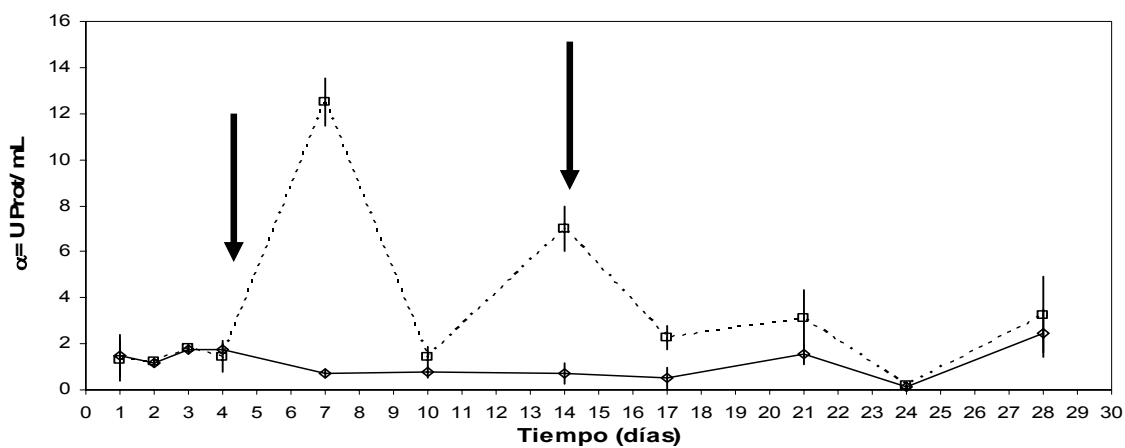
a)



b)



c)



d)

—◇— C/I Con inhibidor - - - □ - - - S/I Sin inhibidor

Figura 7. a) Actividad enzimática de manganoperoxidasa, pellets triples con y sin inhibidor de proteasas. b) Actividad enzimática de ligninoperoxidasa, pellets triples con y sin inhibidor de proteasas. c) Actividad enzimática de lacasa, pellets triples con y sin inhibidor de proteasas. d) Actividad enzimática de proteasas, pellets triples con y sin inhibidor de proteasas. Las flechas indican los días en que se agregó el inhibidor de proteasas (fenilmetanosulfonilfluorida en una concentración de 10 mg/L).

En la tabla 15 se presentan los resultados de promedios de las actividades enzimáticas de MnP, LiP, Lac y Proteasas, la actividad de MnP es mas grande para el experimento C/I con respecto al experimento S/I y es la que presenta mayor diferencia, además de las proteasas. LiP presenta también mayor actividad C/I que S/I, sin embargo la diferencia no es significativa debido al orden de error que se presenta. En cuanto a

actividad de Lac, no existe una diferencia significativa entre los dos experimentos. La actividad de proteasas se mantuvo mucho mas baja, gracias a la adición del inhibidor.

Tabla 15. Promedios de actividades enzimáticas presentes en *Trametes versicolor* inmovilizado en aserrín de encino/carbón activado (pellets triple), con y sin inhibidor de proteasas (28 días).

Condición	MnP = U MnP/L	LiP = U LiP/L	Lac = U Lac/L	Prot U/mg Proteína
C/I	1.2±0.4	3.0±2.0	5.0±1.0	1.181±0.48
S/I	0.7±0.2	2.0±0.5	4.0±2.0	3.231±2.515

En las tablas 16 y 17 se muestran las correlaciones múltiples de DQO como parámetro con actividades enzimáticas en los experimentos C/I y S/I, en estas tablas se puede observar que las correlaciones entre la eficiencia de remoción de DQO y las actividades enzimáticas en el experimento C/I tienen un valor mayor que para el experimento S/I.

Tabla 16. Correlaciones múltiples de Parámetro contaminante (DQO) y actividades enzimáticas en Pellets Triples (28 días). Unidades con inhibidor (C/I).

Parámetro	η_{un} (DQO)	η_{sun} (DQO)	MnP	LiP	Lac	Proteasas
η_{un} (DQO)	1	1	0.292	0.447	0.329	0.144
η_{sun} (DQO)	1	1	0.292	0.447	0.329	0.144
MnP	0.292	0.292	1	0.608	0.614	0.054
LiP	0.447	0.447	0.608	1	0.129	0.046
Lac	0.329	0.329	0.614	0.129	1	0.182
Proteasas	0.144	0.144	0.054	0.046	0.182	1

Tabla 17. Correlaciones múltiples de Parámetro contaminante (DQO) y actividades enzimáticas en Pellets Triples (28 días). Unidades sin inhibidor (S/I).

Parámetro	η_{un} (DQO)	η_{sun} (DQO)	MnP	LiP	Lac	Proteasas
η_{un} (DQO)	1	1	0.177	0.185	0.144	0.441
η_{sun} (DQO)	1	1	0.177	0.185	0.144	0.441
MnP	0.177	0.177	1	0.260	0.117	0.030
LiP	0.185	0.185	0.260	1	0.033	0.042
Lac	0.144	0.144	0.117	0.033	1	0.285
Proteasas	0.441	0.441	0.030	0.042	0.285	1

8. CONCLUSIONES

Acercas de los ensayos de inmovilización, podemos decir que la adición de 5g/L de peptona de soya al medio de formación de pellets parece mejorar y acelerar la formación de pellets tanto mixtos como triples.

Los mayores porcentajes de inmovilización de soporte y micelio en pellets mixtos y triples se presentan en los ensayos con el uso soporte fino.

Los porcentajes de inmovilización de micelio y soporte en pellets mixtos fueron menores que los correspondientes a pellets triples en el caso de soporte grueso.

El porcentaje de inmovilización de soporte en pellets mixtos es significativamente menor que los correspondientes a pellets triples en soporte fino. No hubo diferencia importante entre los porcentajes de inmovilización de micelio y soporte de los dos tipos de pellets triples, tanto para soporte grueso como fino.

A partir de los dos ensayos de inmovilización, se ha podido establecer un protocolo de formación de biocatalizadores, el cual no existía hasta ahora.

Respecto a remoción de contaminantes las eficiencias de pellets triples son de 50-60% mayores que pellets mixtos, por lo que se valida la Hipótesis general.

Gracias a este experimento se pudo demostrar que es posible la remoción de contaminantes durante periodos largos de tiempo sin la adición de fuente de carbono como glucosa.

En cuanto al ensayo de lote prolongado agregando inhibidor de proteasas, podemos concluir que la adición del inhibidor de proteasas aumentó de manera significativa las eficiencias de remoción de color, ligninoides y DQO durante el ensayo de 28 días.

Al agregar el Inhibidor de proteasas, las actividades enzimáticas de MnP, LiP y Lac se mantuvieron más altas que sin inhibidor, la actividad de proteasas se mantuvo baja y constante durante todo el ensayo.

La enzima que presento mayor diferencia de actividad con y sin inhibidor de proteasas fue MnP, además de las propias proteasas.

Existe una asociación de las enzimas MnP, LiP y Lac con la remoción de contaminantes, especialmente con MnP, por lo que se valida la Hipótesis específica.

El promedio general de las eficiencias en el ensayo en lote prolongado son 50 a 60 % consistentemente mayores en pellets triples con inhibidor que sin inhibidor de proteasas

La inhibición de las proteasas permite alcanzar niveles de remoción mucho más altos, sin embargo, agregar un inhibidor de proteasas a nivel industrial sería incosteable, por lo que se deben buscar medios más baratos para inhibir a las proteasas.

9. RECOMENDACIONES PARA TRABAJOS FUTUROS.

En el laboratorio de biotecnología ambiental ya se están implementando trabajos de investigación con reactores de lecho fluidizado utilizando pellets tripes de *Trametes versicolor* para el tratamiento del EAn.

Las determinaciones de actividades enzimáticas deben ser realizadas lo mas pronto posible después de tomar la muestra, ya que esto disminuye el error.

10. REFERENCIAS.

- Alleman, B.C.; B.E.Logan y R.L. Gilbertson.(1992). Toxicity of pentachlorophenol to six species of white rot fungi as a function of chemical dose. *Appl. Environ: Microbiol.* **58**:12:4048-4050
- Asit Datta. (1992). Purification and characterization of a Novel Protease from Solid Substrate Cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *The Journal of Biological Chemistry.* **267**: 2: 728-736.
- Boyle C.D.; Kropp B.R.; Reid I.D. (1992). Solubilization and mineralization of lignin by white rot fungi. *Appl. Environ Microbiol.* **58**: 3217- 3224.
- Buchtman C.; Kies U.; Deckwer W. D.; Hecht V. (1997) Performance of Three Phase Fluidized Bed Reactor for Quinoline Degradation on Various Supports at Steady State and Dynamic Conditions. *Biotechnology and Bioengineering* **56**:3:296-303.
- Bumpus, J.A.; Kakar, S.N. y Coleman, R.D. (1993). Fungal Degradation of organophosphorus insecticides. *Appl. Biochem. And Biotechnol.* **39/40**:715-725.
- Bonname Pascal; Delattre Michel; Corrieu Georges and Asther Marcel. (1991) Peroxidase secretion by Pellets or Immobilized Cells of *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 and INA 12 Relation to Organelle Content. *Enzyme Microbiology Technology* **13**:727-733.
- Cámara Nacional de las Industrias de la Celulosa y del Papel, 2003.
- Cornwell, K.L.; Tinland-Butez, M.F.; Tardone, P.J; Cabasso I.; and Hammel K.E. (1990). Lignin degradation and lignin peroxidase production in cultures of *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on porous ceramic supports. *Enzyme Microb. Technol.*, **12**: 916- 920.

- Eriksson, K.E., and Pettersson, B. (1982). Purification and partial characterization of two acidic proteases from the white –rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. Eur. J. Biochem. **124**: 635-642.
- Eriksson, K.E., and Pettersson, B. (1988). Acid Proteases from *Sporotrichum pulverulentum*. Methods Enzymol. **160**: 500-508.
- Esposito, E.; Vanderlei, P; y Duran, N. (1991). Screening of lignin- degrading fungi for removal of color from Kraft mill wastewater with no additional extra carbon-source. Biotechnol. Lett. **13**(8), 571-576
- Estrada Vázquez, Carlos. (1997).Postratamiento de efluentes industriales pretratados anaeróbicamente. Tesis de maestría, Depto. Biotecnología, Bioingeniería, CINVESTAV.
- Estrada Vázquez C.; Poggi Varaldo H.M.; Fernández Villagómez G.; Magaña Plaza I.; (1999) Biological treatment of a Black Liquor Spills Wastewater from a Kraft Pulp Mill Using an Anaerobic Fluidized Bed Reactor. *6th IAWQ International Symposium of Forest Industry Wastewater*.Tampere Finland.
- Hofrichter M. (2002). Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP).Enzyme and Microbial Technology. **30**: 454 – 466.
- Kasikara N.; Ozturk R.; Ergun F. (2004). Biodecolourization of Direct Blue 15 by immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. Process Biochemistry. **34**: 302-308
- Kerem Z.; Hadar Y. (1995). Effect of manganese on preferential degradation of lignin by *Pleurotus ostreatus* during solid-state fermentation. Appl Environ Microbiol. **61**: 3057-3062.
- Kuwahara, M., y Kimura, y ; Asada (1990). Screening of basidiomicetes for lignin preoxidase genes using a DNA probe. Appl. Microbiol. Biotechnol. **32**: 436-442.
- Kyu-Jin Yum; Jeffrey Pierce J. (1998) Continuos-Flow Wood Chip Reactor for Biodegradation of 2,4-DCP. *Journal of environmental Engineering*.184-189.
- Leatham Gary F.; Stahmann Mark A. (1981) Studies on the Laccase of *Lentinus edodes*: Specificity, localization and Association with the Dewvelopment of Fruiting Bodies. *Journal of General Microbiology* **125**: 147-157.
- Livernoche D., L. Jurasek, M. Desrochers, J. Dorica. (1983). Removal of Color from Kraft Mill Wastewaters with Cultures of White-Rot Fungi and with Immobilized Mycelium of *Coriolus Versicolor*. Biotechnology and Bioengineering. **XXV**:2055-2065.

- Paszczynski A.; Van-Ba H. and Crawford R. (1996). Comparison of Ligninase – 1 and Peroxidase – M2 from the White-Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **244**:2:750-765.
- Poggi-Varaldo, Héctor (1994). Prevención de la contaminación del agua y tratamiento de aguas en la industria de la celulosa y el papel. Parte 1. Prevención de la contaminación. **4**(2): 12-18.
- Poggi-Varaldo, Héctor (1994). Prevención de la contaminación del agua y tratamiento de aguas en la industria de la celulosa y el papel. Parte 2. Prevención de la contaminación. **5**(2): 16-22.
- Ramírez Canseco, Sergio A. (2000). Desarrollo de un reactor de lecho fluidizado, con hongos ligninolíticos inmovilizados para el tratamiento de efluentes industriales. Tesis de maestría, Depto. Biotecnología, Bioingeniería, CINVESTAV.
- Ramírez Canseco S.A.; Poggi Varaldo H.M.; Magaña Plaza I.; García Mena J.; Estrada Vázquez C. (1998) Fungal Post-treatment of Anaerobically Treated Black liquor Spill Wastewater from Kraft Pulp Mill.
- Rodríguez Cuot S.; Sanromán M.A.; Hofer D.; Gübitz G.M. (2004). Stainless steel sponge: a novel carrier for the immobilisation of the white-rot fungus *Trametes hirsute* for decolourization of textile dyes. *Bioresource Technology*. **95**: 67-72.
- Staszczak M. (2002). Proteasomal degradation pathways in *Trametes versicolor* and *Phlebia radiata*. *Enzyme and Microbial Technology*. **30**: 537- 541.
- Waldnes R. (1998). Lignin degradation and lignin peroxidase production in cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme and Microbial Technology*. **87**: 36-39.
- Zhang H. and Yu L. (2000) decoloration of 7- violet whit fungus on GAC. *Bioresource Technology*. **87**: 56-78.

ANEXO A

Técnicas analíticas

1) Técnica para determinar la DQO.

1.1 Introducción.

Este método determina la cantidad necesaria de oxígeno necesario para oxidar materia orgánica presente contenida en una muestra de agua bajo condiciones específicas de un agente oxidante en condiciones ácidas, transformándolas en bióxido de carbono y agua, sin importar si es o no asimilable biológicamente.

Este método consiste en someter una muestra a reflujo con H_2SO_4 concentrado y $K_2Cr_2O_7$ valorado; durante el periodo de reflujo la materia oxidable reduce una cantidad equivalente de dicromato al oxígeno consumido. El remanente es valorado con una solución de $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ de concentración conocida.

1.2 Preparación de reactivos.

1.2.1 Preparación de la solución oxidante 0.25 N.

- 1) Se secan aproximadamente 15 g de $K_2Cr_2O_7$ en la estufa a $105\text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 horas, después se deja enfriar en un desecador.
- 2) Se pesa exactamente en la balanza analítica 12.259 g.
- 3) En 500 ml de agua destilada se disuelve el $K_2Cr_2O_7$ pesado y se afora a un volumen de 1L con agua destilada.

NOTA: Agregar 33.3 ml de H_2SO_4 concentrado para aguas que presenten cloro en el siguiente intervalo de concentraciones 200 – 500 mg/l .

1.2.2 Solución catalizadora.

- 1) A un litro de H_2SO_4 concentrado agregar 11 g de Ag_2SO_4 y dejar reposar 1 ó 2 días hasta que se disuelva. Por razones de costo puede prescindirse de Ag_2SO_4 .

1.2.3 Preparación de Sulfato Ferroso Amoniacal (SFA) 0.05 N.

- 1) Pesar 19.6 g de $SFA:6H_2O$, y disolver en 500 ml de agua destilada, Agregar lentamente 20 ml de H_2SO_4 concentrado, enfriar y aforar a un litro con agua destilada.
- 2) El SFA se valora colocando en un matraz Erlen Meyer de 250 ml 2.5 ml de agua destilada, 1.5 ml de $K_2Cr_2O_7$ y 3 ml de H_2SO_4 concentrado, 1 gota de fenantrolina y agregar FSA hasta observar cambio de color.
- 3) Aplicando la siguiente fórmula se determina la normalidad del SFA.

$$NSFA = \frac{(NK_2Cr_2O_7)(1.5)}{SFA}$$

1.2.4 indicador 1-10-fenantrolina monohidratada.

- 1) Se pesa 1.485 g de 1-10-fenantrolina monohidratada.
- 2) Se pesan 0.695 g de sulfato ferroso heptahidratado.

- 3) Se disuelven las sustancias pesadas anteriormente en agua destilada en un matraz aforado de 100.

1.3 Procedimiento.

Si no se conoce el rango de la DQO de la muestra se debe de recorrer un tren de diluciones la muestra para ubicar el valor de DQO o bien basarse en datos bibliográficos. En la TABLA AI1 se muestra como elegir las diluciones a las que se deben llevar las muestras.

- 1) Marcar el nivel al que llega un volumen de 7.5 ml en los tubos especiales para determinar DQO micro.
- 2) Poner en cada tubo 2.5 ml de muestra y 1.5 ml de solución oxidante ($K_2Cr_2O_7$) y 3.5 ml de solución catalizadora (H_2SO_4 concentrado).
- 3) Preparar un blanco igual que en el punto 2 substituyendo los 2.5 ml de muestra por agua destilada.
- 4) Agregar 3 perlas de ebullición a cada tubo para regular la ebullición
- 5) Agitar la mezcla antes de calentar para prevenir proyecciones por el calentamiento local del fondo del tubo, y colocar el condensador en la boca del tubo.
- 6) Poner a reflujo entre 200 y 250 °C durante 2 horas.
- 7) Dejar enfriar, si se evapora un volumen considerable de líquido reponerlo con agua destilada hasta la marca de 7.5 ml.
- 8) Transferir el contenido del tubo para DQO a un matraz Erlen Meyer de 250 ml, agregar una gota de indicador fenantrolina y titular usando la solución de SFA. El vire del indicador en el punto final es de azul verdoso a café rojizo.
- 9) Para Determinar la DQO se aplica la siguiente fórmula:

$$mgDQO/l = \frac{8000(A - B)NFD}{V}$$

Donde:

A	ml de SFA gastados en el blanco.
B	ml de SFA gastados en la muestra.
N	Normalidad del SFA.
FD	Factor de dilución.
V	Volumen de la muestra.

2) Técnica para determinar la actividad enzimática de Ligninoperoxidasa.

2.1. Introducción.

La ligninoperoxidasa cataliza la oxidación del alcohol veratrílico por el H_2O_2 a veratraldehído. El alcohol no presenta absorbancia a 310 nm, mientras que el aldehído presenta una gran absorbancia a esta longitud de onda.

La propiedad anteriormente mencionada se emplea para el desarrollo de un método espectrofotométrico de cuantificación.

2.2. Materiales y equipo.

- Espectrofotómetro ultravioleta – visible
- Celda de cuarzo.
- Centrifuga
- Incubadora
- Termómetro
- Micropipeta (100 μ l)
- Tubos de ensaye
- Pipetas (1, 5, y 10 ml)
- Matraz Erlen Meyer (125 ml)
- Vasos de precipitados (250 ml)
- Matraces aforados (10 y 25 ml y 1 l)
- Reactivos:

A) Alcohol veratrílico 0.001 μ M

B) d-ácido tartárico 0.25 M pH 2.5

C) H₂O₂ 5 mM (preparar en el momento)

D) Extracto-muestra de cultivos fúngicos que contienen LiP cuya actividad se quiere determinar; la actividad debe ser aproximadamente 0.2 U/mL.

2.3 Procedimiento para celda de 1ml.

- 1) Mezcla de reacción: 200 μ l de A mas 200 μ l de B mas 100 μ l de C mas 500 μ l de D . Completar con agua destilada a 1 mL si el volumen de la mezcla es menor a 500 μ l.
- 2) Blanco: 200 μ l de A más 200 μ l de B mas 100 μ l de C mas 500 μ l de agua destilada. Se incuba a las mismas condiciones.
- 3) Leer el aumento de absorbancia $\lambda=310$ nm a 30 °C durante 1 minuto.

2.4 Cálculos:

- 1) Tabular y graficar Absorbancia (A) vs tiempo; tiempo en min.
- 2) Calcular o determinar dA/dt por regresión en Excel, tomando en cuenta los puntos alineados
- 3) Determinar la actividad del extracto α

$$\alpha = [1/(\epsilon L) * (dA/dt) * ((1\text{ml de celda}) / (\text{Volumen de muestra}))] / [(\mu\text{mol AV/min}) / U]$$

$$[\alpha] = U \text{ LiP/mL extracto-muestra}$$

Donde:

ϵ	Coeficiente de extinción para esta enzima es de 9.300 ml/ μ mol.cm
A	Absorbancia leída a 310 nm
t	Tiempo (min.)
L	Espesor de la celda (cm)
VT	Alcohol Veratrílico
U	Unidades de LiP

NOTA:

- 1U LiP se define como 1 μ mol VT/ min.
- Se debe realizar el experimento a temperatura constante
- Destilar al vacío el alcohol veratrílico para liberarlo de contaminantes fenólicos que pueden ser más reactivos que el propio alcohol veratrílico ó extraerlo con éter y álcali ó diclorometano y álcali.
- Aunque la ligninasa es mas activa a pH debajo de 3, esta no es muy estable; Estas velocidades de reacción son lineales solo por cerca de 2 minutos. La

ligninasa es también inactiva por H_2O_2 en ausencia de un sustrato reducido, tal como el alcohol veratrílico, Consecuentemente, se debería ser cuidadoso para minimizar la preincubación de ligninasa con buffer de bajo pH (pH <3.0) o con H_2O_2 en la ausencia de alcohol Veratrílico. Para la reproducción de resultados, la temperatura debería ser constantemente ayudada por que la ligninasa muestra una alta dependencia de la temperatura; La velocidad es aproximadamente al doble por cada 7 ° de incremento.

- La actividad de esta enzima se midió mediante la oxidación del alcohol veratrílico a veratraldehído en presencia de H_2O_2 (Tien y Kirk, 1988).

3) Técnica para determinar la actividad de Manganesoperoxidasa.

3.1. Introducción.

Los dos tipos de preoxidadas extracelulares han sido descubiertas creciendo en medios de cultivos ligninolíticos del hongo *Phanerochaetes chrysosporium*. Un tipo ha sido determinado “ligninasa” o “diarilpropano oxigenasa” y a pesar de oxidar lignina y muchos compuestos modelos de lignina por extraer un electrón de un núcleo aromático, creando una especie de un catión radical inestable con numerosos experimentos, destacando la transformación a la descomposición del sustrato. Un segundo tipo de peroxidasa excretada por *Phanerochaetes chrysosporium* ha sido llamada manganeso peroxidasa, como tal oxida Mn(II) a Mn(III). Esta enzima también muestra actividad oxidasa, produciendo peróxido de hidrógeno por oxidación del sustrato al estado reducido como NAD(P)H, glutatona (GSH), ditiotreitól(DTE), y ácido dihidroximaleico, Ambos Mn(III) y peróxido de hidrógeno producidos por la enzima pueden estar involucrados en la biodegradación de lignina.

La manganeso peroxidasa es una enzima extracelular que se expresa durante el metabolismo secundario como parte de un sistema degradativo de lignina de los hongos.

La propiedad anteriormente mencionada se emplea para el desarrollo de un método espectrofotométrico de cuantificación.

3.2. Materiales

- Espectrofotómetro ultravioleta – visible
- Celda de cuarzo
- Centrífuga
- Incubadora
- Termómetro
- Micropipeta (100 μ l)
- Tubos de ensaye
- Pipetas (1, 5, y 10 ml)
- Matraz Erlen Meyer (125 ml)
- Vasos de precipitados (250 ml)
- Matraces aforados (10 y 25 ml y 1 L)
- Reactivos:
 - A) Rojo de fenol 0.01%, (20 μ mol/min)
 - B) Lactato de Na 25 mM.
 - C) $MnSO_4$ 100 μ M.
 - D) Albúmina de huevo 0.1 %
 - E) H_2O_2 100 μ M
 - F) Amortiguador de succinato de Na 20 mM a pH 4.5 .
 - G) Solución de enzima conteniendo 0.2 U ml^{-1} .
 - H) NaOH 2N.

3.3. Procedimiento para celda de 1ml.

- 1) Mezcla de reacción (2 mL) :100µl de A mas 100µl de B mas 100µl de C mas 100µl de D mas 100µl de E mas 500 µl muestra G. Todos los componentes son disueltos en 1000 µl de F.
- 2) La reacción se lleva acabo a 30 °C durante 5 min. se detiene con la adición de 40 µl de H.
- 3) Blanco (2 mL): 100µl de A mas 100µl de B mas 100µl de C mas 100µl de D mas 100µl de E mas 500 µl de agua destilada. Todos los componentes son disueltos en 1000 µl de F; se incuba a las mismas condiciones.
- 4) Leer decremento de absorbancia $\lambda= 610\text{nm}$.

3.4. Cálculos:

- 1) Tabular y graficar Absorbancia (A) vs. tiempo; tiempo en min.
- 2) Calcular o determinar dA/dt , por método gráfico ó por regresión-Excel de los datos alineados.
- 3) Determinar la actividad del extracto, α .

$$\alpha = [1/(\epsilon L) * (dA/dt) * ((1\text{ml de celda}) / (\text{Volumen de muestra}))] / [(1 \mu\text{mol RF/min}) / 1\text{U}]$$

$$[\alpha] = U \text{ MnP} / \text{mL extracto-muestra}$$

Donde:

- ϵ Coeficiente de extinción para esta enzima es de 22.4215 ml/ $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}$.
- A Absorbancia leída a 610 nm para RF.
- t Tiempo (min.)
- L Espesor de la celda (cm)
- RF Rojo de fenol.
- U Unidades de MnP.

NOTAS:

- 1 U de MnP se define como 1 μmol RF / min.
- La actividad de MnP se determinó con la metodología descrita por Kuwahara *et al.* (1984); Gold *et al.* (1988); Pasczynki *et al.* (1986).
- Esta técnica esta basada en la utilización del rojo de fenol como sustrato de la enzima, requiriendo H_2O_2 para desencadenar la reacción.

4) Técnica para determinar la actividad de Lacasa.

4.1. Introducción.

Las lacasa están involucradas en la biodegradación de ligninas, las cuales son el principal componente de los compuestos que no son carbohidratos de la madera. Un gran número de hongos de la pudrición blanca se ha reportado que producen enzimas capaces de degradar la lignina como son: lacasa, lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa, o algunas de estas enzimas.

La lacasa puede ser empleada para el tratamiento de efluentes de la industria del papel u otras industrias que generen efluentes que contengan cloroligninas o compuestos fenólicos. Las enzimas anteriormente mencionadas transforman los compuestos fenólicos a otros menos tóxicos por medio de degradación o reacciones de polimerización. Algunos procesos que se emplean para el tratamiento de compuestos que están contaminados con compuestos fenólicos e hidrocarburos policíclicos aromáticos usan lacasa inmovilizada.

La enzima lacasa (1.10.3.2.) o p-difenol oxidoreductasa es obtenida principalmente de hongos y cataliza la oxidación de varios compuestos aromáticos (difenoles, aminofenoles, y diaminas) por reducción del oxígeno molecular a agua a través de un complejo de proteína cobre.

Algunas de las reacciones catalizadas por esta enzima no son específicas: El ABTS (ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) es un reactivo que se puede emplear para la cuantificación de lacasa por que participa en una reacción específica y además presenta un amplio rango de respuesta.

4.2. Materiales

- Espectrofotómetro ultravioleta – visible
- Celda de cuarzo
- Centrifuga
- Incubadora
- Termómetro
- Micropipeta (100 μ l)
- Tubos de ensaye
- Pipetas (1, 5, y 10 ml)
- Matraz Erlen Meyer (125 ml)
- Vasos de precipitados (250 ml)
- Matraces aforados (10 y 25 ml y 1 l)
- Reactivos:
 - A) Buffer de Citrato-Fosfato 100 mM, pH 3.0.
 - B) Sustrato: ABTS (ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), 1 mM
 - C) Solución de enzima 0.05-0.5 ml diluya en caso necesario.
 - D) Agua desionizada.

4.3. Procedimiento para celda de 1ml.

- 1) Mezcla de reacción: 0.15 ml de A mas 0.05 ml de B mas 0.5 ml de muestra C. Completar con agua desionizada a 1 mL si el volumen de la mezcla es menor a 500 μ l.
- 2) Esta reacción se lleva a cabo a 50 ° C durante un tiempo de 5 min.
- 3) Blanco: 0.15 ml de A mas 0.05 ml de B mas 0.8 ml de agua desionizada. Se incuba a las mismas condiciones.
- 4) Leer el aumento de absorbancia $\lambda=420\text{nm}$

4.4. Cálculos:

- 1) Tabular y graficar Absorbancia (A) vs. tiempo; tiempo en min.
- 2) Calcular o determinar dA/dt , por método gráfico ó por regresión-Excel de los datos alineados.
- 3) Determinar la actividad del extracto, α .

$$\alpha = [1/(\epsilon L) * (dA/dt) * ((1\text{ml de celda}) / (\text{Volumen de muestra}))] / [(1 \mu\text{mol AB/min}) / 1\text{U}]$$

$$[\alpha] = \text{U Lac/mL extracto-muestra}$$

Donde:

ϵ Coeficiente de extinción para esta enzima es de 27700 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (27.7 ml/ μ mol.cm).

A Absorbancia leída a 420nm

t Tiempo (min.)

L Espesor de la celda (cm)

AB ABTS

U Unidades de Lac.

NOTAS:

- 1 U de actividad de Lacasa se definen como la cantidad de enzima requerida para oxidar $1 \mu\text{mol ABTS min.}^{-1} \text{ mL}^{-1}$ de solución de enzima.
- La actividad de Lacasa se determinó con la metodología descrita por Wolfenden y Wilson (1982).

5) Técnica para determinar lignina.

5.1 Introducción.

Este método se basa en la hidrólisis y solubilización de los carbohidratos y otros compuestos en un medio ácido y a una temperatura de ebullición, en donde el residuo insoluble es la lignina.

5.2 Material y equipo.

- Dispositivo Soxhlet.
- Estufa.
- Parrilla.
- Mufia.
- Controlador de temperatura (Haake).
- Tubos de ensaye.
- Filtro Gooch.
- Crisol.
- Matraces Erlen Meyer de 250 ml.
- Autoclave.
- Termómetro.
- Balanza analítica.
- Desecador.
- Acido sulfúrico al 72% (Peso/Peso).
- Mezcla Etanol Tolueno 1:2.

5.3 Procedimiento.

- 1) Extraer la grasa de la muestra por medio de un reflujo Soxhlet, con una mezcla Etanol-Tolueno 1:2 durante 5 horas.
- 2) Una vez que la muestra este desengrasada y seca se pesan 200 mg y se colocan en un tubo de ensaye.
- 3) Se adicionan 2 ml de ácido sulfúrico 72 % peso/peso.
- 4) Colocar el tubo en baño maría durante 1 hora a 30°C con agitación.
- 5) Transferir el contenido del tubo a un matraz Erlen Meyer y adicionar 56 ml de agua destilada.
- 6) Colocar el matraz en la autoclave a $15 \text{ lb}/120^{\circ}\text{C}$ por una hora.
- 7) Llevar un filtro Gooch a peso constante y pesarlo (Pv)
- 8) Filtrar la solución y lavar con agua destilada hasta eliminar todo el ácido.
- 9) Secar el filtro en la estufa a 70°C por 12 horas.
- 10) Pesar el filtro (Pt)
- 11) Pesar el crisol (Pc)
- 12) Obtener el material del filtro y colocarlo en un crisol.
- 13) Calcinar a 550°C por 5 horas.
- 14) Pesar el crisol. (Pf)

15) Aplicando la siguiente formula determinar el porcentaje de lignina.

5.4 Cálculos:

$$\% \text{lg} = \frac{((P_t - P_v) - (P_f - P_c))100}{w}$$

Donde:

W Peso de la muestra

6) Técnica de inmovilización de *Trametes versicolor* sobre las cubos de madera.

6.1 Introducción.

Esta técnica se realiza para inmovilizar hongos sobre un soporte que puede servir como sustrato, dado que los hongos crecen de dos forma diferentes, por medio de esporas y por medio de micelio, siendo la primera una forma de dispersión del hongo, además de ser más resistente a las condiciones adversas, es lo que motiva a usar las esporas como forma de inoculación para la inmovilización. Existen varios métodos para la inmovilización de microorganismos, entre las técnicas más importantes se encuentran:

- Inclusión (caso de alginato).
- Adherencia.
- Atrapamiento.
- Colonización del soporte.

En este caso el hongo *Tv* crece sobre los cubos de madera, los cuales le sirven como soporte y fuente de carbono.

6.2 Material y equipo.

- PDA
- Medio micológico (MM).
- Medio extracto de malta.
- Cajas Petri.
- Tubos de ensaye
- Matraz Erlen Meyer de 250, 500 y 1000 ml.
- Estufa de cultivo a 28 ° C
- Baño agitado con temperatura controlable
- Autoclave
- Maderas de 5*5*5mm.
- Olla para esterizar
- Incubadora a 28 °C
- Incubadora agitada a 28°C y 100 rpm
- Horno a 70°C
- Campana de flujo laminar
- Balanza analítica
- Licuadora
- Papel aluminio

- Papel de estraza
- Pinzas de disección
- Espátula
- Papel filtro
- Pipetas
- Tubos de ensaye
- Propipetas.

6.3 Procedimiento.

- 1) Sembrar placas con medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) con *Tv* e incubar a 28 °C hasta observar que el crecimiento del hongo.
- 2) Después 7 días de crecimiento cortar cuadritos de agar de aproximadamente 5mm* 5mm y trasplantar a tubos inclinados con agar (PDA).
- 3) Después de 7 días de crecimiento hacer lavado del tubo con H₂O destilada (3ml) e inocular en matraz de 500 ml con 100 ml medio extracto de malta (3 tubos por matraz) .
- 4) Llevar a incubar con agitación los matraces a 100 rpm y 28 °C durante 5 días.
- 5) Esterilizar las maderas y el medio Micológico por separado(100 ml de medio en matraz de 500ml).
- 6) Depositar las maderas estériles en los matraces con medio Micológico estéril en condiciones asépticas.
- 7) Dejar 24 horas embebidas las maderas en medio micológico.
- 8) Después de las 24 horas de remojo de las maderas depositar en condiciones estériles 10 maderas por caja petri conteniendo medio micológico (sólido).
- 9) Al quinto día de incubación del micelio en matraces con extracto de malta disgregar el micelio en licuadora con un tiempo de disgregación de 3 segundos en condiciones asépticas.
- 10) Tomar una alícuota de 5ml del disgregado y bañar las maderas contenidas en cajas petri con medio micológico (sólido).
- 11) Incubar por 5 días en la estufa a 28°C.
- 12) Después de los 5 días de incubación, trasladar las maderas (soporte) a matraces de 250 ml conteniendo 50 ml de medio micológico (3 maderas por matraz.
- 13) Incubar por 7 días y observar la inmovilización.

7) Técnica para determinar biomasa en biopartículas.

7.1 Introducción.

En todos los experimentos que se realizan con seres vivos es de vital importancia determinar el crecimiento de los mismos, para lo cual existen diferentes métodos los cuales dependen del tipo de microorganismos, del medio de cultivo, de la precisión deseada, entre otros.

En este caso se presentará un método para determinar el crecimiento del hongo sobre astillas de madera.

7.2 Materiales y equipos.

- Coladera
- Membranas de nitrocelulosa
- Kit para filtración al vacío
- Estufa para secado
- Vasos de precipitado

- Matraces Erlen Meyer

7.3 Procedimiento.

- 1) Tomar uno de los matraces en los que se este realizando el ensayo de inmovilización (a los 7 días).
- 2) Filtrar por una coladera y lavar las biopartículas con agua destilada.
- 3) Raspar la biopartícula con la ayuda de una espátula y pinzas de disección hasta desprender completamente el micelio de la madera (soporte), depositando el micelio desprendido en un kit para filtración al vacío en una membrana de nitrocelulosa que se encuentra a peso constante y que esta previamente pesada.
- 4) Calentar la membrana a 85 °C por 3 horas.
- 5) Pesar, y por diferencias de peso se calcula la biomasa que se desprendió del soporte, peso que corresponde la biomasa que creció sobre el soporte.

8) Técnica para determinar la velocidad de crecimiento del hongo sobre cubos de madera (cinética de crecimiento).

8.1 Introducción.

En todos los experimentos que se realizan con seres vivos es de vital importancia determinar la velocidad de crecimiento de los mismos, para lo cual existen diferentes métodos los cuales dependen del tipo de microorganismos, del medio de cultivo, de la precisión deseada, entre otros.

En este caso se presentará un método para determinar la velocidad de crecimiento del hongo sobre astillas de madera.

8.2 Materiales y equipos

- Membranas de nitrocelulosa
- Cajas Petri.
- Tubos de ensaye
- Matraz Erlen Meyer de 250, 500 y 1000 ml.
- Estufa de cultivo a 28 ° C
- Baño agitado con temperatura controlable
- Autoclave
- Maderas de 5*5*5mm.
- Kit para filtración al vacío
- Estufa para secado
- Vasos de precipitado

8.3 Procedimiento.

- 1) Esterilizar las maderas y el medio Micológico por separado (100 ml de medio en matraz de 500 ml).
- 2) Depositar las maderas estériles en los matraces con medio Micológico estéril en condiciones asépticas.
- 3) Dejar 24 horas embebidas las maderas en medio micológico.
- 4) Después de las 24 horas de remojo de las maderas depositar en condiciones estériles 10 maderas por caja petri conteniendo medio micológico (sólido), es necesario marcar las cajas por duplicado los días en que se toman las muestras para seguir la cinética de crecimiento (2,4,6,8 y 10 días).

- 5) Al quinto día de incubación del micelio en matraces con extracto de malta disgregar el micelio en licuadora con un tiempo de disgregación de 3 segundos en condiciones asépticas.
- 6) Tomar una alícuota de 5ml del disgregado y bañar las maderas contenidas en cajas petri con medio micológico (sólido).
- 7) Incubar en la estufa a 28°C.
- 8) Extraer las biopartículas (madera-micelio) correspondientes al día de la cinética y raspar la biopartícula con la ayuda de una espátula y pinzas de disección hasta desprender completamente el micelio de la madera (soporte), depositando el micelio desprendido en un kit para filtración al vacío en una membrana de nitrocelulosa que se encuentra a peso constante y que esta previamente pesada.
- 9) Calentar la membrana a 85 °C por 3 horas
- 10) Pesar, y por diferencias de peso se calcula la biomasa que se desprendió del soporte, peso que corresponde a la biomasa que creció sobre el soporte.
- 11) Repetir el paso 8) y 9) con cada uno de los días correspondientes a los puntos de la cinética.
- 12) Graficar Tiempo (días) contra peso seco de biomasa (mg/madera).
- 13) Determinar la velocidad máxima de crecimiento y la constante de afinidad por el sustrato ($\mu_{m\acute{a}x}$, K_m).

9) Técnica para determinar color y ligninoides.

9.1 Introducción.

El agua presenta las características: incolora e insabora; por lo tanto si el agua presenta algún color se considera que esta contaminada, aunque este color se deba a algún compuesto no tóxico.

En el caso del agua que proviene de la industria del papel el color es debido a algunos residuos de tipo ligninoides.

9.2 Materiales y equipos.

- Espectrofotómetro UV / Visible.
- Centrifuga.
- Celda de cuarzo.
- Tubos de ensaye.
- Pipetas.

Determinación de Color

9.3 Procedimiento.

- 1) Centrifugar la muestra para eliminar los sólidos que se encuentran en la suspensión.
- 2) Colocar 10 ml del sobrenadante en un tubo de ensaye.
- 3) Agregar buffer de fosfatos pH 7 hasta que se mantenga el pH igual a 7.
- 4) Determinar absorbancia a 436 nm

9.4 Cálculos.

Para calcular la absorbancia real de la muestra se tiene que:

$$Abs_r = Abs_0(V_m + V_b)/V_m$$

Donde:

Abs _r	Absorbancia real
Abs ₀	Absorbancia leída
V _m	Volumen de la muestra
V _b	Volumen del buffer

Determinación de Ligninoides.

9.5 Procedimiento.

- 5) Centrifugar la muestra para eliminar los sólidos que se encuentran en la suspensión.
- 6) Colocar 10 ml del sobrenadante en un tubo de ensaye.
- 7) Agregar buffer de fosfatos pH 7 hasta que se mantenga el pH igual a 7.
- 8) Determinar absorbancia a 254 nm.

9.6 Cálculos.

Para calcular la absorbancia real de la muestra si la absorbancia es mayor a 0.3 se tiene que diluir la muestra:

$$\text{Abs}_r = \text{Abs}_0(V_m + V_b + V_a)/V_m$$

Donde:

Abs _r	absorbancia real
Abs ₀	absorbancia leída
V _m	Volumen de la muestra
V _b	Volumen del buffer
V _a	Volumen de agua agregado para diluir.

Nota: El buffer de fosfatos se prepara de acuerdo a las siguientes indicaciones:

30.5 ml de Na₂HPO₄ 0.2 M
19.5 ml de NaH₂PO₄ 0.2 M
Aforar a 100 ml con agua destilada.

13. Técnica para determinar proteasas

13.1 Introducción.

Se han identificado dos tipos de proteasas provenientes de hongos en cultivos lote creciendo en medios limitados en cuanto a la fuente de Nitrógeno. La actividad perteneciente a la primera proteasa aparece alrededor del día 2 de cultivo. Y parece ser inherente a la fase de crecimiento, mientras que la segunda aparece alrededor del día 8 y parece surgir después de un periodo de actividad ligninolítica. Se encontró que la actividad de proteasa promueve el decaimiento de la actividad ligninolítica en el cultivo. (Dosoretz C.1990)

Por lo tanto es importante contar una técnica para medir la actividad de proteasas en el medio de cultivo., esta técnica se basa en la degradación de azocaseína parte de las proteasas, lo cual se mide por métodos calorimétricos. (Dosoretz C.1990)

13.2 Materiales y equipos

- Espectrofotómetro ultravioleta – visible
- Celda de cuarzo
- Ultracentrífuga
- Incubadora
- Termómetro
- Micropipeta
- Tubos de ensaye
- Pipetas (1, 5, y 10 ml)
- Matraz Erlen Meyer (125 ml)
- Vasos de precipitados (250 ml)
- Matraces aforados (10 y 25 ml y 1 l)

13.3 Reactivos.

- A) Azocaseína 30 mg /l
- B) Bufer de acetatos 50 mM
- C) Acido tricloroacético 10%
- D) Solución de enzima (extracto muestra)

13.4 Procedimiento para celda de 1ml.

- 1) Agregar 0.2 ml de A, más 0.3 ml de B mas, más 0.5 ml de muestra C, mas 1 ml de D.
- 2) Dejar en reposo por 30 minutos a una temperatura de 37 ° C.
- 3) Parar la reacción con 0.4 ml de C
- 4) Centrifugar a 6000 rpm por 20 min
- 5) Decantar y recolectar el sobrenadante
- 6) Leer absorbancia a 520 nm
- 7) Realizar el mismo el mismo procedimiento al tiempo 0 para el blanco.
- 8) Calcular la dA/dt coinsiderando el t_0 y el t 30 min

14.5 Cálculos:

- 1) Tabular y graficar Absorbancia (A) vs tiempo; tiempo en min.
- 2) Calcular o determinar dA/dt , .
- 3) Determinar la actividad del extracto

UProt = $\mu\text{mol Azocaseína transformado} / \text{min}$

$$UProt = (1/\varepsilon L) (dA/dt)V$$

Donde:

ϵ Coeficiente de extinción para esta enzima es de $0.001 \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}$
A Absorbancia leída a 520 nm
t Tiempo (min.)
L Espesor de la celda (cm)

Referencia.

Dosoretz Carlos G. Chen Hsin; Grethlein Hans E.; (1990) Efect of Environmental Conditions on Extracellular Protease Activity in Ligninolytic Cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 56:2:395-400.

ANEXO B

Preparación de medio de inducción y efluente anaerobio

1. Formulación del EAn acondicionado.

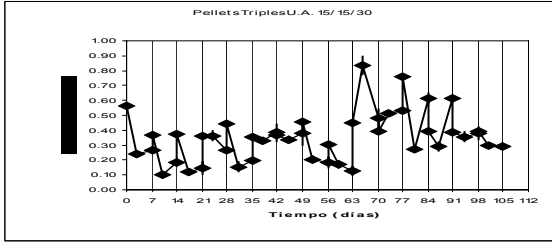
Sustancia	g/L de EAn
K ₂ HPO ₄	1
KH ₂ PO ₄	1
(NH ₄)Cl	0.5
MgSO ₄ -7H ₂ O	0.5
NaCl	0.3
CaCl ₂ -2 H ₂ O	0.1
Tiamina-HCl	0.02
Solución de elementos traza	2 mL/L

2. Formulación del medio de inducción a la formación de pellets.

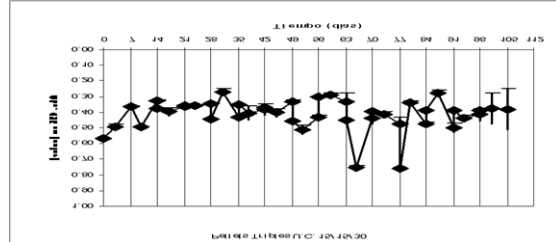
Sustancia	g/L
Glucosa	10
(NH ₄)Cl	1
K ₂ HPO ₄	1
KH ₂ PO ₄	1
MgSO ₄ -7H ₂ O	0.5
NaCl	0.3
CaCl ₂ -2 H ₂ O	0.1
Tiamina-HCl	0.02
Peptona de soya	5
Solución de elementos traza	2mL/L

ANEXO C

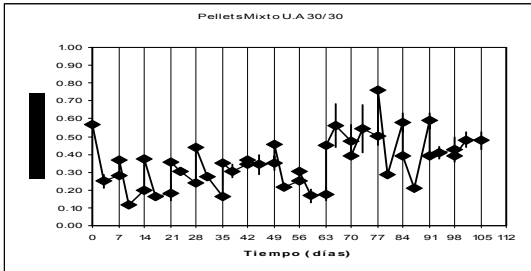
Comportamiento dinámico de color ligninoides y DQO



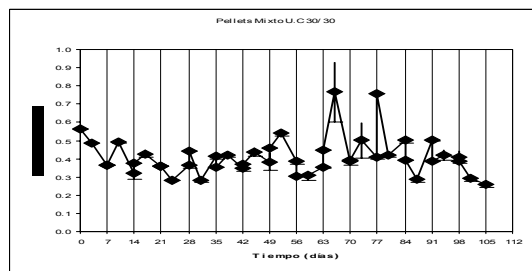
a



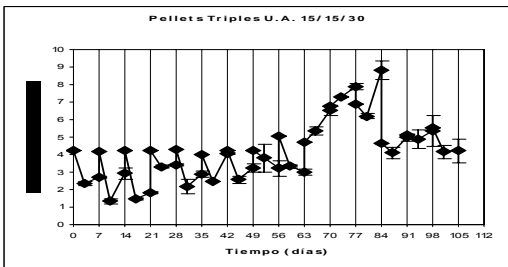
b



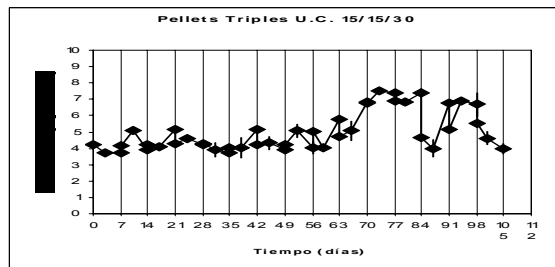
c



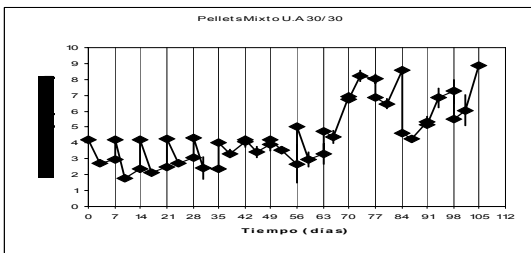
d



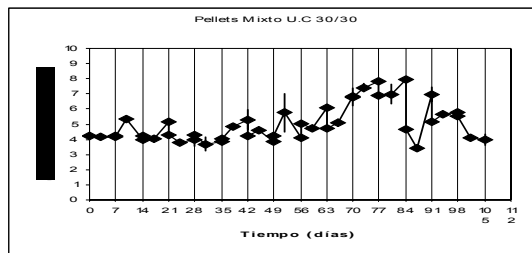
e



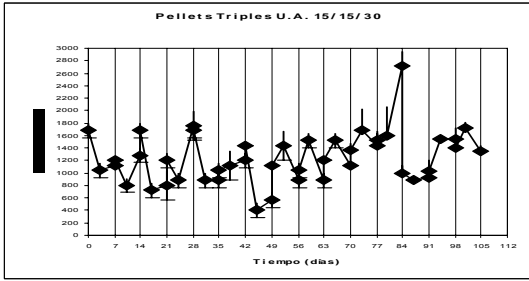
f



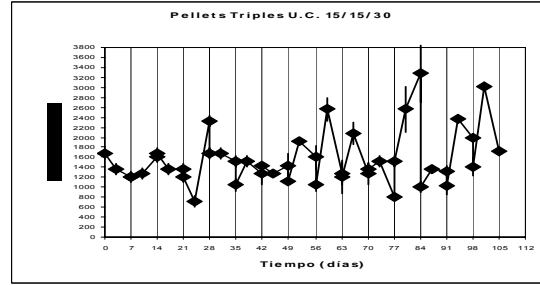
g



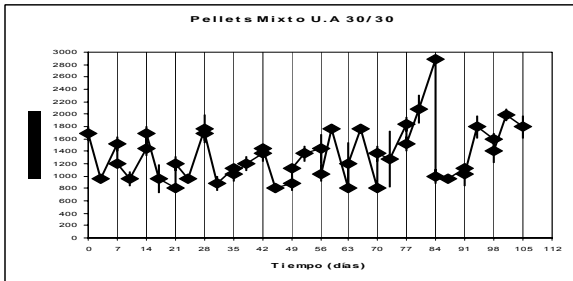
h



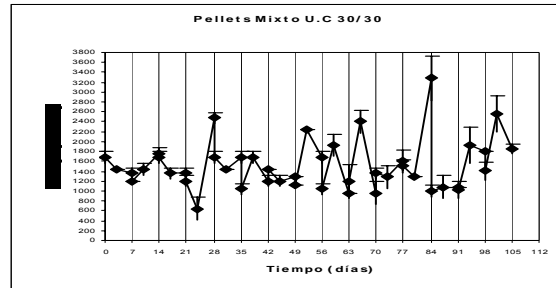
i



j



k



l

a) Evolución dinámica de color, pellets triples, unidad activa. b) Evolución dinámica de color, pellets triples, unidad control. c) Evolución dinámica de color, pellets mixtos, unidad activa. d) Evolución dinámica de color, pellets mixtos, unidad control. e) Evolución dinámica de ligninoides, pellets triples, unidad activa. f) Evolución dinámica de ligninoides, pellets triples, unidad control. g) Evolución dinámica de ligninoides, pellets mixtos, unidad activa. h) Evolución dinámica de ligninoides, pellets mixtos, unidad control. i) Evolución dinámica de DQO, pellets triples, unidad activa. j) Evolución dinámica de DQO, pellets triples, unidad control. k) Evolución dinámica de DQO, pellets mixtos, unidad activa. l) Evolución dinámica de DQO, pellets mixtos, unidad control.