

Instituto Politécnico Nacional
Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología

**INFORME TECNICO DE LA OPCION
CURRICULAR EN LA MODALIDAD DE:**

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**Estrategia de reactivación en el desempeño de un
reactor fúngico de lecho fluidizado con *Trametes
versicolor* inmovilizado en aserrín de encino y carbon
activado**

Que para obtener el Título de Ingeniero Biotecnólogo

Presenta

JESÚS VARGAS GALLEGOS

**DIRECTOR DE PROYECTO EXTERNO:
Dr. HECTOR M. POGGI-VARALDO**

**DIRECTOR DE PROYECTO INTERNO:
Dr. SERGIO GARCIA SALAS**



México, D.F. Mayo 2007



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA



México D. F. a 13 de noviembre del 2006
Of. No. SA-UIPIBI-1678-2006

VARGAS GALLEGOS JESÚS
ALUMNO DEL 7º SEMESTRE DE LA CARRERA DE
INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA
Presente

Comunico a Usted que, como resultado de la evaluación del Comité de Proyecto Terminal, con fecha 24 de marzo del 2006, queda registrado su Proyecto Terminal en la modalidad de "PROYECTO DE INVESTIGACIÓN" denominado "ESTRATEGIA DE REACTIVACIÓN EN EL DESEMPEÑO DE UN REACTOR FÚNGICO DE LECHO FLUIDIZADO CON *Trametes versicolor* INMOVILIZADO EN ASERRÍN DE ENCINO Y CARBÓN ACTIVADO", bajo la dirección externa del Dr. Héctor Poggi-Varaldo e interna del Dr. Sergio García Salas.

De cumplir con las condiciones que abajo se indican, será acreditada la Opción Curricular de Titulación. Así mismo, me permito recordarle que el trabajo experimental deberá concluir en el octavo semestre y entregar, en el mismo, el informe técnico final, de conformidad con los lineamientos que para tal fin establezca el mencionado Comité.

CONDICIONES

- 1.- Permanecer en la misma modalidad en el Proyecto Terminal I, II y III
- 2.- Obtener una calificación igual o superior a 8.0 en Proyecto Terminal I, Proyecto terminal II y en Proyecto Terminal III
- 3.- Cumplir con el 90% de asistencia a las actividades asignadas
- 4.- Cumplir con los demás requisitos que se fijan en el programa de estudios de la asignatura

Sin otro particular por el momento, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"LA TÉCNICA AL SERVICIO DE LA PATRIA"

DR. GUSTAVO VALENCIA DEL TORO
SUBDIRECTOR ACADÉMICO



ccp Expediente de Proyecto Terminal
Archivo

GVDF:RICD

Este trabajo se realizó bajo la dirección del
Dr. Héctor M. Poggi-Varaldo en el laboratorio 33
Grupo de Biotecnología Ambiental del
Departamento de Biotecnología y Bioingeniería
CINVESTAV, I.P.N.

AGRADECIMIENTOS

Gracias Dios por permitirme terminar mi carrera

Gracias a mis padres que siempre estuvieron conmigo, de quienes solo recibí apoyo y comprensión, gracias por todos sus sacrificios para poderme dar mi educación.

Gracias a mis hermanos por todo su apoyo para llegar al termino de un ciclo mas en mi preparación, por su esfuerzo y tiempo que invirtieron en mi.

Gracias a todos mis amigos de la UPIBI, que siempre estuvieron conmigo en las buenas y en las malas

Gracias al laboratorio 33 del DBB del CINVESTAV, IPN por su apoyo para la realización de este proyecto.

Gracias a ti.....

Por ser parte de mí y alegrarme la vida

GRACIAS.....

Indice

	Pág.
Lista de figuras	ii
Lista de tablas	iii
Notación	iv
Resumen	v
1. Introducción	1
1.1 Tratamientos de efluentes de la industria de la celulosa y papel	2
1.2 Lignina	3
1.3 Tratamientos de efluentes contaminados con licor negro de la industria de la celulosa y papel kraft	5
1.4 Microorganismos inmovilizados	6
1.5 Hongos inmovilizados	7
1.6 Hongos utilizados en el tratamiento de efluentes de la industria de la celulosa y papel	8
1.7 Enzimas de hongos basidiomicetos	8
2. Justificación	12
3. Hipótesis	12
4. Objetivos	13
4.1 Objetivo General	13
4.2 Objetivos Específicos	13
5. Metodología	14
5.1 Plan de trabajo	14
5.2 Descripción de actividades	15
5.3 Métodos analíticos	19
5.3.1 Determinación de actividades enzimáticas	19
5.3.2 Ensayo de adsorción	21
5.3.3 Medición de respuesta	22
6. Resultados y Discusión	23
7. Conclusiones	34
8. Referencias	36
9. Anexos	37
9.1 Protocolo de dinámica de adsorción	37
9.2 Figuras de dinámica de adsorción a todas las concentraciones	43

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Manufactura de la celulosa y papel	2
Figura 2. Estructura de la lignina	3
Figura 3. Esquema de tratamiento de licor negro	4
Figura 4. Esquema hipotético de la degradación de la lignina	4
Figura 5. Estructura terciaria de la Mangesoperoxidasa	9
Figura 6. Estructura de la Lacasa de <i>Trametes versicolor</i>	10
Figura 7. Diagrama de bloques del plan de trabajo	14
Figura 8. Reactores fúngicos con pellets híbridos para el postratamiento de efluente anaerobio kraft	18
Figura 9. Dinámica de remoción bruta de color	24
Figura 10. Dinámica de remoción bruta de Lignínoides	24
Figura 11. Dinámica de remoción bruta de DQO	25
Figura 12. Dinámica de actividad de la enzima Mangesoperoxidasa	26
Figura 13. Dinámica de actividad de la enzima Ligninoperoxidasa	27
Figura 14. Dinámica de actividad de la enzima Lacasa	28
Figura 15. Dinámica de actividad de la enzima Proteasas	29
Figura 16. Dinámica de color adsorbido sobre pellets híbridos estériles	32
Figura 17. Ajuste de la dinámica de color adsorbido sobre pellets híbridos estériles	32
Figura 18. Modelo hiperbólico de Freundlich para la adsorción de color en pellets híbridos estériles al 7º día	33

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Hongos filamentosos capaces de degradar compuestos tóxicos	11
Tabla 2. Respuestas del ensayo de inmovilización del micelio sobre aserrín de encino (pellets mixtos) y aserrín de encino/carbón activado (pellets triples) a nivel matraz.	16
Tabla 3. Tabla de seguimiento y análisis para el experimento de inmovilización de <i>Trametes versicolor</i> sobre aserrín de encino (pellets mixtos) y aserrín de encino/carbón activado (pellets híbridos) en medio líquido.	17
Tabla 4. Factores de operación de los reactores de lecho fluidizado con pellets mixtos de <i>Trametes versicolor</i> .	18
Tabla 5. Respuestas de remoción de contaminantes en la operación de los reactores de lecho fluidizado con pellets mixtos de <i>Trametes versicolor</i> .	18
Tabla 6. Sustratos y longitudes de onda utilizados para la determinación de la actividad enzimática	19
Tabla 7. Longitudes de onda utilizadas para la determinación de remoción	20
Tabla 8. Seguimiento y análisis para el experimento de los efectos de remoción de contaminantes en la operación de los reactores de lecho fluidizado con pellets híbridos de <i>Trametes versicolor</i> , así como su actividad enzimática.	20
Tabla 9. Concentraciones de efluente anaerobio para ensayo adsortivo	21
Tabla 10. Resultados de eficiencias	26
Tabla 11. Resultados de promedios de actividades enzimáticas de MnP, LiP, Lacasa y Proteasas	29
Tabla 12. Procesos de tratamiento de aguas en reactores que utilizan hongos basidiomicetos	30
Tabla 13. Soluciones de EAn y EAn diluido	31
Tabla 14. Datos de matraz 7 (0 mL de agua destilada + 50 mL de efluente anaerobio)	31

NOTACIÓN

<i>EAn</i>	Efluente anaerobio
<i>ICP</i>	Industria de la celulosa y papel
<i>MnP</i>	Manganesoperoxidasa
<i>LiP</i>	Ligninoperoxidasa
<i>Lac</i>	Lacasa
<i>Pro</i>	Proteasas
<i>DQO</i>	Demanda Química de Oxígeno
<i>DQO</i>	Demanda Biológica de Oxígeno
<i>CAG</i>	Carbon Activado Granular
<i>RLE</i>	Reactor de Lecho Empacado
<i>RLF</i>	Reactor de Lecho fluidizado
<i>TRH</i>	Tiempo de Residencia Hidráulico
<i>Tv</i>	<i>Trametes versicolor</i>
η	Eficiencia
η_{un}	Eficiencia unitaria neta
η_{sun}	Eficiencia específica unitaria neta

RESUMEN

En el presente trabajo se determinó el efecto de una estrategia de reactivación implementando un recambio parcial de biocatalizadores fúngicos (25%) cada 60 días para reactores de lecho fluidizado operados a dos tiempos de residencia hidráulicos de 5 y 2.5 días, sobre la eficiencia de remoción de materia contaminante como *DQO*, color y lignínoles.

Para la formación de los biocatalizadores se empleo aserrín de encino y carbon activado como soporte, el tamaño promedio de la partícula del aserrín de encino y carbón activado fue menor a 250 μm , a una proporción masa micelio/masa soporte de 15 mg aserrín/15 mg carbón activado/30 mg hongo, la cepa empleada fue *Trametes versicolor* (CDBB-h-1051), el reactor de lecho fluidizado que se empleo fue de una capacidad de 1.7 L, los biocatalizadores empleados fueron de un tamaño aproximado de 5 mm.

Al día 60 cuando ocurre el primer recambio parcial de biocatalizadores (25%) se observó un decremento en las remociones de color, lignínoles y *DQO*, pero pasando 10 días de adaptación aumentaron y se estabilizaron. Para el segundo recambio parcial de biocatalizadores se decidió hacer el recambio al día 130 con biocatalizadores acondicionados para evitar la fase de adaptación del hongo dentro del reactor, permitiendo que las eficiencias de remoción de contaminante se mantuvieran en sus valores estables sin caída de eficiencia.

Las remociones obtenidas para los reactores fueron: a TRH de 5 días: color $61.01 \pm 0.50\%$, lignínoles $24.94 \pm 0.93\%$, *DQO* $38.71 \pm 15.49\%$, mientras que a TRH de 2.5 días fueron: color $61.69 \pm 0.53\%$, lignínoles $26.66 \pm 0.49\%$, *DQO* $38.41 \pm 10.93\%$.

La disminución del TRH no tuvo efecto negativo sobre la eficiencia removedora de contaminantes del proceso.

La estrategia de recambio de biocatalizadores mejoró la remoción de color, no así la de lignínoles y *DQO*, respecto a la operación de un biorreactor sin recambio de pellets, durante un periodo de operación total de 181 días.

La dinámica de adsorción de color expresado en mg/mg de cloroplatinato de potasio sobre pellets híbridos sigue un comportamiento potencial con respecto al tiempo, con la ecuación $q=0.00045*t^{1.173}$, con $r = 0.98$, la isoterma de adsorción de color sobre los pellets híbridos se ajustó razonablemente bien al modelo hiperbólico de Freundlich con la ecuación expresada en (mg/mg) $q=0.0254*C^{0.256}$; con $r=0.89$.

1. INTRODUCCIÓN

El crecimiento poblacional de los últimos años, así como la laceración del entorno y el vertimiento de efluentes y otras sustancias contaminantes al medio han llevado al mundo a trazar estrategias en pos de aprovechar al máximo los recursos naturales. Es por ello que la minimización de residuos se ha convertido en un aspecto fundamental en las industrias de procesos, motivado esto por el incremento de los costos de disposición, las responsabilidades legales y las regulaciones ambientales que cada vez con más fuerza se imponen en las empresas.

La industria de la celulosa y papel (*ICP*) tradicionalmente ha sido una de las mayores consumidoras de agua fresca. Una reducción en el consumo de agua fresca en este tipo de industrias, provoca una disminución en la generación de residuales, pudiera tener lugar solo si minimizamos el consumo de agua en la empresa a través de un reciclo de los efluentes que son vertidos en el proceso (Hernández-Touset *et al.*, 2002).

Durante la manufactura de celulosa Kraft, la digestión de las astillas de madera se realiza con la mezcla NaOH/Na₂S con el propósito de solubilizar la lignina, un polímero aromático, amorfo y altamente condensado, que representa entre el 20 y 30 % en peso de la madera. Luego, la lignina solubilizada es concentrada y quemada para generar energía que se usará en el mismo proceso de celulosa.

La celulosa que se obtiene en este proceso es posteriormente oxigenada para continuar la deslignificación; así el proceso alcanza así tenores de alrededor de 2 - 3 % de lignina residual.

En una segunda etapa, durante el proceso de blanqueo que generalmente utiliza una mezcla de cloro y dióxido de cloro, se forman fenoles clorados por reacción de la lignina residual, que está químicamente unida a la celulosa. Aunque el volumen de efluente generado en la secuencia de blanqueo es mucho menor (alrededor de 10 m³/ton), en esta etapa se forman los compuestos de mayor peligrosidad. Estos compuestos han sido descritos en la literatura como bio-acumulables, tóxicos y con alto potencial carcinogénico (Mansilla. *et al.*, 2000).

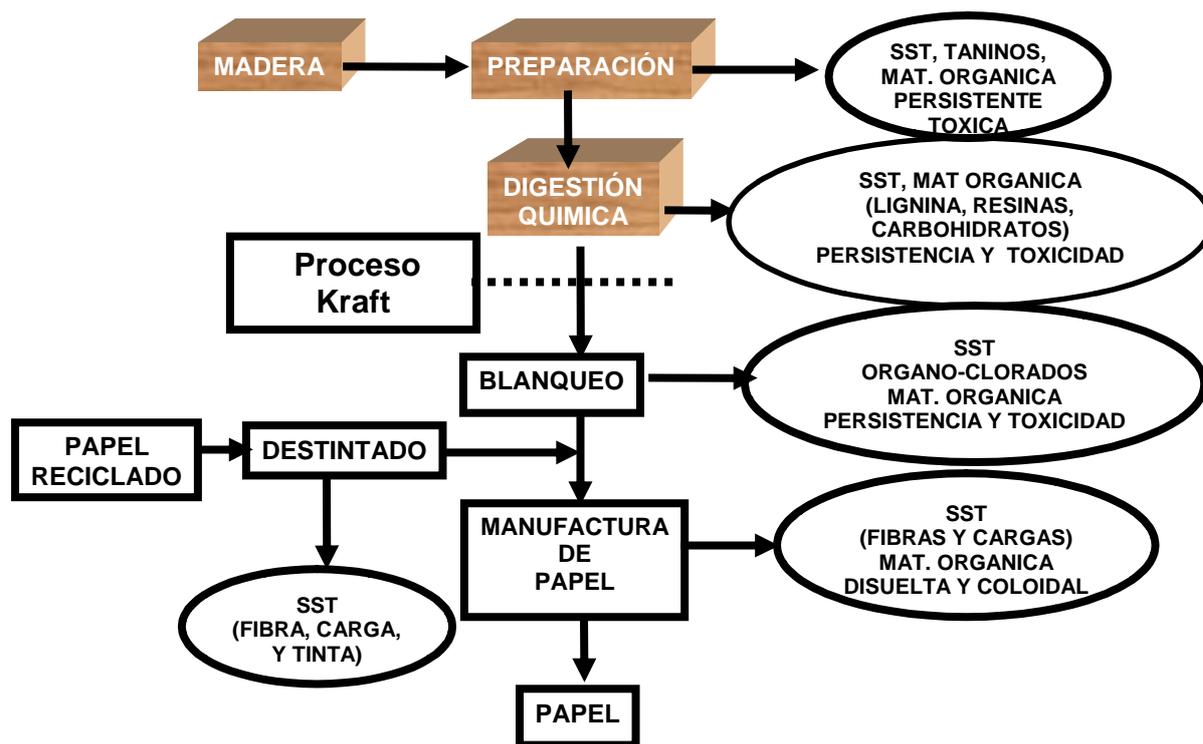


Figura 1. Manufactura de la celulosa y papel
Poggi-Varaldo, 1994a; Poggi-Varaldo, 1994b

Varias especies de basidiomicetos, han sido estudiadas en los últimos años gracias a su capacidad de degradar la lignina, entre ellos el hongo *Trametes versicolor*, cuyo sistema enzimático está comprendido por las enzimas Ligninaperoxidasa (*LiP*), Manganesoperoxidasa (*MnP*) y Lacasa (*LAC*), las cuales tienen un potencial de uso industrial, además de su viabilidad para decolorar efluentes provenientes de industrias productoras de textiles y papeles (Addleman *et al.*, 1995).

1.1 Tratamientos de efluentes de la industria de celulosa y papel

Los sistemas convencionales de tratamiento de efluentes de una planta de celulosa son en general bastante eficientes en la remoción de la demanda biológica de oxígeno y constan de un proceso primario (flotación con aire, floculación y sedimentación) y otro secundario (lagunas aireadas, lodos activados). Sin embargo, si la carga de compuestos organoclorados generados en la etapa de blanqueo es muy alta, los procesos secundarios de tratamiento pueden colapsar por la baja biodegradabilidad de la materia orgánica disuelta, en especial si el efluente contiene ligninas cloradas de alta masa molecular. Se puede llegar a inactivar, e incluso destruir la flora microbiana, debido a la alta toxicidad del sustrato. Parte de este problema se ha resuelto con la incorporación de nuevas secuencias de blanqueo, donde se reemplaza totalmente al

cloro molecular por dióxido de cloro (procesos ECF, del inglés Elementary Chlorine Free) o por reemplazo total de compuestos de cloro (procesos TCF, del inglés Total Chlorine Free). Estos procesos no eliminan totalmente el impacto ambiental de las descargas líquidas, en el primer caso por la persistencia de algunos compuestos organoclorados, y en el segundo por la necesidad de agregar grandes cantidades de quelantes de hierro, tales como EDTA y DTPA, que generan un nuevo problema de contaminación.

En estos casos de aguas con contaminantes altamente tóxicos es conveniente realizar un pretratamiento, previo a la etapa biológica, que permita aumentar la biodegradabilidad y disminuir la toxicidad del agua residual.

1.2 Lignina.

Los efluentes de la industria de la celulosa y papel contienen cantidades significativas de fragmentos de lignina, esto debido a la digestión química de la astilla de madera. La lignina es la tercera fracción mayoritaria de la biomasa lignocelulósica. Se trata de un polímero tridimensional amorfo formado por la polimerización deshidrogenativa de unidades de fenilpropano ligadas por diferentes tipos de enlaces que se alternan de manera desordenada (figura 2).

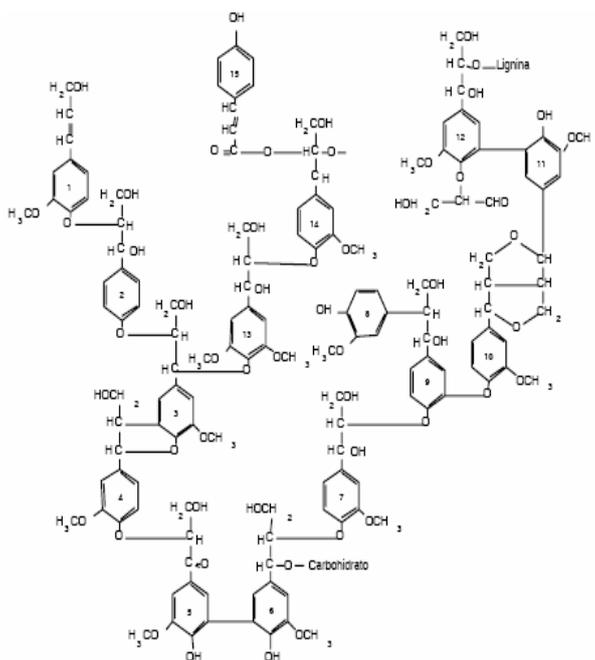


Figura 2. Estructura de la lignina.
Adler. (1977)

La lignina es una molécula muy compleja y con un elevado peso molecular. La lignina es el polímero natural más complejo en relación a su estructura, es por esa razón que sirve para proporcionar rigidez a la pared celular de las plantas, creando tejidos resistentes al ataque de los microorganismos, impidiendo la entrada de las enzimas destructivas en la pared celular). En estudios realizados en el grupo de Biotecnología Ambiental del CINVESTAV-IPN (Estrada-Vázquez *et al.*, 1999), se evaluaron las eficiencias de remoción de color y lignínoides mediante un tratamiento realizado en un RANLEF, utilizando como material de soporte carbón activado granular y como inóculo la biomasa de un digestor anaerobio, seguido por dos tipos de postratamiento, uno biológico y otro fisicoquímico. Al efluente resultante del tratamiento anaerobio, al cual se le dará el post-tratamiento aerobio con hongos basidiomicetos propuesto en este trabajo se ha denominado Efluente Anaerobio (Fig. 3).



Figura 3. Esquema de tratamiento de licor negro
Poggi-Varaldo (1994)

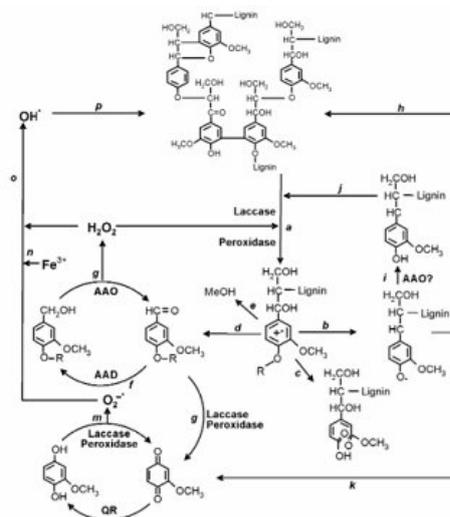


Figura 4. Esquema hipotético de la degradación de la Lignina
Bonnarme Pascal *et al.*, (1991)

1.3. 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. 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 de la *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 anaerobio y aerobio, especialmente utilizando configuraciones con 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.

Se ha encontrado que los hongos del tipo Basidiomiceto, 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 lignínoides mediante un tratamiento realizado en un reactor anaerobio de lecho fluidizado (*RANLEF*), utilizando como material de soporte carbón

activado granular 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 *Lentinus edodes*) utilizando micelio libre, micelio inmovilizado en alginato de calcio y CAG; y para el 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 lignínoles 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.

1.4. 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.

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.

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, Hackel, Kierstan and Bucke proponen el alginato como un medio de soporte para la inmovilización, el cual en la actualidad es ampliamente utilizado.

Por otro lado el carbon activado granular (CAG) ha demostrado poseer una gran capacidad de adsorción, debido a su gran área superficial 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.

1.5. Hongos inmovilizados.

Ya existen diversos estudios en los que se reportan la inmovilización de enzimas o microorganismos. 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.

Se ha reportado la existencia de otros soportes como son: las astillas de madera empleado en un proceso de biodegradación de 2,4-DCP mediante la inmovilización de *Phanerochaete chysosporium* en soporte de madera de encino y pino (cubos) en un reactor de lecho empacado. Y un proceso para la degradación de diuron que también emplea astillas de madera. En trabajos realizados por el grupo de Biotecnología Ambiental de DBB se inmovilizó el hongo *Trametes versicolor* (*Tv*) sobre cubos de madera de encino y pino, para el postratamiento de efluentes de la industria de la celulosa y papel (*ICP*) un reactor aerobio de lecho empacado, inmovilizando 8 mg/cubo requeridos. La inmovilización se dividió en dos etapas: la primera en cajas Petri para facilitar la adhesión del hongo a la madera y la segunda consistió en el afirmamiento del hongo a los cubos en cultivo líquido. El tiempo total requerido para lograr los 8 mg/cubito fue de 10 días (5 días en caja + 5 días en afirmamiento), tanto para pino como para encino.

En los ensayos de postratamiento del efluente anaerobio (Ean) en matraz, se pudo constatar que en general las remociones de los parámetros contaminantes fue significativamente mayor a pH 4.5 que a pH 7 ($P(F) < 0.001$). 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 lignínoles 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 % lignínoides para TRH de 5 días, y 32.08 ± 4.26 % DQO, 69.22 ± 3.88 % color, 54.52 ± 2.93 % lignínoides para TRH de 2.5 día. Se notó un ligero incremento en las remociones a TRH 2.5 días, pero no fue estadísticamente significativo.

1.6. 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).

1.7 Enzimas de hongos basidiomicetos

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 remoción de la lignina esta asociada a la presencia de tres de las enzimas típicas de *Trametes versicolor*, Ligninoperoxidasa (*LiP*), Manganesoperoxidasa (*MnP*) y lacasa (*Lac*).

Ligninaperoxidasa (LiP): posee un peso molecular de 38 a 43 kDa y contiene protoporfirina IX como grupo prostético (Messner, 1998). Esta enzima oxida el núcleo aromático (fenólico y no fenólico) por la remoción de un electrón, generando radicales fenoxi y radicales catión. Por último, reacciona espontáneamente con nucleótidos (principalmente con agua) y oxígeno molecular. El resultado es una “combustión enzimática” en la cual las uniones C-C y C-O son divididas, depolimerizando el polímero y abriendo los anillos aromáticos, formando en consecuencia abundantes productos aromáticos y alifáticos. LiP no es aparentemente producida por algunos hongos de pudrición blanca, incluyendo *Ceriporiopsis subvermispora*, lo que hace pensar que no es requerida en todos los hongos, es decir, que los hongos de pudrición blanca tienen más de un sistema enzimático para degradar la lignina. Las lignina peroxidadas se componen de ácidos isoenzimáticos codificados por genes de estructura múltiple, cuya expresión está regulada por nutrientes. La lignina peroxidasa exhibe el ciclo común de peroxidasa catalítica, basado en reacciones de oxidación sucesivas produciendo la oxidación del sustrato (Akhtar *et al*, 1997).

Manganesoperoxidasa (MnP): su peso molecular es similar al de LiP; también contiene protoporfirina IX y cataliza oxidaciones de un electrón en compuestos fenólicos y no fenólicos, específicamente de Mn²⁺ a Mn³⁺, el cual a su vez oxida lignina (Fig. 3). El sustrato primario es Mn (II) que se oxida a Mn(III) y es estabilizado formando complejos con ácidos orgánicos (Messner, 1998). A pesar de que esta enzima ha sido encontrada en casi todos los estudios con hongos de pudrición blanca, su función exacta y las reacciones químicas que llevan a la oxidación de lignina aún no están claras. Las manganeso peroxidadas se componen, como las LiP, de múltiples ácidos isoenzimáticos codificados por genes de estructura múltiple, cuya expresión está regulada por nutrientes; en el caso de MnP, también ocurre una regulación por Mn²⁺. Las manganesoperoxidasas son ligeramente más grandes que LiPs, pero exhiben el mismo ciclo catalizador de peroxidadas (Akhtar *et al.*, 1997).



Fig. 5 Estructura terciaria de la Manganesoperoxidasa
(Adaptado de www.peroxidase.at)

Lacasa: corresponde a una oxidasa que contiene cobre, con un peso molecular entre 60 y 80 kDa (Fig. 4). Esta enzima cataliza cuatro oxidaciones de un electrón de la mayoría de los compuestos fenólicos, formando radicales fenoxi libres como intermediarios (Messner, 1998). Lacasa es producida (secretada) por la mayoría pero no por todos los hongos de pudrición blanca. Como LiP, lacasa no es aparentemente requerida para la degradación de la lignina en todos los hongos. Lacasa oxida unidades fenólicas en la lignina a radicales fenoxi (Akhtar et al, 1997). Actualmente se acepta que la mayor parte de las enzimas que degradan la lignina parecen ser capaces de actuar a distancia de la hifa, en la profundidad de la pared celular de la madera, por vía de complejos de manganeso o por vía de otros compuestos de bajo peso molecular llamados mediadores (Messner, 1998).

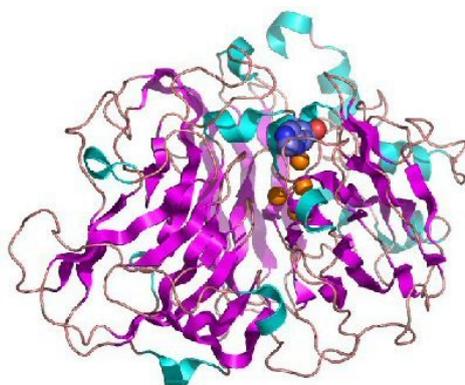


Fig. 6 Estructura de la Lacasa de *Trametes versicolor*
(Adaptado de chemistry.umeche.maine.edu)

Los basidiomicetes de pudrición blanca tienen un complejo mecanismo que involucra enzimas que atacan directamente a la lignina, como LiP, MnP y lacasa, pero también tienen enzimas que producen peróxido de hidrógeno para ayudar a la acción catalítica de las peroxidases (como glucosa oxidasa y glioxal oxidasa), enzimas que pueden participar en la ruptura de los fenoles, aldehídos, otros derivados de la lignina (como quinona oxidoreductasa), o hidrocarburos aromáticos policíclicos. (Silva, 2002).

Tabla 1. Hongos filamentosos capaces de degradar compuestos tóxicos.

Hongo	Compuesto	Referencia
<i>Phanerochaeta chrysosporium</i>	Blanqueo de aguas	Kondo y col., 1994
	PCF	Mileski y col., 1992
	Isecticidas OF	Bumpus y col., 1993
	2,4-diclorofenol	Valli y Gold, 1991
	2,4,5-triclorofenol	Joshi y Gold, 1993
	HC	Sutherland, 1992
	Fenentreno	Brodkorb y Legge, 1992
	Trinitotolueno	Bumpus y Tartaco, 1994
	Mono y Diclorobenceno	Yadav y Reddy, 1993
	Etileno, tolueno, xileno	Yadav y col., 1995
	Bifenilos policlorados	Yadav y col., 1995
Colorante azo	Paszczynski y col., 1992	
<i>Phanerochaeta sordida</i>	Blanque de aguas	Kondo y col., 1994
<i>Trametes versicolor</i>	Blanqueo de aguas	Roy y Archibald, 1993
	PCF	Allegan y col., 1992
<i>Cunninghamella elgans</i>	HC	Sutherland, 1992
	Benzopireno	Cerniglia y Gibson, 1979
	Fluoranteno y acenafteno	Pothuluri y col, 1992
<i>Trichoderma virgatum</i>	PCF	Cserjesi y Jonson, 1971
<i>Trichoderma harzianum</i>	PCF	Cserjesi, 1967
<i>Trichoderma viride</i>	PCF	Cserjesi, 1967
<i>Aspergillus achraceus</i>	HC	Sutherland, 1992
<i>Aspergillus flamigatus</i>	p-Cresol	Kandam y Drew, 1985
<i>Aspergillus clavatus</i>	Glucosinolato	Smits y col., 1993
<i>Coprinus macrohizus</i>	Fenol	Kassim y col., 1994
<i>Phellinus bedius</i>	PCF	Allegan y col., 1992
<i>Rhizopus sp.</i>	PCF	Tomasini y col., 1996
<i>Fusarium</i>	PCF	Seigle-Murandi, 1993

Nota: PCF: pentaclorofenol, HC: hidrocarburos, OF: organofosfatados

2. JUSTIFICACIÓN.

Se ha observado que los efluentes de la *ICP* son de difícil tratamiento debido a su alto contenido de derivados de la lignina. El postratamiento anaerobio puede degradar efectivamente una buena parte de la materia orgánica biodegradable, pero aun quedara en el efluente una gran porción de compuestos recalcitrantes, 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. Debido a que actualmente no existe un método, que además de disminuir las unidades de color, abata la carga orgánica del efluente, se propone un postratamiento aerobio con hogos basidiomicetos.

3. HIPOTESIS

La estrategia de recambio parcial de pellets híbridos (biocatalizadores) en un reactor de lecho fluidizado para el post-tratamiento del efluente anaerobio (*EAn*) será mas efectiva que la operación simple del reactor con pellets híbridos sin recambio de biocatalizador.

4. OBJETIVOS.

4.1. GENERAL.

Evaluar el efecto de una estrategia de reactivación implementando un recambio parcial de biocatalizadores en un reactor de lecho fluidizado con *Trametes versicolor* inmovilizado en aserrín de encino y carbón activado (pellets híbridos) en la remoción de contaminantes de la industria de la celulosa y papel

4.2 ESPECÍFICOS.

4.2.1 Evaluar la influencia del tiempo de residencia hidráulico sobre el desempeño del reactor

4.2.2 Determinar la eficiencia de los reactores de lecho fluidizado mediante los parámetros de *DQO*, color y Lignininos en los ensayos continuos

4.2.3 Determinar las actividades enzimáticas de *MnP*, *LiP*, *Lac* y *Pro* en ensayos continuos.

5. METODOLOGIA.

5.1. Plan de trabajo

Actividad 1. Formación de Biocatalizadores

Actividad 2. Implementación de los reactores

Actividad 3. Operación de los reactores a tiempos de residencia hidráulicos de 5 y 2.5 días con recambio parcial de biocatalizadores.

Actividad 4. Determinación de la remoción de contaminantes, color, lignínoles y DQO.

Actividad 5. Determinación de las actividades enzimáticas (*MnP*, *LiP*, *Lac* y Proteasas) que están relacionadas con la remoción de contaminantes

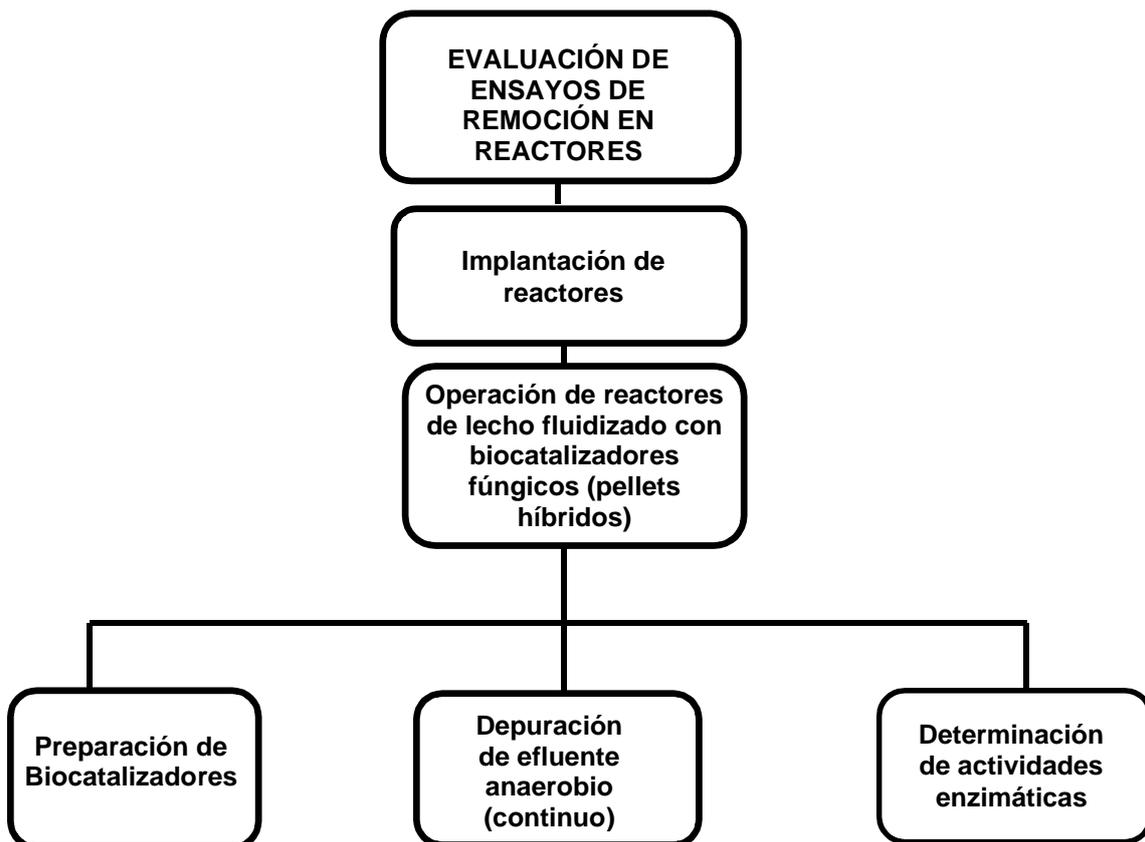


Figura 7. Diagrama de bloques del plan de trabajo

5.2. Descripción de actividades

Actividad 1. Formación de Biocatalizadores

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) Procuración de cepas y mantenimiento

En esta actividad se realizara 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 determinara 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 realizó un estudio para determinar la relación hongo/aserrín de encino (pellets mixtos) hongo/aserrín de encino/carbón activado (pellets mixtos) 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

10 mg Aserrín/ 20 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 consiste 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.

En la Tabla 2, se muestran las respuestas a medir, para determinar la cantidad de *Trametes versicolor* inmovilizado en un periodo de 7 días, a 28 °C y 80 rpm por matraz, esperando lograr 8 mg de *Trametes versicolor* inmovilizado por pellets discreto.

Tabla 2. Respuestas del ensayo de inmovilización del micelio sobre aserrín de encino (pellets mixtos) y aserrín de encino/carbón activado (pellets triples) a nivel matraz.

PARÁMETROS	INICIO	FINAL	METODO
Número y tamaño de pellets		X	Visual, regla
Masa del hongo inmovilizado		X	
Masa del hongo suspendido		X	
Masa de aserrín suspendido		X	
Masa de carbón activado suspendido		X	

Notas: Incubación de 7 días a 28 °C y 80 rpm en medio líquido

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

En la Tabla 3, se muestra el seguimiento de análisis que se lleva 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 3. 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 híbridos) en medio líquido.

PARÁMETRO	INICIO	INTERMEDIO	FINAL	METODO	OBS.
Masa Hongo en pellet y suspendido	X		X	Std. Meth 2540G	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		

Actividad 2. Implementación de los reactores

En esta actividad se llevará a cabo el diseño y procuración de materiales de los reactores de lecho empacado con hongos inmovilizados a nivel laboratorio, basándose en los experimentos de inmovilización.

- a) Selección de materiales para la construcción de los reactores prototipo a nivel laboratorio.
- b) Diseño y dimensiones de los reactores.
- c) Determinación de las condiciones de operación.

Actividad 3. Operación de los reactores a tiempos de residencia hidráulicos de 5 y 2.5 días con recambio parcial de biocatalizadores (25%).

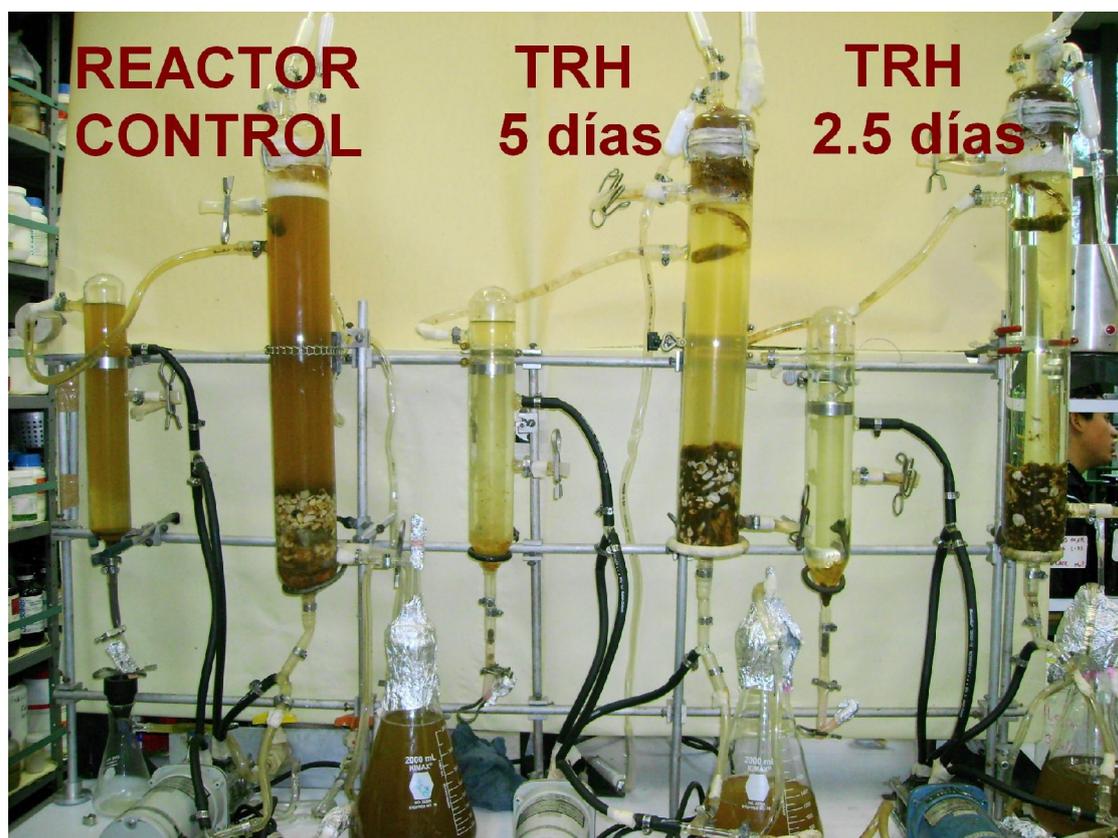


Figura 8. Reactores fúngicos con pellets híbridos para el postratamiento de efluente anaerobio kraft

Tabla 4. Factores de operación de los reactores de lecho fluidizado con pellets mixtos de *Trametes versicolor*.

FACTOR	NIVEL
RLF	5 días 2.5 días

Tabla 5. Respuestas de remoción de contaminantes en la operación de los reactores de lecho fluidizado con pellets mixtos de *Trametes versicolor*.

PARÁMETROS	OPERACIÓN DEL RLE	OPERACIÓN DEL RLF	OBS .
η_{un} y η_{sun} DQO	X	X	
η_{un} y η_{sun} Color	X	X	
η_{un} y η_{sun} Lignínoides	X	X	
Crecimiento de hongo	X	X	
Remoción de madera	X	X	
Remoción de celulosa/hemicelulosa	X	X	
Remoción de lignina	X	X	

Los controles necesarios para la determinación de los parámetros de respuesta de la remoción de contaminantes es un reactor estéril. Este se esteriliza en autoclave a 15 psia por 1 hora. El efluente anaerobio junto con los biocatalizadores (pellets híbridos) se expondrá a 300 mg/ L de azida de sodio y se tindalizaran a 15 psia por 1 hora en dos ocasiones para asegurarse de la esterilidad completa de los reactores durante la operación. También se realizará toma frecuente de muestra de los reactores control y realizar siembra en placa y observar cuentas totales de bacterias y hongos, de esta manera se determinará si los reactores se mantienen estériles.

Actividad 4. Determinación de la remoción de contaminantes, color, lignínoides y DQO.

Actividad 5. Determinación de las actividades enzimáticas (*MnP*, *LiP*, *Lac* y Proteasas) que están relacionadas con la remoción de contaminantes

5.3 Métodos analíticos

5.3.1 Determinación de actividades enzimáticas.

El efluente contaminado entra en contacto con el hongo inmovilizado dentro del reactor, para su depuración de manera continua se toma una muestra de 340 ml, para un tiempo de residencia hidráulico de 5 días y 540 ml para un TRH de 2.5 días, con el objeto de comparar la eficiencia depuradora en ambos TRH.

Las muestras obtenidas de los reactores, fueron centrifugadas a 8,000 rpm durante 20 minutos, con el objeto de eliminar la biomasa que probablemente se haya desprendido, así como partículas suspendidas en el efluente, evitando así interferencia en los resultados del análisis espectrofotométrico realizado posteriormente.

Tabla 6. Sustratos y longitudes de onda utilizados para la determinación de la actividad enzimática

Enzima	Sustrato	Longitud de onda (nm)
MnP	Albúmina	610
LiP	Alcohol Veratrilico	310
Lac	ABTS	420
Proteasas	Azocaseína	520

Tabla 7. Longitudes de onda utilizadas para la determinación de remoción

Parámetro	Longitud de onda (nm)
Color	436
Lignínoides	254

Tabla 8. Seguimiento y análisis para el experimento de los efectos de remoción de contaminantes en la operación de los reactores de lecho fluidizado con pellets híbridos de *Trametes versicolor*, así como su actividad enzimática.

PARÁMETRO	AFLUENTE	EFLUENTE	FASE GASEOSA	FASE SÓLIDA	METODO	OBS.
DQO	X	X			Std Meth. 5220C	
Color	X	X			Std Meth. 5550B	
Lignínoides	X	X			Std Meth. 5550B	
MnP		X				
LiP		X				
Lac		X				
Proteasas		X				
Masa del soporte				X		
Hongo en base seca				X	Std Meth. 2540G	

5.3.2 Ensayo de adsorción.

Para verificar la adsorción que se pudieran estar agregando a nuestro sistema biológico, se realizó un ensayo de adsorción en micelio inactivado.

El ensayo consta de colocar en matraces Erlenmeyer de 250 ml diferentes concentraciones de *EAn* (Tabla 9) por duplicado para observar su comportamiento en color y lignínoides, por lo tanto cada matraz contiene 50 mL de EAn con 5 pellets híbridos, incubándolos a 28°C, 100 rpm, a pH 4.5, por 7 días.

Tabla 9. Concentraciones de efluente anaerobio para ensayo adsortivo

Ean (mL)	Agua destilada (mL)
50	0
40	10
30	20
25	25
20	30
10	40
5	45

Se obtienen la absorbancia de cada concentración y se transforman a mg/L de cloro platinato de potasio a partir de la siguiente formula (Wingate *et al.*, 2005):

$$Cl.Pt.mg / L = \frac{9726.56}{Abs} * Abs \text{ exp} \dots\dots\dots[1]$$

Donde:

ClPt mg/L= Concentración de cloro platinato en mg/L

Abs exp.= Absorbancia leída experimentalmente

5.3.3 Medición de respuesta

En base a los datos experimentales registrados, se midieron las siguientes respuestas de remoción de contaminantes

Remoción bruta.- Es la disminución de contaminante, respecto a los valores iniciales del mismo.

Eficiencia unitaria neta.- Es la eficiencia de remoción de la unidad experimental activa, descontando el valor de la unidad control.

Eficiencia específica unitaria neta.- Es la eficiencia de la unidad experimental activa, descontando el valor de la unidad control, y por unidad de biomasa.

El tratamiento de datos para obtener las respuestas se realizó de la siguiente manera:

Eficiencia unitaria neta (η_{un}): DQO, color, lignínoídes

$$\eta_{un} = \frac{[(P_i - P_f) - (P_{ic} - P_{fc})]}{(P_i)} * 100 \dots \dots \dots [2]$$

Eficiencia específica unitaria neta (η_{sun}): DQO, color, lignínoídes

$$\eta_{sun} = \frac{[(P_i - P_f) - (P_{ic} - P_{fc})]}{(P_i * B_o)} \dots \dots \dots [3]$$

Donde:

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_o = Biomasa inicial en el reactor.

6. RESULTADOS Y DISCUSION

Los reactores (Control, Activo1 TRH 5días, Activo2 TRH 2,5 días) operaron por un periodo de 181 días, con dos recambios de biomasa del 25% (17 pellets), uno al día 60 y otro al día 130, este ultimo con biomasa previamente acondicionada, los reactores mostraron remoción de color, lignínoles y *DQO*, al igual que la producción de sus enzimas como son *LiP*, *Lac*, y proteasas, que están relacionadas con la remoción de contaminantes.

Los contaminantes que dan coloración al *EAn* son los de origen ligninolítico, así que su remoción se ve reflejada en la disminución de los niveles de color en el efluente (Fig. 9 y 10)

En los primeros días de operación las eficiencias para color y lignínoles son menores al 40%, esto debido a que existe una etapa de adaptación del microorganismo al medio, donde las actividades enzimáticas al principio son bajas.

La adaptación del hongo al medio es aproximadamente durante los primeros diez días, como se observa en las graficas (Fig. 9, 10 y 11) las eficiencias tienden a disminuir al pasar 60 días de operación, esto es debido a que el hongo tiende a saturarse de contaminante, el recambio con biomasa nueva 17 pellets por reactor (25%) hace que las eficiencias disminuyan, pero pasando 10 días de adaptación de la nueva biomasa se nota como aumentan la eficiencia en la remoción de color, lignino y *DQO*.

La estrategia original es hacer un recambio de biomasa cada 60 días de operación, como se nota al día 60 las actividades disminuyen y con el recambio disminuye a un mas, y empieza aumentar después de que la biomasa nueva se adapta pasando 10 días, lo que se hizo fue hacer un recambio hasta el día 130 ya que las actividades se mostraron constantes, al día 130 se hace el recambio con biomasa previamente acondicionada a las mismas condiciones a las cuales estaría en el reactor, se nota que las remociones aumentan y se mantienen constantes para el caso de color y lignínoles (Fig. 9 y 10), no tanto así para la *DQO* (Fig. 11).

El acondicionamiento de los biocatalizadores utilizados para el segundo recambio se hizo de la siguiente manera., se incubaron 17 pellets (25% de la biomasa total) en 300 mL de *EAn*, a pH 4.5, 80 rpm, durante 10 días, esto con el fin de que cuando se incorporaran al reactor la eficiencia si no aumentara mínimo se mantuviera constante, esto se hizo con el fin de no afectar tanto la eficiencia del reactor y evitar los 10 días de acondicionamiento de los biocatalizadores dentro del reactor.

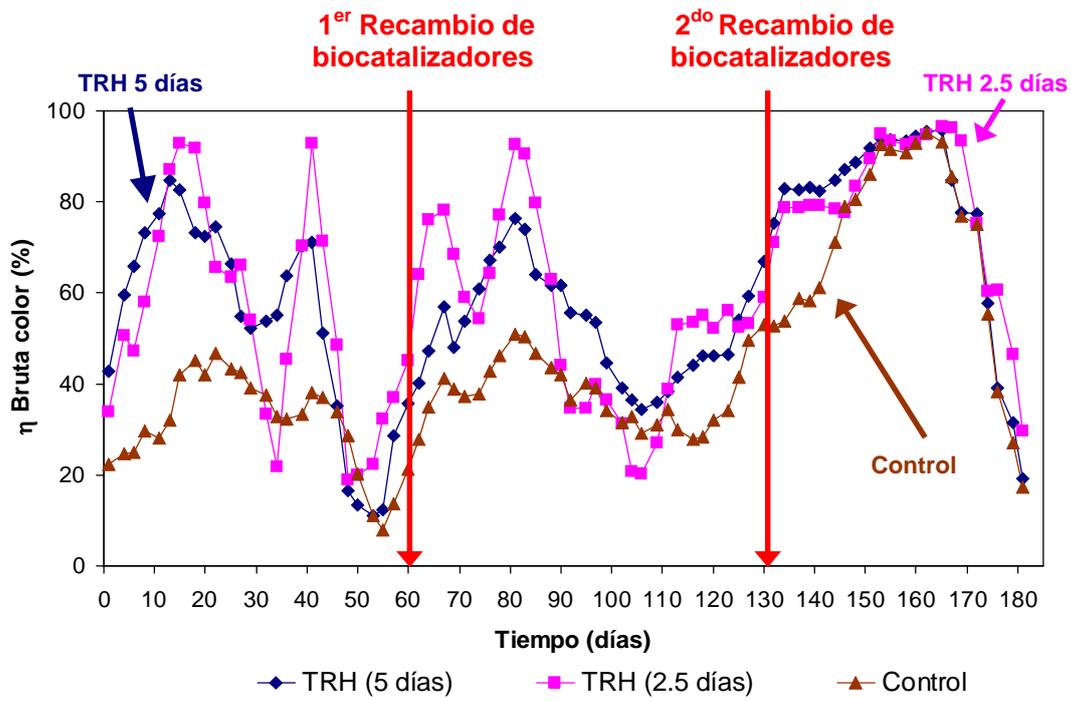


Figura 9. Dinámica de remoción Bruta de Color

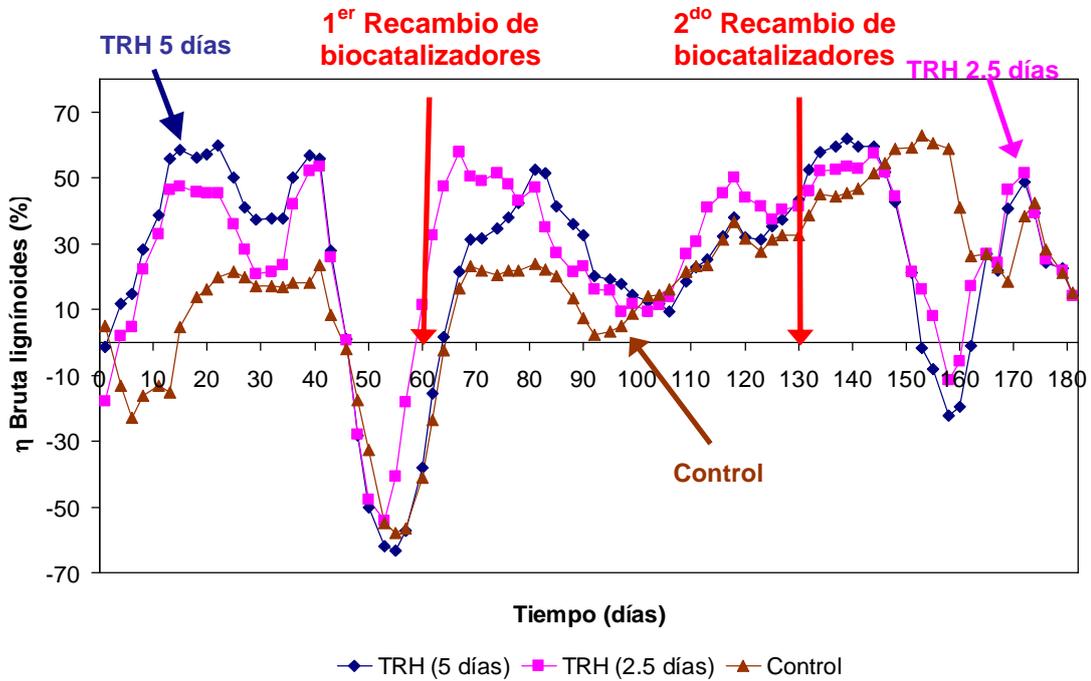


Figura 10. Dinámica de remoción Bruta de Lignínoides

Los puntos donde se observan valores negativos de las eficiencias (Fig. 9, 10 y 11), se presume una desorción de compuestos coloreados al *EAn*, ya sea por parte del soporte de aserrín o bien por el micelio, que puede en los primeros días adsorber compuestos para posteriormente desorberlos al medio, lo cual también explicaría la actividad presente en el reactor abiótico, donde fenómenos fisicoquímicos dan lugar a adsorciones y desorciones.

El efecto del TRH sobre el desempeño de los reactores no es significativo, ya que los reactores no muestra gran diferencia en la remoción de contaminantes (color y lignínoides y *DQO*) ya que estos se comportan muy parecidos, se esperaba que el reactor de TRH: 5 días mostrara una eficiencia mejor al de 2.5 días ya que este esta en un contacto mayor con el contaminante permitiéndole una remoción mayor, pero se observa claramente que el reactor de 2.5 días muestra en algunas ocasiones mejor desempeño que el otro reactor, dando opción a que se trabaje con este tipo de reactores.

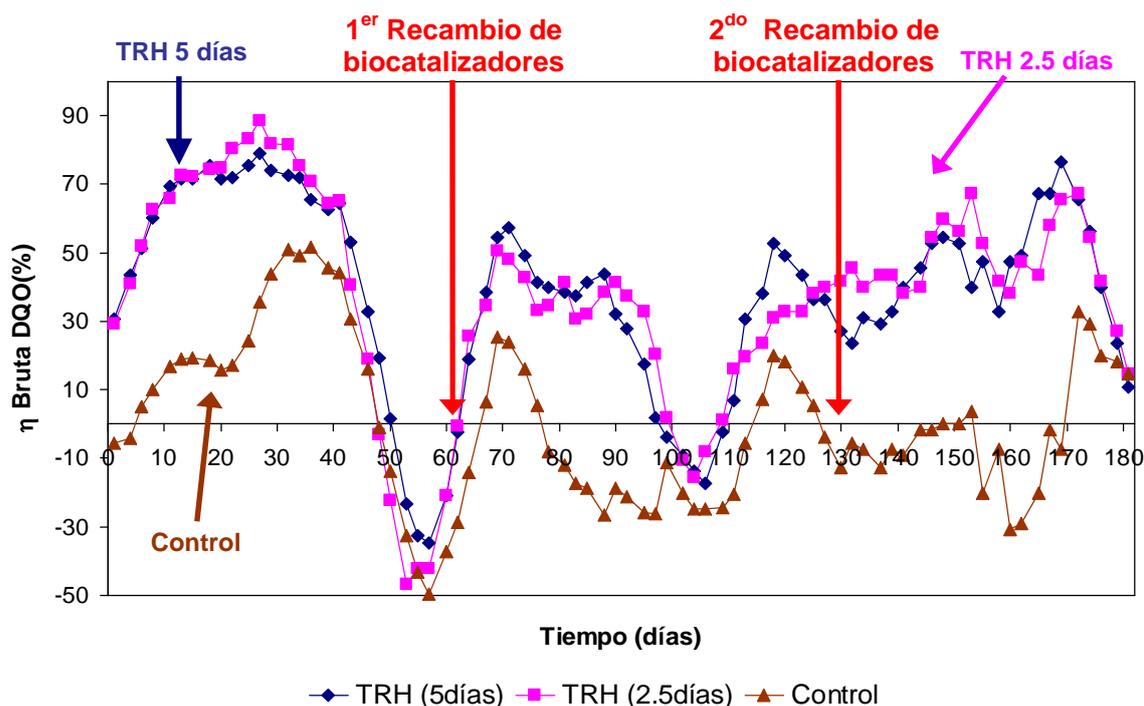


Figura 11. Dinámica de remoción Bruta de DQO

En la remoción de *DQO* se observa claramente que la eficiencia empieza a decaer aproximados los 60 días de operación del reactor, al hacer el recambio parcial de biocatalizadores se observa nuevamente la remoción de *DQO*, cuando se hace el segundo recambio de biocatalizadores acondicionados al día 130 se observa que el comportamiento de la eficiencia mejora notablemente

Tabla 10. Resultados promedio de eficiencias de remoción de contaminantes en los reactores fúngicos de lecho fluidizado

Reactor	Color			Lignínoides			DQO		
	η_{Bruta}	η_{un}	η_{sun}	η_{Bruta}	η_{un}	η_{sun}	η_{Bruta}	η_{un}	η_{sun}
RLF con estrategia de reactivación a TRH 5 días	61.01± 0.50	16.65± 0.85	9.28E-5 ± 2.69E-6	24.94± 0.93	7.62± 1.18	6.07E-5± 3.95E-6	38.71± 15.49	39.24± 25.39	2.89E-4± 1.87E-4
RLF con estrategia de reactivación a TRH 2.5días	61.69± 0.53	17.32± 0.69	1.00E-4± 2.42E-6	26.66± 0.49	9.34± 0.79	7.07E-5± 2.33E-6	38.41± 10.93	38.00± 16.23	2.77E-4± 1.19E-4
RLF sin estrategia de reactivación a TRH 5 días	46.89± 0.88		3.20E-4± 6.01E-6	48.83± 1.60		2.80E-4± 3.00E-6	48.35± 4.08		3.20E-4± 3.00E-5

El comportamiento del reactor con un TRH de 5 días y el de 2.5 días no muestra gran diferencia, solamente en la remoción de color en el de 2.5 días.

Los resultados mostrados en la tabla 10 muestran una mejora en la remoción de color, no así la de lignínoides y DQO, respecto a la operación del biorreactor sin recambio de pellets

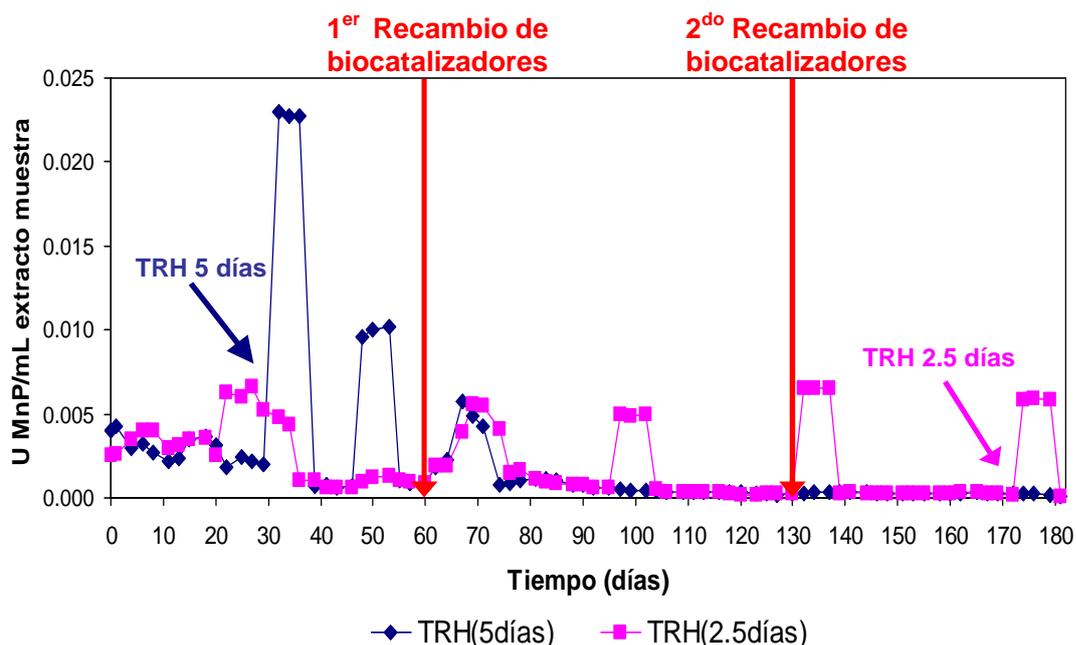


Figura 12. Dinámica de actividad de la enzima Manganosperoxidasa

Para las actividades enzimáticas se observa un comportamiento parecido que en la de las remociones de contaminantes.

Una de las enzimas con mayor cantidad es la *MnP*, esta enzima se mantiene presente durante los 181 días de operación del reactor, se nota como la concentración de la enzima disminuye al día 60, implementando la estrategia de recambio de biocatalizadores la actividad aumenta y disminuye pasando unos días manteniéndose constante.

Al hacer el segundo recambio con biocatalizadores acondicionados al día 130, se esperaba que la concentración de la enzima aumentara, no fue así pero se logro mantener constante la presencia de la enzima hasta el día 181, como se ve en la figura 11 el reactor de TRH 2.5 días se ve por muy poco superado por el reactor de TRH de 5 días, arrojando como resultado que es mas factible trabajar con el reactor de TRH de 2.5 días de operación.

Las actividades se expresaron de la siguiente manera:

La de mayor concentración fue Proteasas, seguida de *MnP*, después fue Lacasa y por ultimo *LiP* (Tabla 11), esto se debe a que el hongo *Tv* produce en mayor cantidad las proteasas y estas tienden a inhibir a las demás enzimas, mostrándose más susceptible a las proteasas la Lacasa y *LiP*.

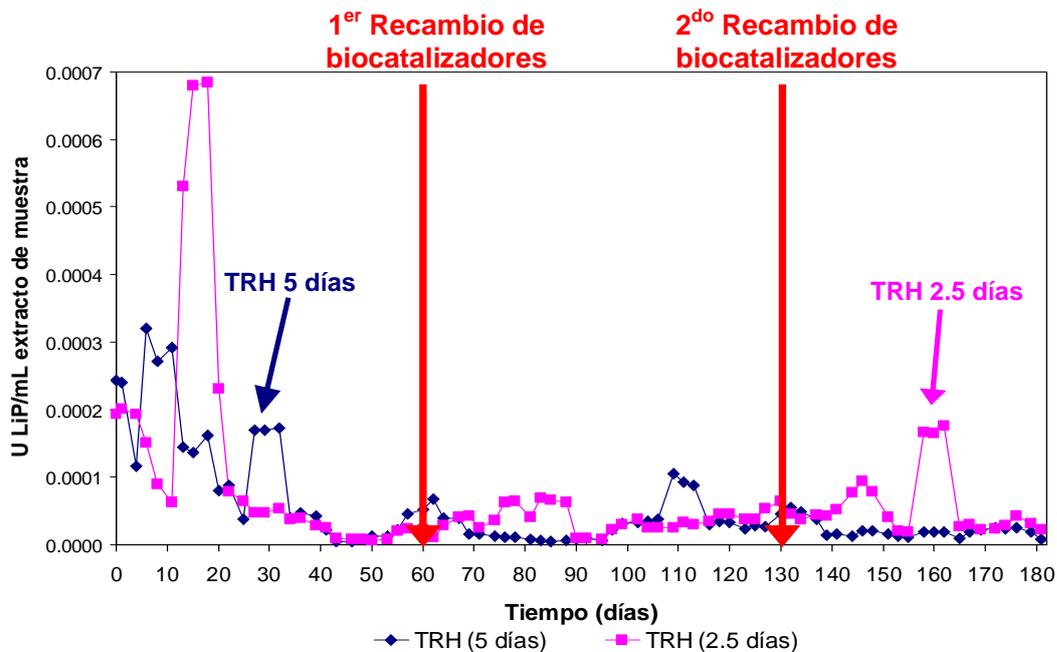


Figura 13. Dinámica de actividad de la enzima Ligninoperoxidasa

La actividad de *LiP* se comporta parecidamente a la de *MnP*, hay mayor presencia de enzima al principio pero baja su concentración, aunque esta enzima es la que se expreso en menor cantidad también se mantuvo presente durante los 181 días de operación del reactor.

El efecto del segundo recambio con biocatalizadores acondicionados al día 130, permite que esta enzima aumente su concentración y que se mantenga presente hasta el final del experimento.

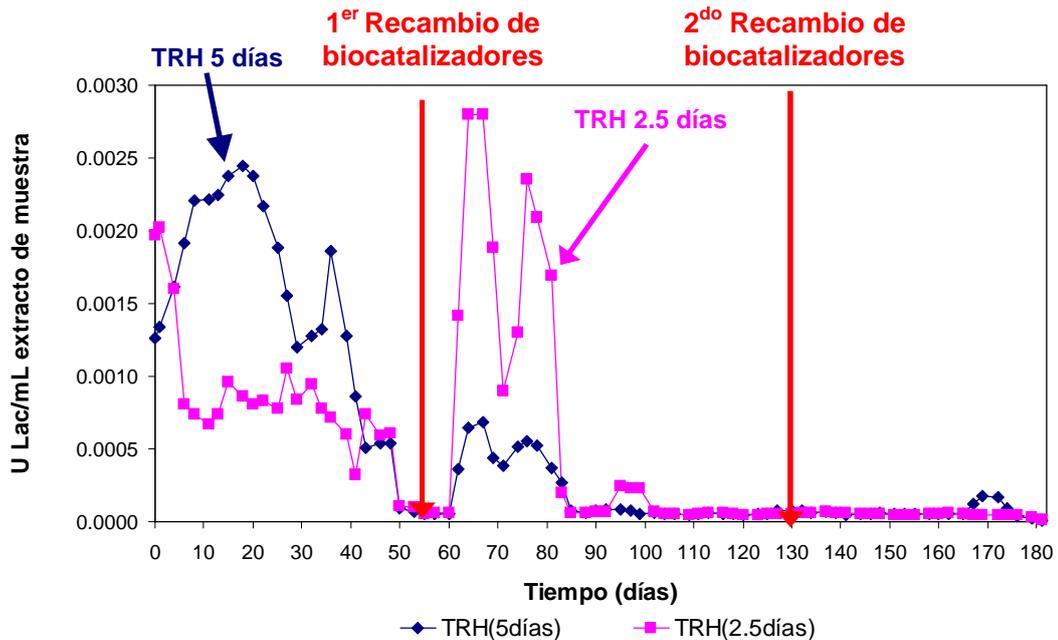


Figura 14. Dinámica de actividad de la enzima Lacasa

La actividad de la enzima Lacasa es la tercera con mayor concentración, al día 60 se nota como decae su concentración, haciendo el recambio de biocatalizadores se puede apreciar como tiende a aumentar pero nuevamente vuelve a decaer, al día 130 cuando se hace el recambio con biocatalizadores acondicionados la concentración no aumenta pero si se mantiene constante hasta el día 181.

Se nota al igual que en las actividades pasadas que el reactor con TRH de 2.5 días de operación es más eficiente que el reactor de TRH de 5 días.

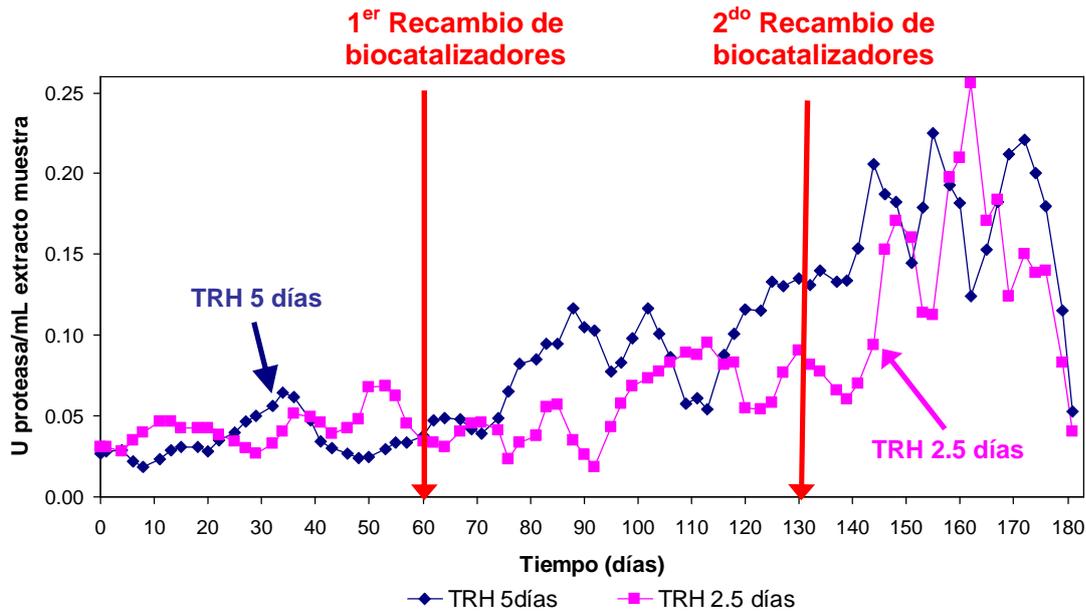


Figura 15. Dinámica de actividad de la enzima Proteasas

La enzima Proteasas fue la que se expresó en mayor cantidad durante los 181 días de operación del reactor, esta enzima muestra un comportamiento diferente al de las otras, ya que esta al principio se expresa en bajas cantidades, pasando los primeros 60 días de operación tiende a aumentar y al día 130 cuando se hace el segundo recambio con biocatalizadores acondicionados aumenta su concentración.

Tabla 11. Resultados de promedios de actividades enzimáticas de MnP, LiP, Lacasa y Proteasas

Enzima	TRH (5 días) Actividad (U /mL)	TRH (2.5 días) Actividad (U /mL)
Manganeso peroxidasa	2.32E-03 ± 9.40 E-04	2.12E-03 ± 9.75E-04
Lignino peroxidasa	1.26E-04 ± 3.12E-05	1.08E-04 ± 1.51E-05
Lacasa	5.42E-04 ± 1.5 E-04	5.14E-04 ± 1.96E-04
Proteasas	9.05E-02 ± 8.25E-03	7.22E-02 ± 8.54E-03

Las actividades en los diferentes TRH muestran un comportamiento muy parecido en el reactor de 5 días y en el de 2.5 días de operación.

Las cuatro enzimas (MnP, LiP, Lac y Proteasas) siempre estuvieron presentes durante los 181 días de operación del reactor, aunque las que estuvieron en mayor concentración fueron Proteasas y MnP, Lac y LiP fueron las que se expresaron en menor cantidad durante los 181 días de operación del reactor.

Tabla 12. Procesos de tratamiento de aguas en reactores que utilizan hongos basidiomicetos

Reactor	m.o	Condiciones	Periodo activo	Efluente	Eficiencia de Remoción		Referencia
RLF(1)	<i>Lentinus edodes</i>	Sin maltosa AlgCa	14 días	Licor Negro Diluido (EICP)	η_{sun} Color:0.00073±0.073. Lig:0.0005 ± 0.0005	$\eta_{sun}(\%)$ Color:42±14 Lig:59±14	Ramírez Canseco et al., (2000)
RLF(2)	<i>Lentinus edodes</i>	Choques con maltosa 10000 mg/ L cada 8 días AlgCa	35 días	Licor Negro Diluido (EICP)	η_{sun} Color:0.0012±0.11 Lig:0.0009±0.0008	$\eta_{un}(\%)$ Color:66±16, Lig:65±15	Ramírez Canseco et al., (2000)
RLF(3)	<i>Lentinus edodes</i>	3000 mg/ L maltosa continua AlgCa	64 días	Licor Negro Diluido (ICP)	η_{sun} Color: 0.21±0.18 Lig:0.001±0.0008	$\eta_{un}(\%)$ Color:68±15 Lig:59±14	Ramírez Canseco et al., (2000)
RLE	<i>Trametes versicolor</i> (biocubos)	Sin fuente de carbono soluble, TRH 5 y 2.5 días	90 días	EAn (ICP)	η_{sun} Color:0.0004±1E-4 Lig:0.0003±1E-4 DQO:0.0004±2E-4	$\eta_{un}(\%)$ Color:52.42±21 Lig:38.68±18 DQO:43.42±24	Ortega-Clemente et al.,(2003)
RLF	<i>Lentinus edodes</i> (biocubos)	Sin fuente de carbono soluble, TRH 5 días	60 días	EAn (ICP)	η_{sun} Color:0.00012±1E-4 Lig:0.00003±1E-5 DQO:0.0003±6E-5	$\eta_{un}(\%)$ Color:23.36±13 Lig:3.32±15 DQO:39.49±16	Marín-Mezo et al.,(2003)
RLF	<i>Trametes versicolor</i> (pellets híbridos)	Sin fuente de carbono soluble, TRH 5 días	100 días	EAn (ICP)	η_{sun} Color: 0.00032 ± 6E-6 Lig: 0.00028 ± 3E-6 DQO: 0.00032 ± 3E-5	$\eta_{Bruta}(\%)$ Color:46.89±0.88 Lig:48.83±1.6 DQO:48.35±4.08	Ortega-Clemente – Gamboa Suasnavart (2005-2006)
RLF	<i>Trametes versicolor</i> (pellets híbridos)	Sin fuente de carbono soluble, estrategia de recambio parcial de pellets cada 60 días, TRH 5 días	181 días	EAn (ICP)	η_{sun} Color: 9.28E-5±2.69E-6 Lig: 6.07E-5±3.95E-6 DQO: 2.89E-4±1.87E-4	$\eta_{Bruta}(\%)$ Color:61.01±0.50 Lig:24.94±0.93 DQO:38.71±15.49	Ortega-Clemente – Vargas-Gallegos (2006-2007)
RLF	<i>Trametes versicolor</i> (pellets híbridos)	Sin fuente de carbono soluble, estrategia de recambio parcial de pellets cada 60 días, TRH 2.5 días	181 días	EAn (ICP)	η_{sun} Color: 1.00E-5 ± 2.42E-6 Lig: 7.07E-5±3.95E-6 DQO: 2.77E-4±1.19E-4	$\eta_{Bruta}(\%)$ Color:61.69±0.53 Lig:26.66±0.49 DQO:38.41±10.93	Ortega-Clemente – Vargas-Gallegos (2006-2007)

Para la realización del ensayo de adsorción se realizaron diluciones como se muestra en la tabla 13.

Tabla 13. Soluciones de efluente anaerobio y efluente anaerobio diluido

No.	EAn (mL)	Agua destilada (mL)		
1	100	0		
2	80	20	4 + 1	4:5
3	60	40	3 + 2	3:5
4	50	50	1 + 1	1:2
5	40	60	2 + 3	2:5
6	20	80	1 + 4	1:5
7	10	90	1 + 9	1:10

Tabla 14. Datos de matraz 7 (0 mL de agua destilada + 50 mL de efluente anaerobio)

Muestra	tiempo (horas)	Promedio Abs	C (mgCIPt/L)	q	Volumen (L)	Masa seca
1	0	0.2273	2210.4	0.0000	0.050	45
2	12	0.2264	2202.1	0.0088	0.048	45
3	24	0.2251	2189.0	0.0219	0.046	45
4	48	0.2238	2176.3	0.0333	0.044	45
5	72	0.2211	2150.5	0.0558	0.042	45
6	96	0.2191	2131.1	0.0881	0.040	36
7	120	0.2145	2086.3	0.1309	0.038	36
8	144	0.2092	2034.3	0.1761	0.036	36
9	168	0.2053	1996.4	0.2021	0.034	36

Se realizaron 7 ensayos, la tabla 14 muestra solo el ensayo 7 ya que este es el que presenta la mayor concentración de *EAn*, se realizó la gráfica de q vs t , y se ajustaron al modelo hiperbólico de Freundlich todas las Muestras 9 a 7 días de adsorción de cada ensayo.

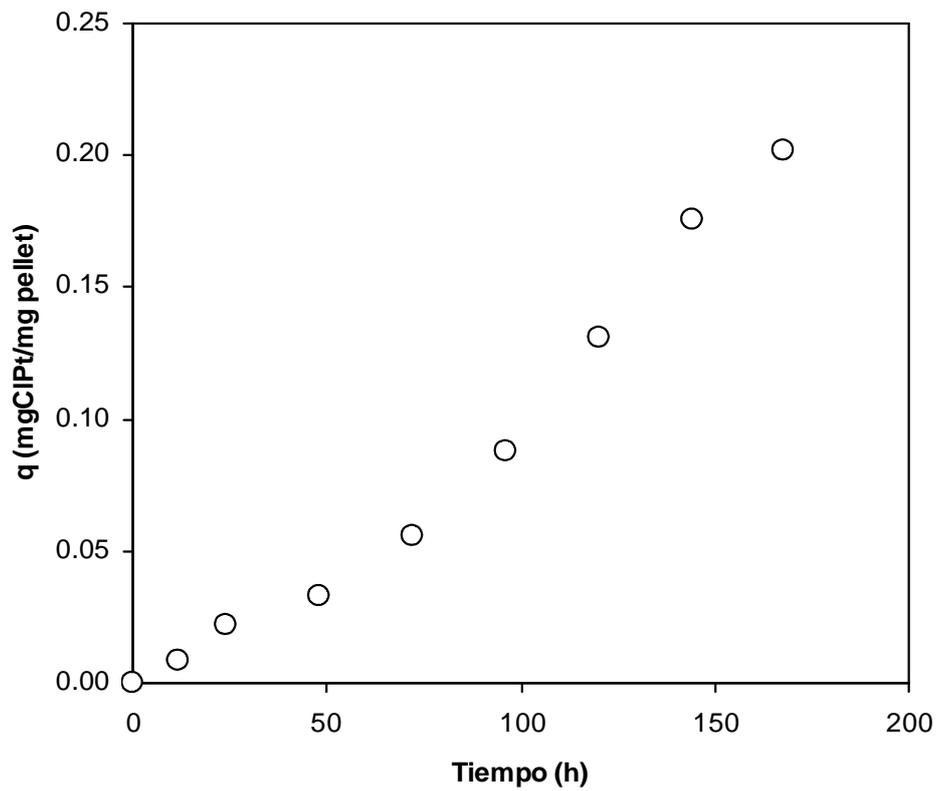


Figura 16. Dinámica de color adsorbido sobre pellets híbridos estériles

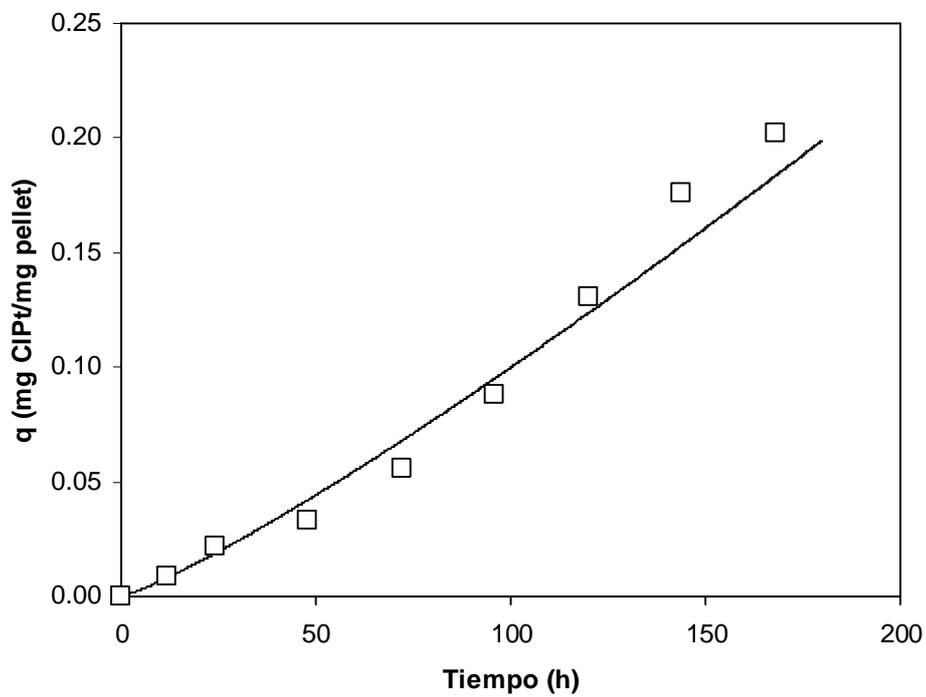


Figura 17. Ajuste de la dinámica de color adsorbido sobre pellets híbridos estériles

La figura 17 muestra el ajuste dinámico de q vs t para efluente anaerobio 100%, orden mixto m, la ecuación fue la siguiente.

$$q = k_o * t^m, \text{ donde:} \quad [4]$$

$$K_o = 0.00045$$

$$m = 1.173$$

Por lo tanto la ecuación queda de la siguiente manera.

$$q = 0.00045 * t^{1.173}; r = 0.98 \quad [5]$$

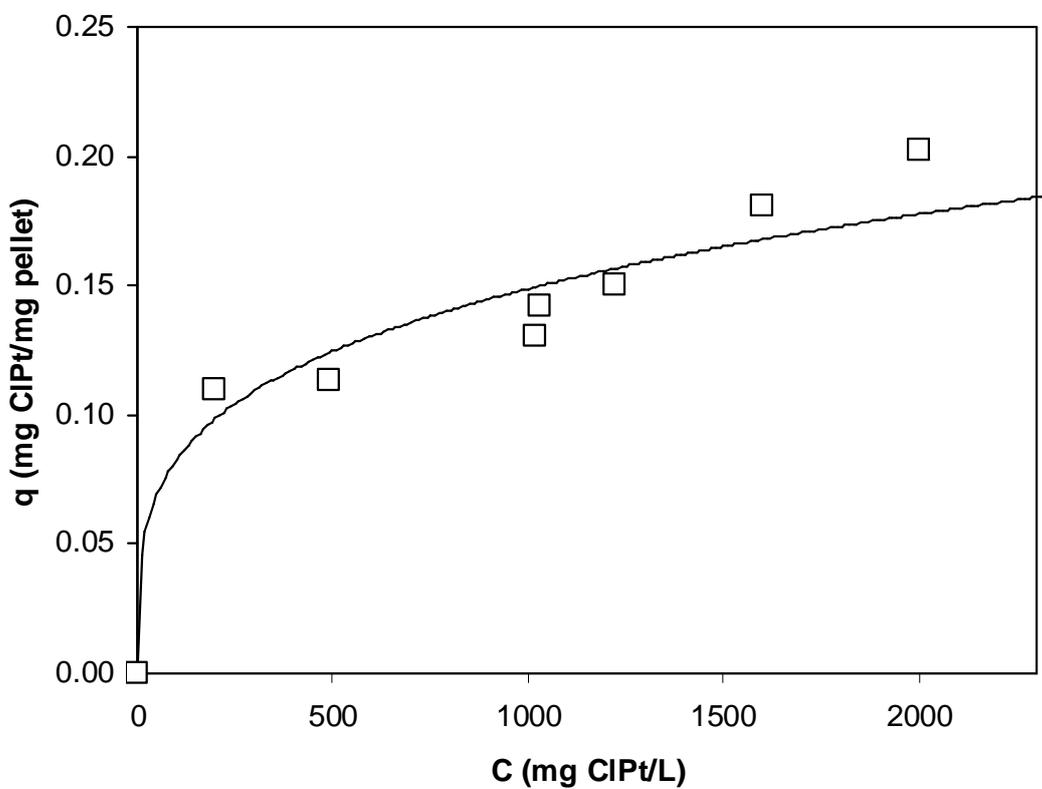


Figura 18. Modelo hiperbólico de Freundlich para la adsorción de color en pellets híbridos estériles al 7º día

La figura 18 muestra que el isoterma de adsorción se ajusta al modelo hiperbólico de Langmuir, para realizar este isoterma se tomaron todas las muestras 9 a 7 días de adsorción y se describe con la siguiente ecuación:

$$q = 0.0254 * C^{0.2562}; r = 0.89 \quad [6]$$

7. CONCLUSIONES

Efecto de la estrategia:

- Al día 60 (primer recambio de biocatalizadores) se observa un incremento en las remociones de Color, Lignínoides y *DQO*, superando la baja de desempeño entre los días 40 – 60
- Al segundo recambio de pellets con biocatalizadores acondicionados se comprueba que las actividades se mantienen constantes permitiendo que el tiempo de operación del reactor se prolongue hasta 181 días.
- El recambio con biocatalizadores acondicionados es más favorable que el recambio con biocatalizadores no acondicionados.
- Las remociones brutas para el reactor de TRH de 5 días fueron de:
Color $61.01 \pm 0.50\%$, Lignínoides $24.94 \pm 0.93\%$, y *DQO* $38.71 \pm 15.49\%$, para el reactor de TRH de 2.5 días fueron de: Color $61.69 \pm 0.53\%$, Lignínoides $26.66 \pm 0.49\%$, *DQO* $38.41 \pm 10.93\%$.
- La estrategia de recambio de biocatalizadores mejora la remoción de Color, no así la de Lignínoides y *DQO*, respecto a la operación del biorreactor sin recambio de pellets.
- La dinámica de adsorción de color del *EAn* acondicionado expresado en mg/mg de cloroplatinato de potasio sobre pellets híbridos sigue un comportamiento potencial respecto al tiempo, con la ecuación $q=0.00045*t^{1.173}$, con $r =0.98$
- La isoterma de adsorción de color del *EAn* acondicionado ajustó razonablemente bien al modelo hiperbólico de Freundlich expresado en mg/mg de cloroplatinato de potasio sobre pellets híbridos con la ecuación $q=0.0254*C^{0.256}$, con $r =0.89$

- No hay un efecto significativo del TRH sobre el desempeño de los biorreactores
- Al primer recambio de biocatalizadores (día 60) existe una fase de adaptación, caso contrario al del segundo recambio (día 130) ya que el pellet entra acondicionado al reactor.
- Se preferiría trabajar en un futuro con un reactor de TRH de 2.5 días ya que presenta comportamiento parecido a uno de uno de 5 días
- No se agregó ninguna fuente de carbono soluble al medio, manteniéndose presentes las actividades enzimáticas durante los 181 días de operación de los reactores.

8. REFERENCIAS

- Addleman, K.; Dumonceaux, T.; Paice, M.G.; Bourbonnais, R.; Archibald, F.S. (1995). "Production and characterization of *Trametes versicolor* Mutants unable to bleach hardwood kraft pulp". *Applied and Environmental Microbiology*. 18-24
- Adler E. (1977), "Lignin chemistry: past, present and future". *Wood Sci. Technol.* **11**: 169-218
- Bonnarme P.I.; Delattre M.I.; Corrieu G.; Asther M., (1991) Peroxidase secretion by Pellets or Inmovilized Cells of *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 and INA 12 Relation to Organelle Content. *Enzyme Microbiology Technology* **13**:727-733.
- Cornwell, K.L.; Tinland-Butez, M.F.; Tardone, P.J.; Cabasso I.; 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.
- Cserjesi J. (1967) The adaptation of fungi to pentachlorophenol and its biodegradation. *Can J Microbiol.* 1967 Sep; **13**(9):1243-9.
- Esposito, E.; Vanderlei, P.; Duran N. (1991). "Screening of lignin- degrading fungi for removal of color from Kraft mill wastewater with no additional extra carbon-source". *Biotechnol. Lett.* **11**:125-129
- Estrada-Vázquez C. (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
- Hernández-Touset J.P.; García-Rodríguez A.; Cañizarez-García J.C.; Pérez-Lugo A. (2002). "Evaluación tecnológica del esquema de aguas en planta de fabricación de papel, utilizando métodos de integración de masa". Iberoamerican Congress on Pulp and Paper Research.
- Livernoche D.; Jurasek L.; Desrochers M.; Dorica J. (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.
- Mansilla-Héctor D.; Lizama C.; Gutarra A.; Rodríguez J. (2000). "Tratamiento de residuos líquidos de la industria de celulosa y textil". *Wood Sci. Technol.* **9**: 142-163
- Paszczynski Andrzej; Huynh Van-Ba and Crawford Ronald. (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, H. M. (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, H. M. (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 S. A. (2000). "Desarrollo de un reactor de lecho fluidizado, con hongos ligninolíticos inmovilizados para el tratamiento de efluentes industriales". Tesis de maestría, Dpto. Biotecnología, Bioingeniería, CINVESTAV, México
- Roy-Arcand F.; Archibald S. (1993) Effect of time, daylight, and settling pond microorganisms on the high molecular weight fraction of kraft bleachery effluents *Water Research*, **27**(5): 873-881
- Wingate K. G.; Trevor S.; Shawn D. M. * (2005) Colour remediation of pulp mill effluent using purified fungal cellobiose dehydrogenase: Reaction optimisation and mechanism of degradation. *Biotechnology and Bioengineering* **90**(1): 95-106
- Yadav. Z.; Reddy C. A.; Rasooly A. (1991) Cloning of several lignin peroxidase (LIP)-encoding genes: sequence analysis of the *LIP6* gene from the white-rot basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium* Gene, *Biotechnology and Bioengineering*. **97**(2):191-198

9. ANEXOS

9.1 Protocolo de dinámica de Adsorción

Protocolo ensayo de dinámica de adsorción

Jesús Vargas-Gallegos y Héctor M. Poggi-Varaldo
Grupo de Biotecnología Ambiental,
CINVESTAV, 2007

La sorción o adsorción es la transferencia selectiva de uno o más solutos de una fase fluida a un lote de partículas sólidas. En general, la adsorción incluye la acumulación de moléculas de solutos en una interfase. La acumulación por unidad de área es pequeña; por consiguiente, se prefieren los sólidos altamente porosos con áreas internas muy grandes por unidad de volumen. Los adsorbentes son materiales naturales o sintéticos de estructura amorfa o microcristalina. Los utilizados en gran escala incluyen el carbón activado, la alúmina activada, el gel sílice, entre otros. Los principales usos de la adsorción en fase líquida incluyen: 1. la decoloración, el teñido o el desengomado de combustibles y lubricantes, disolventes orgánicos y aceites vegetales y animales. 2. la recuperación de productos químicos biológicos procedentes de caldos fermentativos o extractos de plantas. 3. la clarificación de alimentos y los productos farmacéuticos. 4. la purificación de los efluentes de proceso para control de la contaminación, entre otros.

La eliminación de color en aguas residuales es hoy uno de los principales problemas de la industria textil, la industria de la celulosa y papel entre otras. La adsorción con carbón activado es el tratamiento que elimina color con altas eficiencias pero es un proceso caro. La biomasa de una variedad de microorganismos incluyendo bacterias, hongos y algas es capaz de adsorber y acumular muy diversos compuestos (Aretxaga *et al.*, 2001). Los procesos con sistemas biológicos han tenido mayor atención debido a su bajo costo y por ser ambientalmente amigables.

La adsorción y desorción de contaminantes juegan un papel muy importante en el transporte y la disponibilidad de contaminantes en suelos y sedimentos. También son la base para medir, diseñar y operar otros procesos de interés ambiental tales como la remoción de compuestos tóxicos y materia orgánica recalcitrante de efluentes líquidos y gaseosos (Poggi-Varaldo *et al.*, 2002)

El agua modelo es el efluente proveniente de un tratamiento anaerobio de licor diluido, llamado efluente anaerobio (EAn) (Ortega-Clemente *et al.*, 2004).

Este EAn tiene un contenido de materia orgánica como DQO, color y Ligninoides, Este EAn acondicionado se ajusta a pH 4.5 con buffer de fosfatos para efectuar el ensayo de adsorción por duplicado.

El ensayo consta de colocar en matraces Erlenmeyer de 250 ml diferentes concentraciones de EAn para observar su comportamiento en color y ligninoides, por lo tanto cada matraz contiene 50 mL de EAn con 5 pellets híbridos, incubándolos a 28°C, y 100 rpm durante 7 días.

I. Propósito

Este ensayo se realizó para verificar la adsorción que se pudieran estar dando a un sistema biológico.

II. Equipo

- Matrazes Erlenmeyer de 250 mL
- Pipetas de 1 y 10 mL
- Pinzas
- Espátula
- Espectrofotómetro ultravioleta-visible
- Celda de cuarzo
- Centrifuga
- Incubadora
- Capsulas de porcelana
- Desecador
- Termómetro

III. Reactivos

- Ácido clorhídrico 1N
- Azida de sodio
- Buffer de fosfatos pH 7

IV. Procedimiento paso por paso

1. Formar pellets triples con micelio de *Trametes versicolor*, aserrín de encino, y carbón activado.

Hongo basidiomiceto y condiciones de cultivo

Se cuenta con la cepa *Trametes versicolor* (CDBB-h-1051), proveniente de la colección de cultivos microbianos del CINVESTAV-México. Para la propagación de *Tv* en medio sólido se cultivo en tubos inclinados con PDA (agar papa dextrosa) se incubaron a 28°C por 7 días. La propagación en medio líquido se realizó mediante el lavado de tubos con 10 mL de agua destilada estéril para separar el micelio crecido en los tubos. El líquido del lavado se utilizó para inocular los matraces (1 tubos por matraz) con medio micológico (MM) y se incubaron a 28°C y 100 rpm durante 7 días (Estrada-Vázquez *et al.*, 1997).

Formación de biocatalizadores (Pellets híbridos)

El tamaño promedio de la partícula de aserrín de encino (A) y carbón activado granular (CA) es menor a 250 µm. El tamaño aproximado se determinó mediante el uso de un tamaño de malla fina de 60-150. Cada unidad experimental (matraz Erlenmeyer de 250 mL) contiene 100 mL de medio modificado de inducción de formación de pellets (10.0 g/L glucosa, 2.5 g/L de peptona de soya, 1.0 g/L K₂HPO₄, 1.0 g/L KH₂PO₄, 0.5 g/L MgSO₄·7H₂O, 0.3 g/L NaCl, 1.0 g/L NH₄Cl, 0.1 g/L CaCl₂·2H₂O, 0.02 g/L Tiamina·HCl), se adiciona el soporte en una relación 15 mg de A y 15 mg de CA; se esterilizan a 121 °C por 30 minutos, dejando reposar el medio estéril con el soporte por 24 hrs. Posteriormente se inocula con 30 mg (base seca) de *Tv* y se agitan a 80 rpm a 28°C por 7 días.

2. Selección de pellets híbridos.

Se seleccionaron pellets híbridos con un diámetro aproximado de 5 mm, 5 pellets por matraz (esto en condiciones de esterilidad). Posteriormente los pellets híbridos se esterilizaron en una autoclave a 121 ° C por 1 h dejando incubar durante 24 h a temperatura ambiente.

3. Preparar soluciones diluidas de efluente anaerobio, en las proporciones de la tabla 1.

Tabla 1: Soluciones de EAn y EAn diluido

No.	EAn (mL)	Agua destilada (mL)		
1	100	0		
2	80	20	4 + 1	4:5
3	60	40	3 + 2	3:5
4	50	50	1 + 1	1:2
5	40	60	2 + 3	2:5
6	20	80	1 + 4	1:5
7	10	90	1 + 9	1:10

4. A las soluciones de la Tabla 1 y a los pellets seleccionados esterilizarlos.

5. Las soluciones esterilizadas deben ser acondicionadas a pH = 4.5 con HCl. 1 N, gota a gota. También añadirles azida de sodio en tal cantidad que dé una concentración de 500 mg/L. (por ejemplo, para 100 mL de solución, será 50 mg de azida en cada caso). Esto asegurará la esterilización.

6. Determinar la absorbancia inicial a 460 nm (absorbancia de color) para cada solución, antes de meterla a matraz. Anotar las absorbancias correspondientes en bitácora y convertir a unidades de mg cloroplatinato/L (mg CPT/L), ver Ec. 1

7. Verter 50 mL de solución en matraces de 250 mL, y cargar 5 pellets estériles. Cada solución tendrá dos matraces.

8. Incubar los matraces en una agitadora a 100 rpm y 28 °C, durante 7 días.

9. Tomar una muestra pequeña 2 mL cada 12 horas el primer día, y después una por día. A cada muestra determinarle la absorbancia de color a 460 nm de acuerdo al protocolo establecido en el grupo. Anotar las absorbancias en una Tabla (Tabla 2).

10. Al 4^{to} día, con unas pinzas estériles, retirar un pellet de cada matraz para compensar por el volumen retirado de solución. Conservar los pellets, identificarlos, separarlos y mantenerlos en refrigeración.

11. Al 7^o día, tomar la última muestra para determinar absorbancia. Cosechar los pellets de cada matraz (4) y juntar cada conjunto de 4 con el pellet que se retiró en el día 4^o, bien identificado por matraz

12. Preparar cápsulas de porcelana limpias, incineradas y enfriadas. Pesar y anotar los pesos (P1)
13. Poner los conjuntos de pellets de cada matraz en cápsulas. Anotar los pesos. (P2)
14. Poner a secar las cápsulas en estufa a 80 °C por 3 horas, y después a 103 °C durante el resto del día.
15. Enfriar las capsulas en desecador y anotar sus pesos secos. (P3).
16. Graficar C (promedio de duplicado) versus tiempo para cada tratamiento (dinámica de la concentración de color en matraz)

Graficar q (promedio) versus tiempo para cada tratamiento (dinámica de la concentración de color en pellets)

Graficar q al 7º día (promedio de duplicado) versus C al 7º día (promedio de duplicado) para los 7 tratamientos en una figura x-y, donde y = q, x = C. Es la isoterma de adsorción.

V. Cálculos

1. Se obtienen las absorbancias de cada concentración y se transforman a mg/L de cloro platinato de potasio a partir de la siguiente formula (Wingate *et al.*, 2005):

$$Cl.Pt.mg / L = \frac{9726.56}{1 \cdot (Abs)} * Absorbancia \cdot experimental \quad [1]$$

Donde:

ClPt mg/L= Concentración de cloro platinato en mg/L

Abs exp.= Absorbancia leída experimentalmente

Se grafica concentración de Cloroplatinato vs tiempo

2. Para cada matraz y para cada tiempo, calcular q (el color adsorbido en los pellets) como sigue:

$$q_t = V_{\text{solución}} * (\text{Color inicial} - \text{Color a tiempo } t) / \text{masa seca de pellets a tiempo } t \quad [2]$$

Notar que el V solución y la masa seca de pellets disminuye a tiempo 4 días.

3. La masa seca de pellets para los primeros cuatros días, se calcula como sigue:

$$\text{Masa seca de pellets} = P3 - P1 \quad [3]$$

VI Referencias

- Aretxaga, A., Romero, S., Sarra, M., Vicent, T. 2001. Adsorption step in the biological degradation of a textile dye. *Biotechnol. Progress* 17:664-668.
- Estrada Vázquez, Carlos. (1997). Postratamiento de efluentes industriales pretratados anaeróbicamente. Tesis de maestría, Depto. Biotecnología, Bioingeniería, CINVESTAV.
- Ortega-Clemente, A. (2004) Propuesta doctoral. Depto de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV del IPN.
- Poggi-Varaldo, H. M., Rinderknecht-Seijas, N., Caffarel-Méndez, S. (2002). Irreversibilidad en el comportamiento adsorptivo-desorptivo de contaminantes en suelo y sedimentos: evaluación cuantitativa por medio de un coeficiente de histéresis diferencial. *Interciencia*. 27(4), 180-185.
- Wingate K. G., Stuthridge, T. , Mansfield S.D. (2005) Color remediation of pulp mill effluent using purified fungal cellobiose dehydrogenase: Reaction optimization and mechanism of degradation. *Biotechnol. Bioeng.*90:95-106

9.2 Figuras de dinámica de adsorción a todas las concentraciones

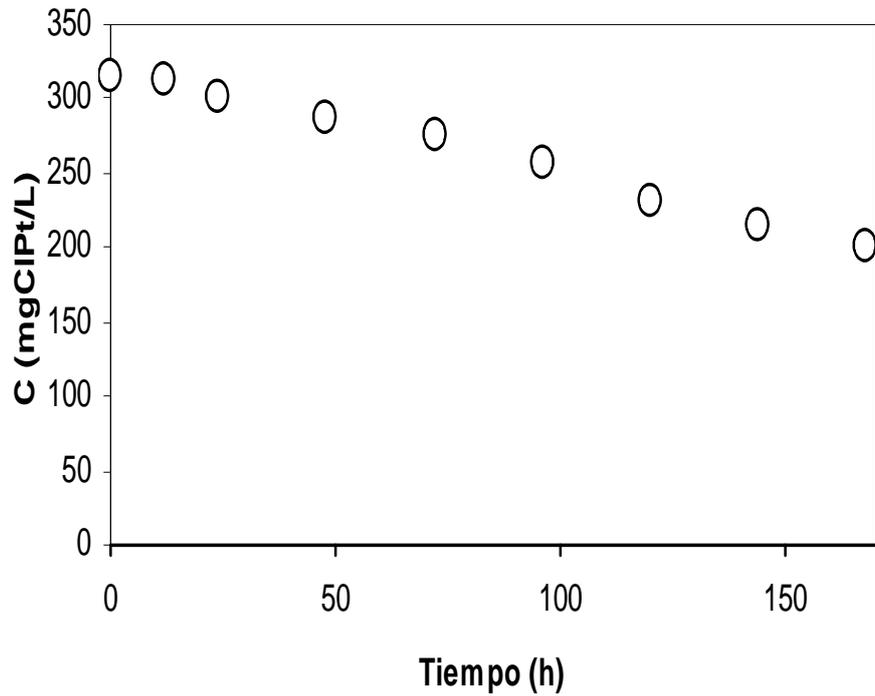


Figura 1. C vs tiempo del ensayo con 45 mL de agua destilada + 5 mL de efluente anaerobio

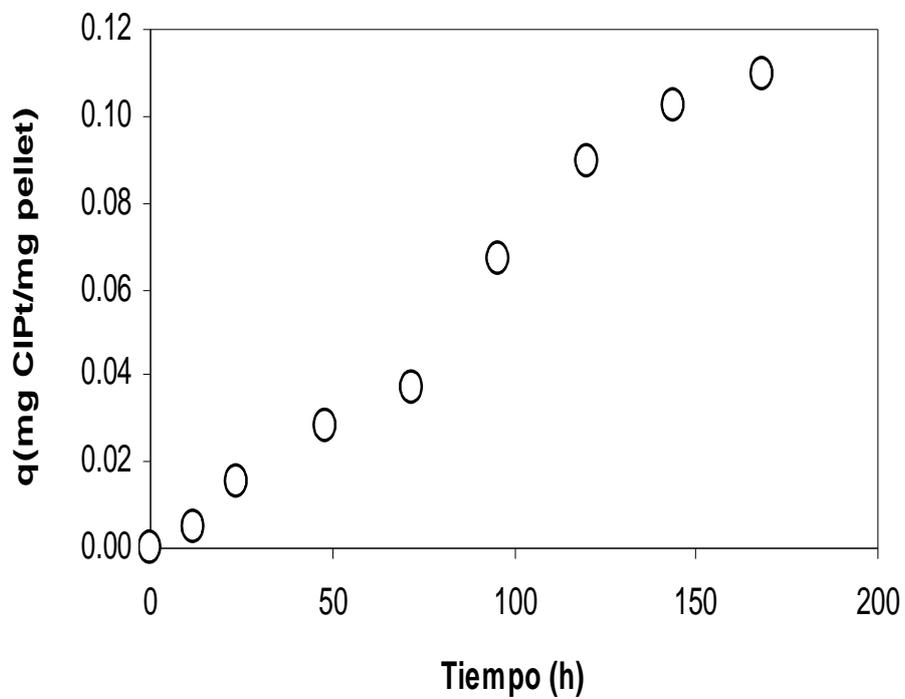


Figura 2. q vs tiempo del ensayo con 45 mL de agua destilada + 5 mL de efluente anaerobio

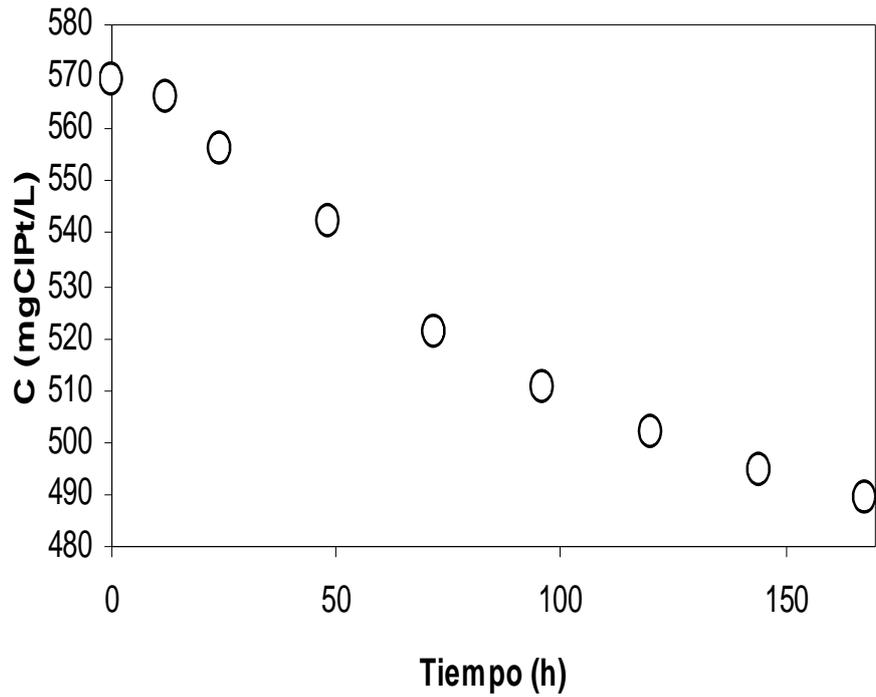


Figura 3. C vs tiempo del ensayo con 40 mL de agua destilada + 10 mL de efluente anaerobio

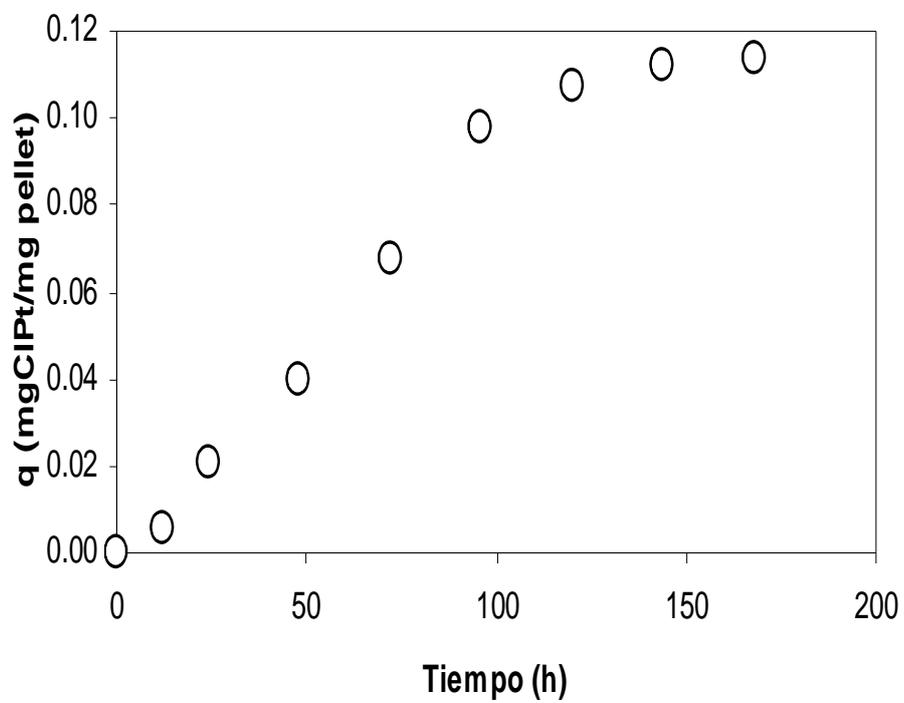


Figura 4. q vs tiempo del ensayo con 40 mL de agua destilada + 10 mL de efluente anaerobio

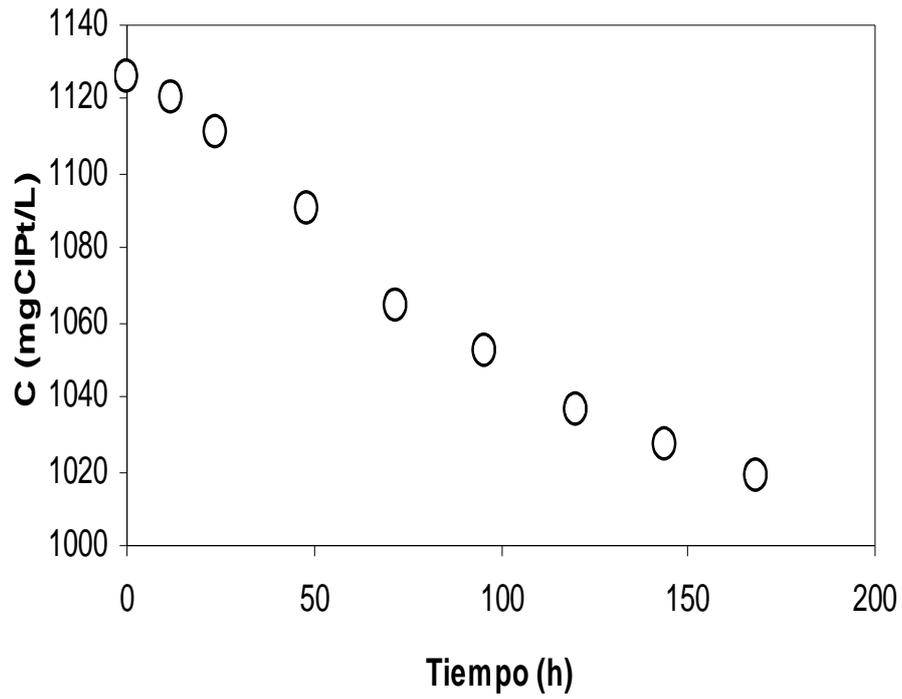


Figura 5. C vs tiempo del ensayo con 30 mL de agua destilada + 20 mL de efluente anaerobio

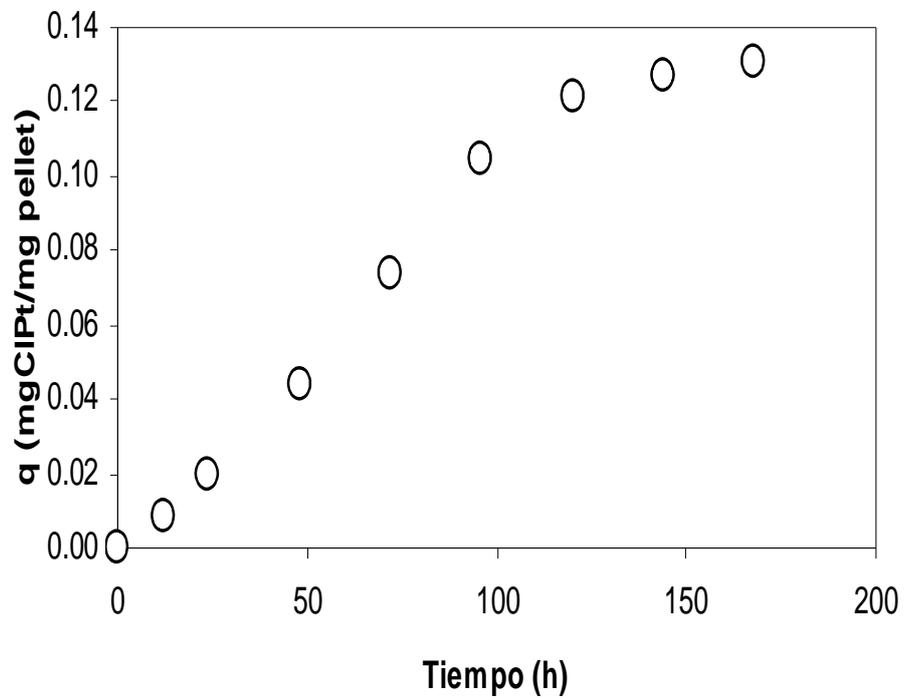


Figura 6. q vs tiempo del ensayo con 30 mL de agua destilada + 20 mL de efluente anaerobio

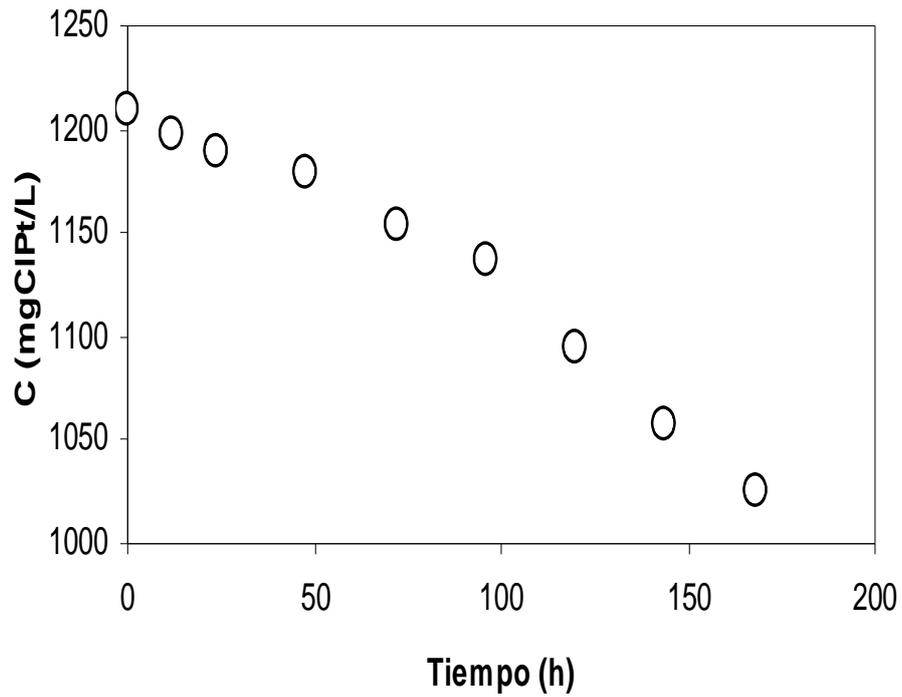


Figura 7. C vs tiempo del ensayo con 25 mL de agua destilada + 25 mL de efluente anaerobio

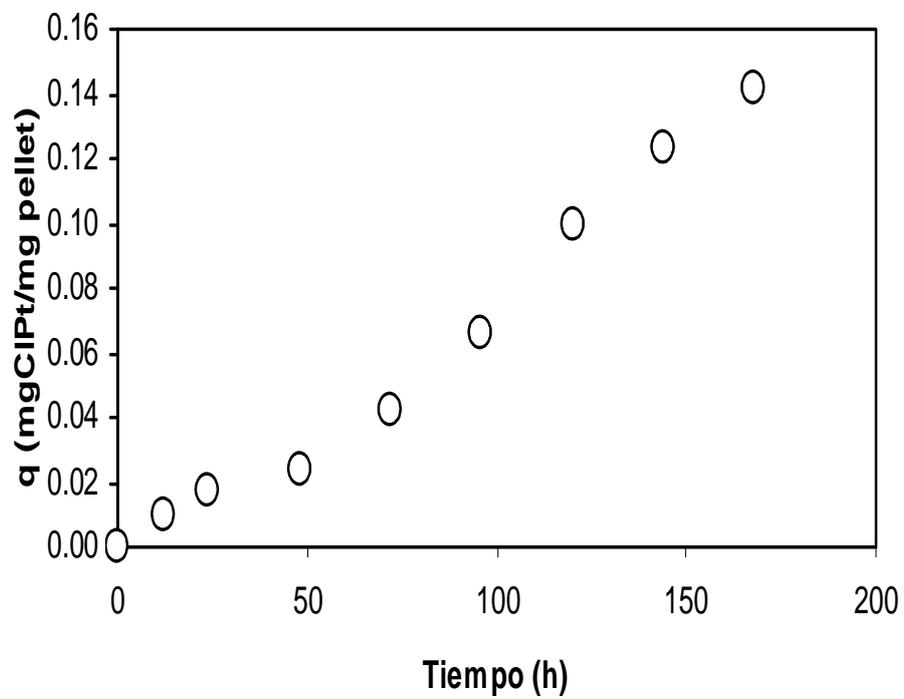


Figura 8. q vs tiempo del ensayo con 25 mL de agua destilada + 25 mL de efluente anaerobio

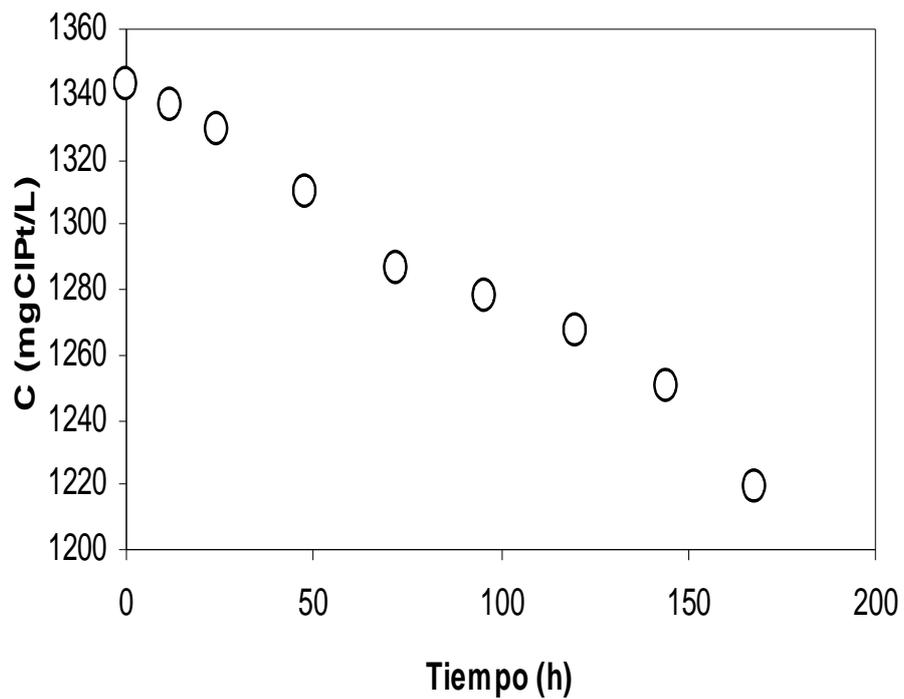


Figura 9. C vs tiempo del ensayo con 20 mL de agua destilada + 30 mL de efluente anaerobio

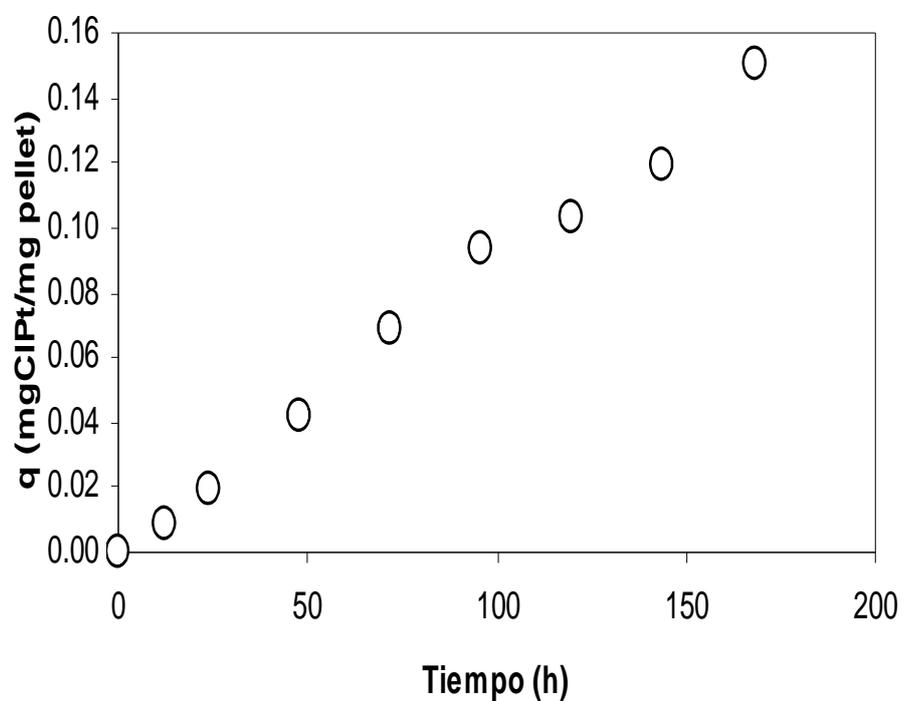


Figura 10. q vs tiempo del ensayo con 20 mL de agua destilada + 30 mL de efluente anaerobio

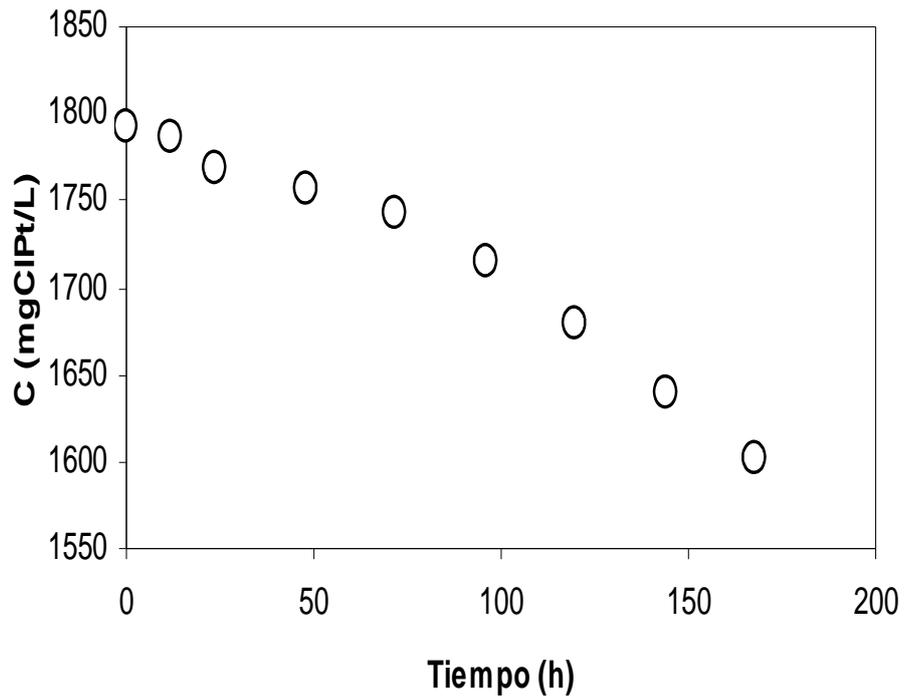


Figura 11. C vs tiempo del ensayo con 10 mL de agua destilada + 40 mL de efluente anaerobio

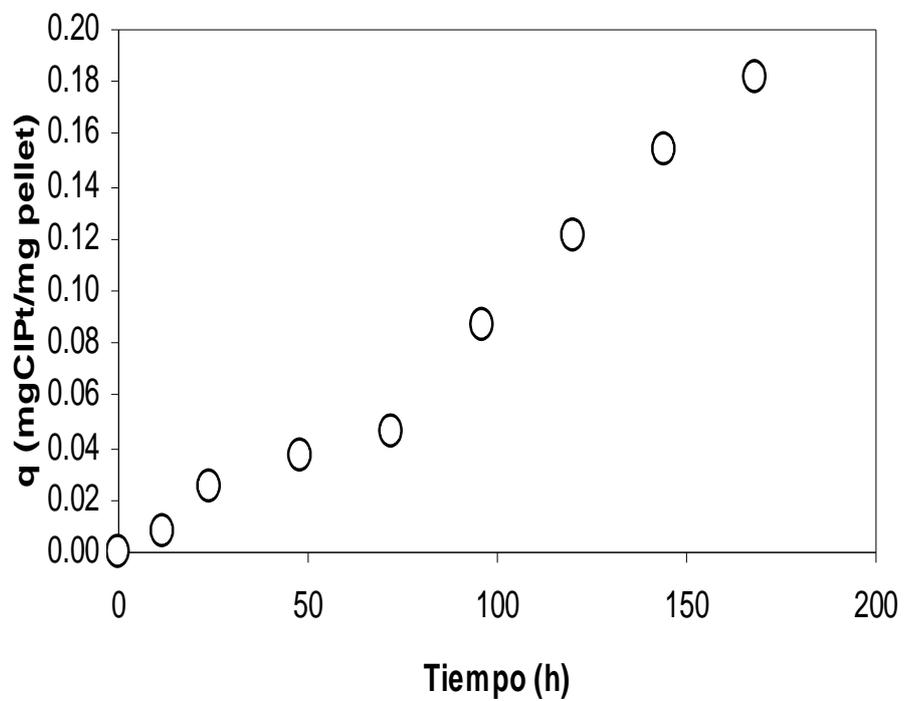


Figura 12. q vs tiempo del ensayo con 10 mL de agua destilada + 40 mL de efluente anaerobio

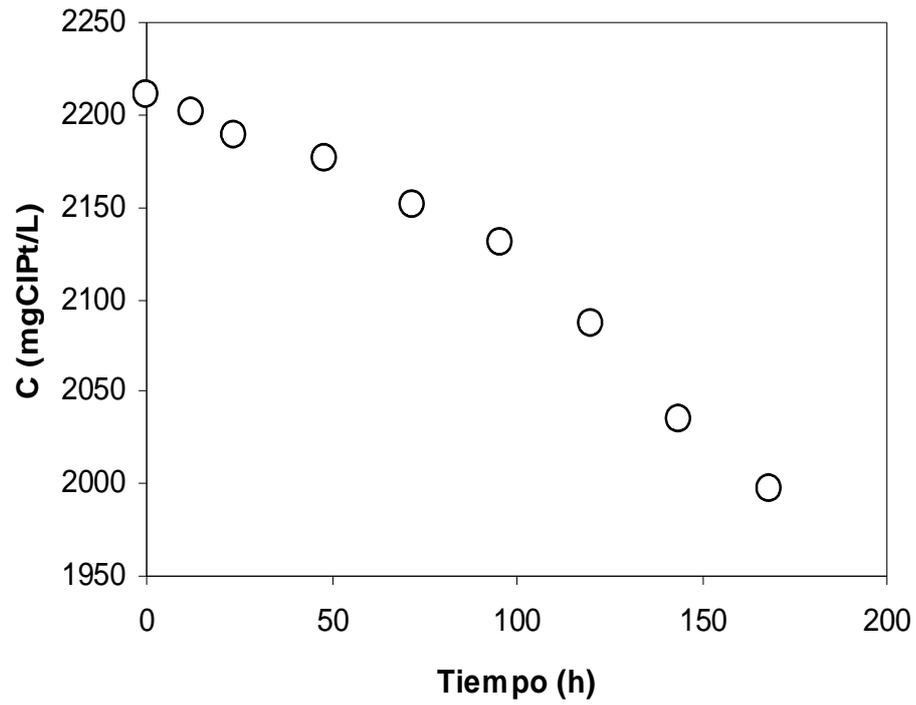


Figura 13. C vs tiempo del ensayo con 0 mL de agua destilada + 50 mL de efluente anaerobio

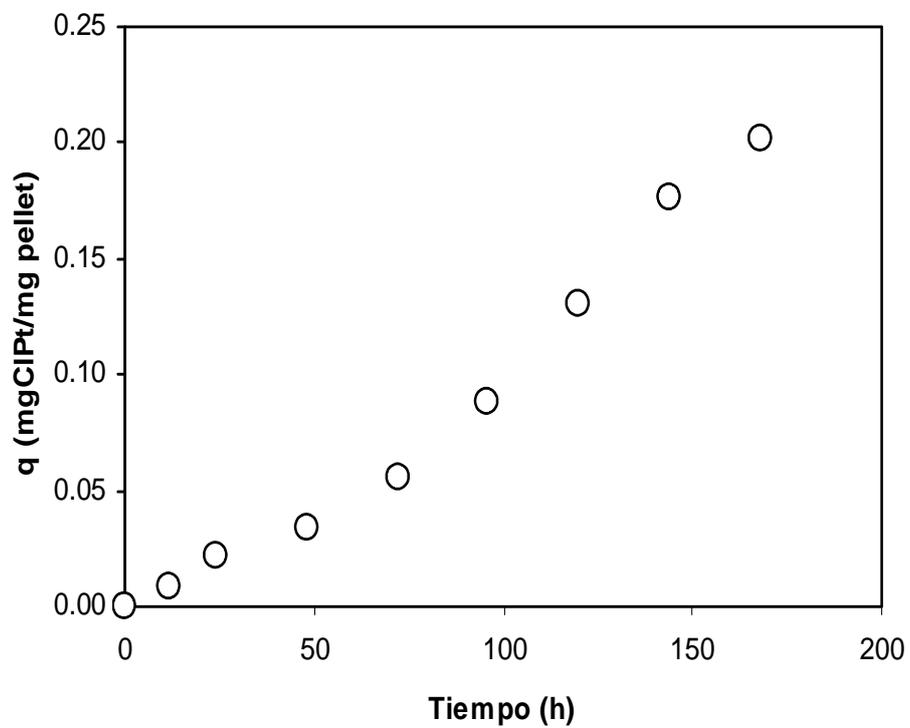


Figura 14. q vs tiempo del ensayo con 0 mL de agua destilada + 50 mL de efluente anaerobio