

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa



Casa abierta al tiempo

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

**“Decoloración del índigo carmín por medio de una estrategia basada en
el cultivo sólido de *Fomes* sp. EUM1”**

T E S I S

Presentada como requisito para obtener el grado de

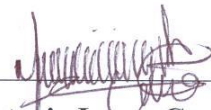
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta:

Jazmín Edith Méndez Hernández

Director de tesis

Dr. Octavio Loera Corral



Dr. Octavio Loera Corral

Asesores:

Dra. Florina Ramírez Vives

Dra. María Myrna Solís Oba

México D.F Julio de 2010

**La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está
incluida en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con
la referencia 001465.**

México D.F. a 12 de Julio de 2010

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**“DECOLORACIÓN DEL ÍNDIGO CARMÍN POR MEDIO DE UNA
ESTRATEGIA BASADA EN EL CULTIVO SÓLIDO DE *Fomes* sp. EUM1”**

que presentó:
Jazmín Edith Méndez Hernández

Comité Tutorial:

Director: Dr. Octavio Loera Corral. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesor: Dra. Florina Ramírez Vives. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesor: Dra. María Myrna Solís Oba. Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada.
IPN

Jurado:

Presidente: Dr. Sergio Huerta Ochoa (UAM-I)_____

Secretario: Dra. Florina Ramírez Vives (UAM-I)_____

Vocal: Dra. Suyen Rodríguez Pérez (Univ. de Oriente, Cuba)_____

Vocal: Dr. Francisco José Fernández Perrino (UAM-I)_____

Agradecimientos

Antes que nada, gracias a Dios por darme la vida y por estar conmigo en todo momento.

Gracias a mi familia porque sin ustedes este momento simplemente no hubiera llegado para mí.

A mi Director de Tesis, Dr. Octavio Loera, gracias por su apoyo, paciencia, consejos y dedicación hacia el proyecto.

A mis asesores y sinodales, gracias por sus críticas, consejos y sobre todo gracias por su excelente disposición para la revisión de la tesis.

A mis amigos, que siempre me ayudaron y escucharon cuando más lo necesité.

Y finalmente, agradezco el apoyo del CONACyT y de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa.

Resumen

En este trabajo se estudió la efectividad de una estrategia basada en el cultivo sólido de *Fomes* sp. EUM1 para decolorar y destoxificar un efluente simulado de la industria textil contaminado con índigo carmín. En la primera parte del estudio se realizaron cinéticas de producción de enzimas ligninolíticas por parte del hongo *Fomes* sp. EUM1 en 4 medios de cultivo distintos: 1) Rastrojo de maíz (RM); 2) RM con salvado de trigo (ST) (en proporción 80:20 (p/p)); 3) RM adicionado con glucosa (G) (10 g/L) y extracto de levadura (EL) (5 g/L); 4) RM adicionado con ST, G y EL (a las concentraciones antes mencionadas). La incubación se realizó a 35 °C y la actividad enzimática (Lignina peroxidadas, LiP; Manganese peroxidadas, MnP y Lacasas, Lac) se cuantificó durante 12 días.

En ninguno de los medios de cultivo se detectó actividad LiP ni MnP. El mejor medio para la producción de lacasas fue el medio 2, en donde la producción máxima alcanzó las 3.9 UI/gss al 6° día de cultivo. Además, en el medio 2, la adición del salvado de trigo también mejoró la productividad de éstas enzimas, aumentándola de 0.59 a 0.68 UI/gss*día, en comparación con el medio 1. El medio 2 se seleccionó para los ensayos posteriores.

En la siguiente parte del estudio se evaluó la decoloración del efluente simulado por medio de tres estrategias: A, "Material fermentado" (MF) (micelio del hongo, sustrato residual, enzimas etc.) obtenido al cultivar al hongo durante 6 días sobre el medio 2 (Decoloración por adsorción y catálisis enzimática); B, Mezcla de RM-ST (80:20 (p/p)) (Decoloración por adsorción del colorante sobre la mezcla); C, Extracto crudo enzimático (ECE) obtenido del cultivo del hongo en el medio 2 (Decoloración por catálisis enzimática). Los tratamientos se realizaron en agitación a 100 rpm y 40 °C. Los mayores porcentajes de decoloración (%D) se observaron utilizando el MF, (82% en 4 h). También se detectó un aumento en la actividad lacasa medida en el efluente (de 0 a 75 UI/L de efluente a lo largo de 8 h de tratamiento), al parecer, el aumento se debió a la disolución de las lacasas que estaban en el MF. Al repetir el ensayo sin agitación y a 50 rpm, se encontró que la velocidad de agitación no afectó el desprendimiento de éstas enzimas desde el MF hacia el efluente en tratamiento; sin embargo, el %D se redujo un 24 y 56% al disminuir la agitación a 50 y 0 rpm, respectivamente. Lo anterior sugiere que el proceso de decoloración no sólo depende de la acción de las lacasas que se disuelven en el efluente, sino también a la actividad de las enzimas que permanecen unidas al MF.

En el caso de las estrategias B y C, los %D fueron muy bajos (< del 6% después de 7 h de tratamiento), sugiriendo que la decoloración alcanzada por acción del MF se debió principalmente a la actividad enzimática (extracelular, asociada al micelio o inmovilizada sobre el sustrato) y no a la adsorción del colorante sobre el sustrato residual. Por otro lado, se encontró que las lacasas presentes en el ECE conservaron el 100 % de su actividad después de 10 h de tratamiento, no obstante, su concentración fue menor (18 UI/L de efluente) que en el MF, por lo que no se logró decoloración importante. Adicionalmente, se evaluó la decoloración del efluente utilizando una lacasa comercial (LC) (Deni Lite II, Novozymes), ésta enzima fue capaz de decolorar por completo el índigo carmín en 1 h de tratamiento a 40 °C y en agitación a 100 rpm.

Posteriormente, se evaluó la fitotoxicidad (sobre semillas de lechuga) del efluente simulado, de la solución salina (NaCl 0.05 M) utilizada durante su preparación, así como del efluente decolorado con el MF o con la LC. Los parámetros evaluados fueron, porcentaje de germinación y elongación de la radícula e hipocótilo. En todos los ensayos se observó una inhibición en el porcentaje de germinación. La mayor inhibición se observó en las semillas expuestas a los efluentes decolorados, siendo de 95 y 91% para el efluente tratado con el MF y con la LC, respectivamente.

En cuanto al crecimiento de la radícula, se encontró que la mayor inhibición en la elongación de la radícula (IER) fue causada por el efluente tratado con la LC (IER del 92%), seguido por el efluente simulado (IER del 64%) y la solución salina (IER del 70%), mientras que la menor inhibición se observó en las plántulas expuestas al efluente tratado con el MF (IER del 50%). La longitud promedio de la radícula en las plántulas control (crecidas en presencia de agua dura reconstituida) fue de 31.5 mm. Finalmente, sólo el efluente tratado con la LC afectó el crecimiento del hipocótilo, inhibiendo su elongación en un 88%.

Por otro lado, se encontró que el tratamiento con el MF provocó un aumento en la demanda química de oxígeno (DQO) del efluente (de 79.5 a 3345 mg/L). Para disminuir la DQO, el efluente decolorado con el MF se sometió a una prueba de biodegradabilidad anaerobia. Los resultados mostraron una eficiencia en la eliminación de la DQO del 74.5% en el efluente diluido 1:5 (v/v) en agua destilada, ya que sin diluir el pH del cultivo anaerobio disminuye a niveles que inhiben la actividad de las bacterias metanogénicas.

Índice

1. Introducción	1
1.1 Distribución del agua en el mundo	1
1.2 México y la industria maquiladora	1
1.3 La industria textil y la contaminación del agua	2
1.4 Clasificación y características de los colorantes.....	3
1.5 Sistemas de tratamiento de efluentes textiles.....	4
1.5.1. Sistemas de tratamiento biológico	5
1.6 Mecanismos biológicos de degradación del índigo	8
1.6.1 Isatín y Ácido antranílico.	9
1.8 Ensayos de fitotoxicidad	9
2. Antecedentes	11
3. Justificación	13
4. Hipótesis	15
5. Objetivos	15
5.1 General.....	15
5.2 Específicos	15
6. Materiales y Métodos	17
6.1 Esquema general de actividades	17
6.2 Microorganismo y preparación del inóculo	18
6.3 Conservación de la cepa a largo plazo.....	18
6.4 Cultivo en medio sólido	19
6.4.1 Sustratos.....	19
6.4.2 Condiciones de cultivo	19
6.4.3 Obtención del extracto crudo enzimático (ECE).....	19
6.4.4 Determinaciones analíticas	20
6.5 Pruebas de decoloración	24

6.5.1 Preparación del efluente simulado	24
6.5.2 Estrategias de decoloración	24
6.5.3 Efecto de la velocidad de agitación en el proceso de decoloración mediado por el material fermentado	26
6.5.4 Decoloraciones sucesivas empleando el material fermentado.....	26
6.5.5 Cálculo del porcentaje de decoloración	26
6.6 Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (<i>Lactuca sativa</i>)	27
6.7 Pruebas de biodegradabilidad anaerobia.....	29
6.7.1 Determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO).....	30
6.7.2 Determinación de metano y CO ₂ por cromatografía de gases.....	30
6.7.3 Determinación de la eficiencia en la remoción de la DQO.	31
6.8 Análisis estadístico	31
7. Resultados y Discusión	32
7.1 Conservación de la cepa a largo plazo.....	32
7.2 Cultivo en medio sólido.....	32
7.2.2 Producción de proteína extracelular durante el cultivo sólido	34
7.2.1 Cambios de pH durante el cultivo	34
7.2.3 Producción de enzimas ligninolíticas.....	36
7.2.4 Zimograma.....	42
7.3 Pruebas de decoloración	45
7.3.1 Estrategias de decoloración.....	45
-Decoloración por adsorción y catálisis enzimática: Material fermentado	
-Decoloración por adsorción sobre los sustratos sólidos	
-Decoloración por catálisis enzimática: Extracto crudo enzimático, Lacasa comercial	
7.3.2 Efecto de la velocidad de agitación en el proceso de decoloración.....	55
7.3.3 Decoloraciones sucesivas empleando el material fermentado.....	58
7.4 Ensayos de toxicidad aguda con semillas de lechuga (<i>Lactuca sativa</i>).....	59
-Ensayo de germinación	
-Elongación de radícula e hipocótilo	
7.5 Prueba de biodegradabilidad anaerobia	67

8. Conclusiones	70
9. Perspectivas	71
10. Referencias	72
11. Anexos	83
-Anexo I. Curva estándar de albúmina sérica bovina (ASB)	
-Anexo II. Determinación de la Demanda Química de Oxígeno en aguas naturales, residuales y residuales tratadas-método de prueba. NMX-AA-030-SCFI-2001	
-Anexo III. Preparación de soluciones	
-Agua dura reconstituida	
-Preparación del medio mineral de Visser	

Índice de Figuras

Fig. 1.1 Estructura molecular del índigo carmín	4
Fig. 1.2 Posible ruta de degradación del índigo por acción de las lacasas	8
Fig. 6.1 Ensamble de los vidrios y espaciadores del dispositivo de moldeado del gel	21
Fig. 6.2 Preparación del gel de poliacrilamida	
Fig. 6.3 Esquema general de la metodología empleada en las pruebas de decoloración	25
Fig. 6.4 Plántulas de <i>Lactuca sativa</i>	28
Fig. 6.5 Recolección de las muestras de biogás	29
Fig. 7.1 Desarrollo del micelio fúngico durante el cultivo de <i>Fomes</i> sp. EUM1 sobre rastrajo de maíz.....	33
Fig. 7.2 Producción de proteína extracelular durante el cultivo de <i>Fomes</i> sp. EUM1	34
Fig. 7.3 Cambios de pH durante el cultivo de <i>Fomes</i> sp. EUM1 sobre los diferentes medios de cultivo.....	35
Fig. 7.4 Cinética de producción de lacasas por <i>Fomes</i> sp. EUM1 en diferentes medios de cultivo	36
Fig. 7.5 Productividad de lacasas en <i>Fomes</i> sp. EUM1 en los diferentes medios de cultivo.....	40
Fig. 7.6 Zimogramas obtenidos con el extracto crudo enzimático (ECE) de los distintos medios de cultivo	43
Fig. 7.7 Decoloración del índigo carmín por acción del material fermentado	46
Fig. 7.8 Fotografías del efluente tratado y del material fermentado.....	48
Fig. 7.9 Fotografías del efluente tratado durante 7 h con la mezcla de RM-ST.....	48
Fig. 7.10 Fotografías de efluente tratado y de los residuos lignocelulosicos	49
Fig. 7.11 Espectros de absorción de las muestras tratadas con la lacasa comercial	52
Fig. 7.12 Fotografías del efluente simulado, antes y después del tratamiento con la lacasa comercial.....	53
Fig. 7.13. Actividad lacasa residual durante la decoloración por catálisis enzimática	54
Fig. 7.14 Porcentaje de decoloración de efluente simulado durante el tratamiento con el material fermentado a diferentes velocidades de agitación	56
Fig. 7.15 Actividad lacasa en el efluente simulado durante el tratamiento con el material fermentado a diferentes velocidades de agitación	56
Fig. 7.16 Decoloraciones sucesivas	58
Fig. 7.17 Principales procesos microbianos que tienen lugar durante la digestión anaerobia	68

Fig. I.1 Curva patrón para la determinación de proteína extracelular83

Índice de Tablas

Tabla 1.1 Características de los principales colorantes de uso industrial.....	3
Tabla 1.2 Ventajas y desventajas de algunos métodos para la remoción del color en los efluentes textiles	5
Tabla 1.3 Decoloración de algunos colorantes textiles por acción de distintos hongos de pudrición blanca y/o sus enzimas	6
Tabla 1.4 Especies vegetales recomendadas para la realización de pruebas de fitotoxicidad.....	10
Tabla 6.1 Formulación de los geles de separación y apilamiento	23
Tabla 6.2 Estrategias de decoloración del efluente simulado.....	24
Tabla 6.3 Pruebas de biodegradabilidad anaerobia	29
Tabla 6.4 Condiciones del análisis por cromatografía de gases	31
Tabla 7.1 Composición del rastrojo de maíz y salvado de trigo (%)	37
Tabla. 7.2 Remoción de colorantes textiles por adsorción sobre residuos agroindustriales	50
Tabla 7.3 Porcentaje de decoloración de las muestras tratadas con la lacasa comercial.....	52
Tabla 7.4 Germinación de las semillas de <i>Lactuca sativa</i> en presencia de las soluciones problema	60
Tabla 7.5 Concentración inhibitoria 50 (CI ₅₀)para: Germinación de las semillas.....	61
Tabla. 7.6 Plántulas obtenidas de las semillas expuestas a las soluciones problema.....	62
Tabla 7.7 Longitud de la radícula de las plántulas de <i>Lactuca sativa</i> a los 5 días de incubación.....	63
Tabla 7.8 Concentración inhibitoria 50 para: Elongación de la radícula	64
Tabla 7.9 Longitud de la radícula de las plántulas de <i>Lactuca sativa</i> a los 5 días de incubación.....	65
Tabla 7.10 Determinación de la Demanda Química de Oxígeno de la solución modelo antes y después del tratamiento con el material fermentado	67
Tabla 7.11 Eficiencias de eliminación de la DQO	69
Tabla III.1 Formulación del medio mineral Visser	86

1. Introducción

1.1 Distribución del agua en el mundo

La cantidad de agua dulce en la Tierra es finita, pero su distribución varía constantemente debido a los ciclos naturales de congelación y descongelación, a la fluctuación en las precipitaciones, a los patrones de escurrimiento y a los niveles de evaporación. Sin embargo, hoy en día esta situación ha cambiado. Junto con las causas naturales ahora existen actividades humanas que con el tiempo se han convertido en las principales responsables de la alteración de los sistemas de agua en el planeta (World Water Assessment Programme, 2009).

Según una de las estimaciones más aceptadas, poco más del 97% del volumen total de agua es agua salada que se encuentra contenida en océanos y mares, mientras que apenas algo menos del 3% es agua dulce o de baja salinidad. De este 3% estimado en unos 38 millones de kilómetros cúbicos, más del 75% está concentrado en casquetes polares, nieves eternas y glaciares; el 21% está almacenado en el subsuelo y sólo el 4% restante corresponde a los cuerpos y cursos de agua superficial (lagos y ríos) (CONAGUA, 2010a).

Por otro lado, en el último siglo la población del mundo se multiplicó tres veces, en tanto que las extracciones de agua crecieron seis veces, esto se ha traducido en un incremento en el grado de presión sobre los recursos hídricos. En el caso particular de México, durante los últimos 50 años, su población ha crecido cuatro veces: en 1950 había 25.8 millones de personas, mientras que para el 2005 había 103.3 millones (INEGI, 2010b). México se encuentra hoy en el lugar 55 de los 155 evaluados respecto al mayor grado de presión sobre este recurso (CONAGUA, 2010b).

1.2 México y la industria maquiladora

La industria manufacturera es la actividad económica que transforma la materia prima en artículos para el consumo. En México, una parte importante de la industria manufacturera está formada por las maquiladoras de exportación (INEGI, 2010a).

Como es sabido, en México se ha permitido la entrada casi indiscriminada de las empresas multinacionales, pero no se ha regulado. Para fomentar la instalación de nuevas industrias para la generación de empleos, se les ha otorgado todo tipo de concesiones (fiscales, laborales, mercantiles, ambientales, etc.). Esto ha tenido efectos muy negativos en el desarrollo nacional, tales como la profundización de la polaridad entre los estratos

socioeconómicos, la pérdida de identidad cultural, la sobreexplotación de los recursos naturales y la contaminación. Bajo este contexto, la rama de las maquiladoras -siendo muy representativa la industria textil- se presenta como punta de lanza de la apertura comercial que aparece con diferentes caras: Tratado de Libre Comercio de América del Norte (TLCAN), Plan Puebla-Panamá o Acuerdo de Libre Comercio de las Américas (García y Solís, 2008).

Las entidades donde la industria manufacturera ocupa el primer lugar de aportación a su Producto Interno Bruto (PIB) son: Coahuila de Zaragoza, Querétaro, Estado de México, Aguascalientes, Guanajuato, Puebla y San Luis Potosí (INEGI, 2010a).

En el estado de Puebla se halla la mayor parte de la maquila textil formal e informal; como consecuencia de ello, el corredor industrial Puebla-Tlaxcala es el cuarto en importancia del país (García y Solís, 2008).

1.3 La industria textil y la contaminación del agua

Con la creciente demanda de productos textiles, este sector maquilador y las aguas residuales que genera se han incrementado proporcionalmente. En la actualidad, la industria textil es considerada como una de las más contaminantes en términos de volumen, color y complejidad de sus efluentes (Dogan y Türkdemir, 2005; Ali *et al.*, 2008).

Por otro lado, en adición al problema ambiental, la industria textil consume una enorme cantidad de agua potable (más de 150 L/kg de algodón a teñir) (Prigione *et al.*, 2008).

Las aguas residuales textiles se caracterizan por extremas fluctuaciones en parámetros como la demanda química y bioquímica de oxígeno, el pH, el color y la salinidad. Su composición se encuentra determinada por la presencia de una amplia variedad de colorantes, impurezas procedentes de las fibras y otros productos como dispersantes, estabilizantes, ácidos, álcalis, sales y a veces hasta metales pesados (Rodríguez y Toca-Herrera, 2006).

Hoy en día la industria emplea aproximadamente 10,000 colorantes y pigmentos distintos, de los cuales se consumen anualmente alrededor de 7×10^5 toneladas en todo el mundo (Campos *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2007). Además, se estima que el 90% de los colorantes que entran a las plantas de tratamiento de aguas con lodos activados, saldrán a través de

ellas sin sufrir ningún cambio y posteriormente serán descargadas en cuerpos de agua natural (Abadulla *et al.*, 2000).

Cuando los efluentes textiles, usualmente muy coloreados, se descargan en estos lugares se desencadenan graves problemas para el ecosistema, ya que si estos no reciben un tratamiento apropiado pueden persistir en el medio ambiente por largos periodos de tiempo. Además, pequeñas concentraciones de ellos (10-50 mg/L) son suficientes para causar alteraciones en la transparencia del agua y en la solubilidad de los gases, lo que provoca efectos adversos en los procesos fotosintéticos de las plantas acuáticas y en general en los seres vivos del ecosistema. De hecho, se ha demostrado que los colorantes pueden dar lugar a la formación de compuestos cancerígenos (Munteanu *et al.*, 2008).

1.4 Clasificación y características de los colorantes

Los colorantes pueden clasificarse con base en diversos criterios, por ejemplo, con base en su aplicación industrial pueden clasificarse en: colorantes reactivos, directos, dispersos, ácidos, básicos y colorantes tina (Murugesan *et al.*, 2007) (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Características de los principales colorantes textiles de uso industrial.

TIPO	CARACTERÍSTICAS
COLORANTE ÁCIDO	Son colorantes aniónicos solubles en agua, contienen en sus moléculas grupos ácidos (sulfónico, carboxílico o nitro) y pueden teñir fibras que contengan grupos básicos (lana, seda, poliamida) por formación de sales coloreadas.
COLORANTE DIRECTO	Son colorantes que tiñen la celulosa sin necesidad de un mordiente. También se les llama colorantes sustantivos.
COLORANTES TINA	Son sales insolubles en medio acuoso, por reducción se transforman en sales solubles que pueden impregnarse en las fibras; al exponerse al aire o a un agente oxidante se reoxidan (sobre la fibra) y toman su forma inicial insoluble.
COLORANTE AZOICO	Son colorantes que se desarrollan dentro del sustrato a teñir partiendo de un copulante (generalmente compuestos aromáticos (Ar) y una sal de diazonio: $\text{ArN}_2^+ + \text{Ar}'\text{H} \longrightarrow =\text{Ar-N N-Ar}' + \text{H}^+$ Sal de diazonio Comp. Aromático Azocompuesto
COLORANTE BÁSICO	Son colorantes en los cuales el cromóforo está ubicado en el catión, razón por la cual se les conoce como colorantes catiónicos. Son solubles en agua y muestran afinidad por las fibras acrílicas.
COLORANTE DISPERSO	Son compuestos orgánicos no iónicos casi insolubles en agua que se aplican en dispersión acuosa sobre fibras de poliéster.
COLORANTE REACTIVO	Son colorantes sintéticos solubles en agua que forman enlaces químicos con la celulosa y la lana.

(COVENIN, 1990; Morrison y Boyd, 1998)

-Colorantes tina

Hoy en día, los colorantes tina, especialmente el índigo, juegan un papel muy importante en la industria, se estima que la producción de índigo sintético es de 22 000 toneladas al año (Dogan y Türkdemir, 2005). Este compuesto se utiliza para el teñido de las fibras de algodón empleadas durante la confección de prendas de mezclilla (Fig. 1.1). Desafortunadamente, se ha observado que durante el proceso de teñido solo el 80% del colorante quedará fijo en el tejido mientras que el restante será removido y posteriormente descargado con los efluentes residuales (Wambuguh y Chianelli, 2008).

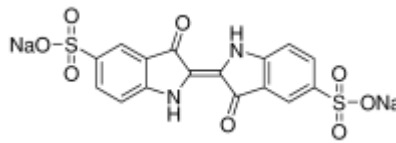


Fig. 1.1. Estructura de la molécula de índigo carmín

El índigo es considerado un compuesto recalcitrante y es tratado principalmente por métodos de coagulación química y floculación, sin embargo, estos tratamientos generan grandes cantidades de lodos y con ello, problemas colaterales relacionados con su manejo y disposición (Dogan y Türkdemir, 2005).

Comúnmente la concentración de colorantes a la tina en los efluentes industriales va de 0.01 a 0.1 g/L. Debido a que el ojo humano puede detectar concentraciones tan pequeñas como 0.005 mg/l, valores que excedan este nivel invariablemente serán percibidos como un problema de contaminación (Wambuguh y Chianelli, 2008).

1.5 Sistemas de tratamiento para los efluentes textiles

En los últimos años, se han propuesto distintos tratamientos o combinaciones de ellos para el manejo efectivo de las aguas residuales de la industria textil. En la Tabla 1.2 se resumen algunas de las ventajas y desventajas de las tecnologías más estudiadas.

Tabla 1.2. Ventajas y desventajas de algunos métodos para la remoción del color en los efluentes textiles

Métodos	Ventajas	Desventajas	Fundamento
Métodos fisicoquímicos			
Reacción Fenton	Decoloración efectiva de colorantes solubles e insolubles	Generación de lodos, baja eficiencia de mineralización, solo es efectivo a bajas concentraciones de materia orgánica.	Producción de radicales reactivos del oxhidrilo a partir de la catálisis del H ₂ O ₂ con el hierro.
Astillas de madera	Buena capacidad para adsorber colorantes ácidos	Requiere largos tiempos de retención, el colorante permanece adherido al material.	Secuestro pasivo y separación de un compuesto presente en una fase acuosa hacia una fase sólida.
Fotoquímico	No se generan lodos	Formación de subproductos tóxicos, baja remoción de colorantes, proceso lento.	Producción de radicales OH [•] por medios fotoquímicos (incluida la luz solar) o por otras formas de energía.
Destrucción electroquímica	Los compuestos generados no son peligrosos	Elevado costo de la electricidad.	Se basa en procesos fisicoquímicos capaces de producir especies transitorias poderosas, principalmente el radical hidroxilo (OH [•]).
Carbón activado	Buena remoción de una gran variedad de colorantes	Muy caro, excesiva generación de lodos, el colorante permanece adherido al carbón activado.	Secuestro pasivo y separación de un compuesto presente en una fase acuosa hacia una fase sólida.
Ultrafiltración	Remueve todo tipo de colorantes	Producción de lodos muy concentrados	Filtración a través de membranas.
Coagulación electrocinética	Económicamente factible	Elevada producción de lodos.	Se basa en la adición de sales metálicas que se enlazan a las molécula orgánica, neutralizando sus cargas y disminuyendo su solubilidad

(Robinson *et al.*, 2001; Husain, 2006; Juárez, 2008)

1.5.1. Sistemas de tratamiento biológico

Como puede observarse, la mayoría de las tecnologías físicoquímicas de tratamiento presentan inconvenientes importantes.

En búsqueda de tecnologías sustentables, eficientes y amigables con el medio ambiente, se ha dirigido la atención al desarrollo de sistemas de tratamiento biológico (Rodríguez y Toca-Herrera, 2006). Al respecto numerosos investigadores observaron que los hongos de pudrición blanca eran capaces de degradar una gran variedad de colorantes (recalcitrantes y polímeros complejos de la lignina, gracias a su sistema enzimático extracelular, inespecífico y no estereoselectivo, formado principalmente por: lignina peroxidasas LiP (EC:1.11.1.13), manganeso peroxidasas MnP (EC 1.11.1.14) y lacasas Lac (EC 1.10.3.2) (D'Acunzo *et al.*, 2002) (Tabla 1.3).

Tabla 1.3. Decoloración de algunos colorantes textiles por acción de distintos hongos de pudrición blanca y/o sus enzimas.

Microorganismo	Concentración del Colorante	Porcentaje de remoción/ Tiempo	Mecanismo	Referencia
<i>Ganoderma lucidum</i>	Verde de Malaquita (50 ppm)	12 % en 25 h	Lacasa purificada (20 UI/mL)	Murugesan <i>et al.</i> , (2009)
<i>Ganoderma lucidum</i>	RB-5 (50 ppm)	5% en 2 h	Lacasas en un extracto crudo (20 UI/L)	Murugesan <i>et al.</i> , (2007)
<i>Trametes versicolor</i>	Índigo carmín (0.036 M)	70% en 3 h	Lacasa purificada (150 UI/L)	Champagne y Ramsey, (2010)
<i>Trametes villosa</i>	RB-5 (40 mg/L)	93% en 24 h	Lacasa purificada (0.2 g de proteína/L)	Zille <i>et al.</i> , (2003)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Índigo carmín (3-30 mg/L)	ND	MnP purificada (0.05 U/mL) LiP purificada (0.05 U/mL)	Podgornik <i>et al.</i> , (2001)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Índigo carmín (50 mg/L)	29% (2 días)	Catálisis enzimática	Young y Yu, (1997)
<i>Trametes versicolor</i>	Índigo carmín	30% (2 días)	Catálisis enzimática	Young y Yu, (1997)
<i>Trametes troggi</i>	Efluente real de la industria textil al 20% en agua	8% en 9 h	Lacasa en un extracto crudo (9 U/mL)	Khelifi <i>et al.</i> , (2010)
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	Índigo carmín (10 µM)	40.4 % en 120 min	Lacasa parcialmente purificada (0.01 U/mL)	Sarnthima y Khammuang, (2008)
<i>Coriolus versicolor f. antarcticus</i>	Índigo carmín	98% en 1 h	Cultivo Líquido (CL) del hongo (contenía tanto el caldo de cultivo como el micelio)	Levin <i>et al.</i> , (2004)
<i>Coriolus versicolor f. antarcticus</i>	Índigo carmín	27% en 1 h	Micelio del hongo obtenido durante 18 días de CL	Levin <i>et al.</i> , (2004)
<i>Coriolus versicolor f. antarcticus</i>	Índigo carmín	7% en 1 h	Caldo de cultivo sin micelio (Enzimas extracelulares)	Levin <i>et al.</i> , (2004)

ND. No determinado

-Lacasas

En las últimas décadas, las lacasas han sido el objeto de una intensa investigación científica debido a que poseen características muy interesantes:

- Actúan sobre una gran variedad de sustratos, oxidan tanto compuestos fenólicos como no fenólicos, diaminas, anilinas, aminos aromáticas, así como muchos contaminantes ambientales altamente tóxicos (Johannes y Majcherczyk., 2000).

- No requieren de la adición o síntesis de cofactores de pequeño peso molecular ya que emplean al oxígeno como único cofactor y éste se encuentra presente en el medio ambiente. Además, a diferencia de las peroxidasas, las lacasas no necesitan peróxido de hidrógeno para actuar (Murugesan *et al.*, 2007; Loera *et al.*, 2006).
- La mayoría de las lacasas son enzimas extracelulares lo que facilita grandemente los procesos de purificación, además, presentan alta estabilidad en el medio extracelular (Rodríguez y Toca-Herrera, 2006).
- Ofrecen la posibilidad de ser usadas en su forma inmovilizada (Loera *et al.*, 2006)
- Es posible inducir la expresión de lacasas en la mayoría de los hongos, por lo que pueden ser aplicadas con facilidad en procesos biotecnológicos (Rodríguez y Toca-Herrera, 2006).
- Además, con el uso de mediadores se consigue ampliar el rango de sustratos que pueden ser oxidados por las lacasas (Camarero *et al.*, 2005).

Actualmente ya se encuentran disponibles algunas lacasas comerciales: Denilite I y II de Novozymes (Denmark) y Zylite (Zytext Pvt. Ltd., Mumbai, India) las cuales son capaces de degradar el índigo de forma muy específica (Rodríguez y Toca-Herrera, 2006).

-Manganeso peroxidasas (MnP) y Lignina Peroxidasas (LiP)

Las LiP y MnP son enzimas extracelulares que también forman parte del sistema ligninolítico de muchas especies de hongos de pudrición blanca. Las MnP actúan mediante la producción enzimática de Mn(III), el cual difunde desde el sitio activo de la enzima y reacciona con diferentes sustratos fenólicos. Para alcanzar un potencial de degradación más elevado, el Mn(III) debe ser estabilizado por medio de un agente quelante, como por ej. ácido malónico o ácido málico. Por otro lado, las LiP por sí mismas poseen un potencial de reducción relativamente más elevado y su forma oxidada (LiPI) puede oxidar exitosamente diferentes sustratos no fenólicos. El potencial oxidativo de LiP puede incrementarse por medio de la adición de pequeñas moléculas aromáticas, como por ejemplo el alcohol veratrílico (Podgornik *et al.*, 2001).

Durante los últimos años, las LiP han sido objeto de extensos estudios debido a su habilidad para degradar diferentes xenobióticos recalcitrantes y colorantes. A diferencia de las LiP, las MnP no son tan eficientes en procesos de biorremediación, debido a que su

potencial redox es menor. Hablando específicamente de índigo carmín, éste puede ser decolorado exitosamente por ambos grupos de peroxidasa (Podgornik *et al.*, 2001).

1.6 Mecanismos biológicos de degradación del índigo

Durante los pasados 10 años, se han desarrollado numerosos trabajos con la finalidad de establecer las rutas metabólicas y las reacciones implicadas en la degradación de los colorantes. Campos *et al.*, (2001) encontraron que las lacasas de *Trametes hirsuta* y *Sclerotium rolfsii* son responsables de la degradación del índigo a isatín (Fig. 1.2)

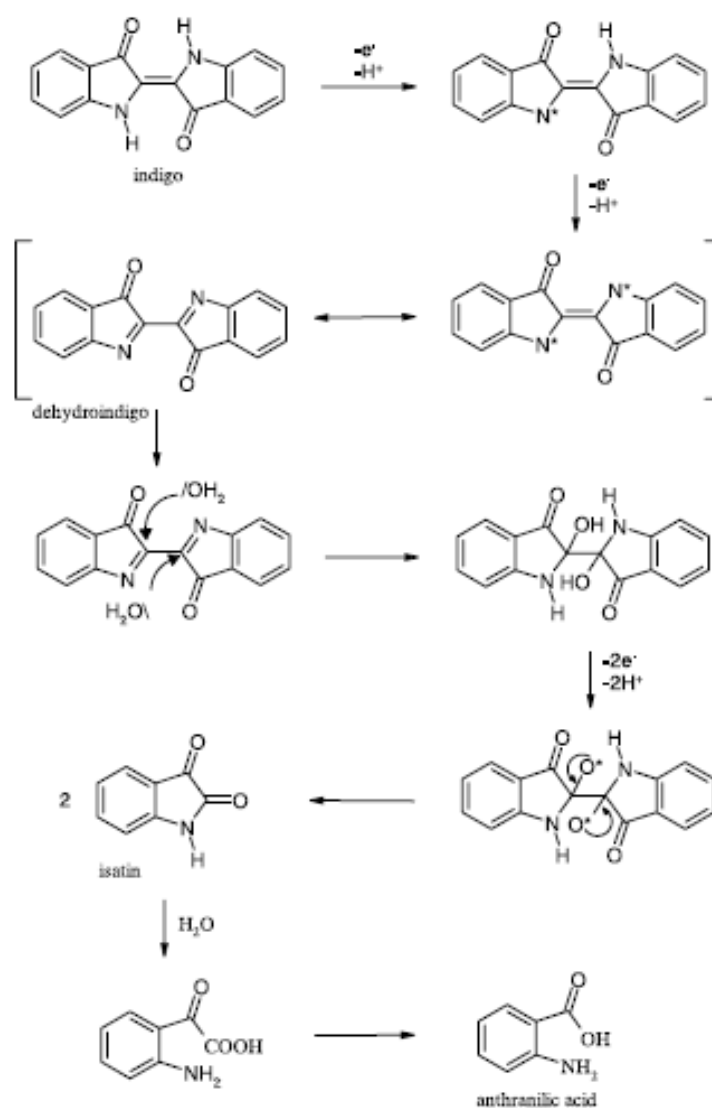


Fig. 1.2. Posible ruta de degradación del índigo por acción de las lacasas (Campos *et al.*, 2001)

Estos autores encontraron que la proporción molar *índigo/oxígeno molecular* de la reacción global (índigo a isatín) en presencia de la lacasa fue exactamente 1. Debido a que se requiere de 4 electrones para reducir la molécula de oxígeno (O₂) a agua, así como para oxidar el índigo a isatín, la estequiometría implica que en ausencia de cualquier otro compuesto activo óxido-reductor, la enzima podría estar implicada en el segundo paso de oxidación que conduce a isatín. Una vez que se forma el isatín, se presenta una posterior degradación hidrolítica sin la intervención de la lacasa. El intermediario formado: ácido isatóico, es bastante inestable y se descompone espontáneamente vía descarboxilación para producir ácido antranílico como producto final de la degradación (Campos *et al.*, 2001).

Recientemente, Mohandass *et al.*, (2008), identificaron por medio de técnicas de cromatografía de líquidos-espectroscopía de masas (LC-MS) y resonancia magnética nuclear (NMR) al isatín y al ácido antranílico como productos primarios de la degradación del índigo, confirmando con ello los resultados reportados previamente por Campos *et al.*, (2001).

1.6.1 Isatín y Ácido antranílico.

En la industria de los colorantes, el isatín se utiliza ampliamente en la manufactura de colorantes a la tina y además, como reactivo analítico para la determinación de muchos compuestos industriales. La oxidación del isatín a ácido antranílico es una ruta importante en la síntesis orgánica. La importancia económica de los antranilatos reside en su bien establecida actividad antiinflamatoria. Debido a esto, se han sintetizado muchos derivados con el objetivo de descubrir nuevos agentes farmacológicos, por ejemplo: inmunosupresores, fungicidas y agentes para la prevención del daño a células nerviosas (Jagadeesh *et al.*, 2008).

1.7 Ensayos de fitotoxicidad

La evaluación de las descargas de contaminantes basada sólo en criterios químicos es ineficiente e inadecuada, hoy en día la realización de bioensayos es indispensable durante la valoración del impacto de estos compuestos sobre el medio ambiente (Wadhia y Thompson, 2007).

En el caso particular de las industrias textiles, su impacto sobre el medio ambiente no se limita a la contaminación del agua, sino que en muchas ocasiones los efluentes

contaminados se vierten a los ríos y terminan por ser utilizados como agua de riego (Osma *et al.*, 2010). Debido a que diversos elementos del suelo pueden entrar en la cadena alimenticia a través de las plantas y/o animales, un suelo contaminado representa un grave riesgo para la salud humana (Gomare *et al.*, 2009).

Idealmente, la evaluación de la toxicidad de cualquier compuesto debe incluir bioensayos que utilicen bacterias, plantas y células o tejidos de mamíferos (Kapanen e Itävaara, 2001). Entre las técnicas basadas en la utilización de plantas, los bioensayos de fitotoxicidad son los más comunes. Estos ensayos han sido recomendados y aplicados por diferentes organismos de protección ambiental para la evaluación ecotoxicológica de muestras ambientales y compuestos puros (Castillo, 2004). Las técnicas empleadas durante la evaluación de la fitotoxicidad se basan en los bioensayos de germinación de semillas y en la medición del crecimiento en plántulas. Sin embargo, se considera que los ensayos de germinación son menos sensibles que los métodos de evaluación del crecimiento, ya que estos permiten ponderar el efecto tóxico de compuestos solubles presentes en niveles de concentración tan bajos que no son suficientes para inhibir la germinación, pero que sin embargo, pueden retardar o inhibir completamente los procesos de elongación de la radícula o del hipocótilo (Castillo, 2004).

Las especies vegetales recomendadas por la Agencia de Protección ambiental de los Estados Unidos Americanos (USEPA) y la Administración de Alimentos y Medicamentos (USFDA) para los ensayos de fitotoxicidad se muestran en la Tabla 1.4.

Tabla 1.4. Especies vegetales recomendadas para efectuar pruebas de fitotoxicidad

	Nombre común	Nombre científico
USEPA/FDA	Lechuga	<i>Lactuca sativa</i>
	Repollo	<i>Brassica oleracea</i>
	Pepino	<i>Cucumis sativus</i>
	Frijol	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	Maíz	<i>Zea mays</i>
	Tomate	<i>Lycopersicon esculentum</i>
USEPA	Zanahoria	<i>Daucus carota</i>
FDA	Cebolla	<i>Allium cepa</i>
	Trigo	<i>Triticum aestivus L.</i>

(Kapanen e Itävaara, 2001)

2. Antecedentes

A partir de 1990, se ha evaluado la efectividad de las enzimas ligninolíticas de muchas especies fúngicas en la degradación de una amplia variedad de colorantes. Entre las especies más estudiadas se encuentran *Trametes hirsuta* (Abadulla *et al.*, 2000; Campos *et al.*, 2001), *Funalia trogii* (Duygu *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2007), *Ganoderma lucidum* (Murugesan *et al.*, 2007), *Stereum hirsutum* (Mouso *et al.*, 2007), *Trametes villosa* (Zille *et al.*, 2003), *Thelephora* sp. (Selvam *et al.*, 2003), *Pleurotus florida* (Sathiya *et al.*, 2007), *Trametes versicolor* (Pazarlioglu *et al.*, 2005; Cano-Hernández *et al.*, 2009), *Pleurotus ostreatus* (Cano-Hernández *et al.*, 2009), entre otros. Sin embargo, aunque muchos colorantes son oxidados eficazmente por estas enzimas, en especial, por las lacasas, la decoloración sucede a diferentes velocidades y en diferentes proporciones e incluso muchos colorantes no son degradados por completo (Kandelbauer *et al.*, 2004).

La búsqueda de nuevas especies fúngicas útiles en procesos biotecnológicos, condujo en el 2003 al aislamiento de un hongo termotolerante ligninolítico (*Fomes* sp. EUM1) en el trópico mexicano. De este aislado se obtuvieron dos isoenzimas de lacasa que mostraron ser estables durante una hora en un amplio rango de pH (4-10), además, conservaron cerca del 100% de su actividad a temperaturas de 50 y 60 °C. Por otro lado, al determinar sus constantes cinéticas aparentes (debido a que la preparación contenía ambas isoenzimas), se encontró que su k_{cat} era 8 veces mayor que la de la lacasa recombinante producida industrialmente por Novo Nordisk a partir de *Aspergillus oryzae*. Finalmente, también se determinó que estas enzimas eran capaces de conservar el 80 y 65% de su actividad luego de su exposición durante 5 minutos a una solución de etanol y acetonitrilo a concentraciones de 20 y 10%, respectivamente.

Estos resultados abrieron la posibilidad de probar estas enzimas en la oxidación de sustratos de interés industrial solubles en medios semiacuosos y/o en procesos que se realicen a temperaturas elevadas (Medina, 2003).

Más recientemente, al evaluar el efecto de la temperatura en la producción de enzimas ligninocelulolíticas en cultivo sólido, Ordaz, (2008) encontró que la mejor temperatura para la producción de lacasas era de 35 °C, ya que al variar la temperatura de 30 a 35 °C se observó un incremento en la producción de 2.7 veces, después de 6 días de incubación.

En relación con las condiciones de cultivo, varios estudios han probado que tanto la naturaleza como la concentración de la fuente de nitrógeno y carbono constituyen un

poderoso factor regulador de la producción de enzimas ligninolíticas en los hongos de pudrición blanca (Songulashvili *et al.*, 2007).

Los datos que se tienen hasta el momento sobre las características y propiedades de *Fomes* sp. EUM1 sugieren su potencial aplicación en procesos biotecnológicos, como lo es el tratamiento de los efluentes de la industria textil (Medina, 2003).

3. Justificación

La contaminación provocada por la industria textil es alarmante, la descarga de efluentes coloreados provenientes de las maquiladoras textiles representa un serio problema ambiental y una preocupación para la salud pública. En México, especialmente en el Estado de Tlaxcala, uno de los colorantes más utilizados es el índigo. Este colorante se emplea extensamente en la manufactura de prendas de mezclilla, actividad económica principal de muchas familias que habitan este lugar y cuyas empresas corresponden a negocios familiares en donde los recursos destinados al tratamiento de los efluentes son limitados.

En adición a esto, se sabe que las plantas de tratamiento que existen en la región son ineficientes para la remoción de los colorantes textiles por lo que estos compuestos se descargan inalterados a los ríos permaneciendo en el ambiente por largos periodos de tiempo y en ocasiones dando lugar a la formación de compuestos tóxicos o mutagénicos para la vida.

Por lo anterior, la remoción del color y toxicidad de los efluentes textiles se ha convertido en un desafío, y a la fecha no hay ningún tratamiento económicamente atractivo que permita remover con efectividad estos tintes (Juárez, 2008).

Recientemente, numerosos investigadores han enfocado sus esfuerzos a la degradación de los colorantes por medio de la utilización de hongos de pudrición blanca (Días *et al.*, 2003), sin embargo, debido a que el desarrollo de un tratamiento óptimo, depende de numerosas variables, aún queda mucho por hacer (Kandelbauer *et al.*, 2004).

Considerando que estudios previos han demostrado la capacidad de los hongos del género *Fomes* para sintetizar enzimas degradadoras de colorantes (Papinutti *et al.*, 2008) y teniendo en cuenta las características que poseen las lacasas producidas por *Fomes* sp. EUM1, es interesante la exploración de esta cepa como una nueva alternativa para el desarrollo de tecnologías útiles en el tratamiento de efluentes industriales.

Hasta ahora, se sabe que este hongo es capaz de producir lacasas en cultivo sólido sobre rastrojo de maíz, sin embargo, aún se desconoce que efecto tiene la suplementación de este sustrato con otras fuentes de carbono y nitrógeno. Más aún, se desconoce el comportamiento de estas enzimas durante su aplicación en un proceso biotecnológico.

Por lo anterior, en este trabajo se propuso la evaluación de distintos medios de cultivo en la producción de enzimas ligninolíticas y la aplicación de las mismas en la decoloración de un efluente simulado de la industria textil contaminado con índigo carmín.

Por otro lado, la evaluación de la decoloración del efluente se complementó con un bioensayo de toxicidad para valorar la respuesta de los organismos de prueba tanto a la presencia del índigo carmín como a sus productos de degradación. Todo esto con la finalidad de aportar información sobre las ventajas y limitaciones del uso de esta cepa en este tipo de procesos.

4. Hipótesis

Una estrategia basada en el cultivo sólido de *Fomes* sp. EUM1 sobre residuos lignocelulósicos será capaz de decolorar y detoxificar un efluente simulado de la industria textil contaminado con índigo carmín.

5. Objetivos

5.1 General

Proponer una estrategia para decolorar un efluente simulado de la industria textil contaminado con índigo carmín por medio del cultivo sólido de *Fomes* sp. EUM1 sobre residuos lignocelulósicos.

5.2 Específicos

- Propagar la cepa de *Fomes* sp. EUM1 en cultivo en placa Petri y realizar su conservación a largo plazo en agua destilada.
- Evaluar el efecto de mezclas de rastrojo de maíz con salvado de trigo, glucosa y extracto de levadura en la producción y productividad de enzimas ligninolíticas en cultivo sólido.
- Evaluar la decoloración de un efluente simulado de la industria textil contaminado con índigo carmín por medio de las siguientes estrategias de decoloración:
 - Decoloración por acción del material fermentado obtenido del cultivo sólido del hongo sobre residuos lignocelulósicos.
 - Decoloración por adsorción del índigo carmín sobre una mezcla de rastrojo de maíz con salvado de trigo.
 - Decoloración por acción de las enzimas presentes en el extracto crudo enzimático (ECE) obtenido a partir del cultivo sólido del hongo sobre una mezcla de rastrojo de maíz con salvado de trigo.

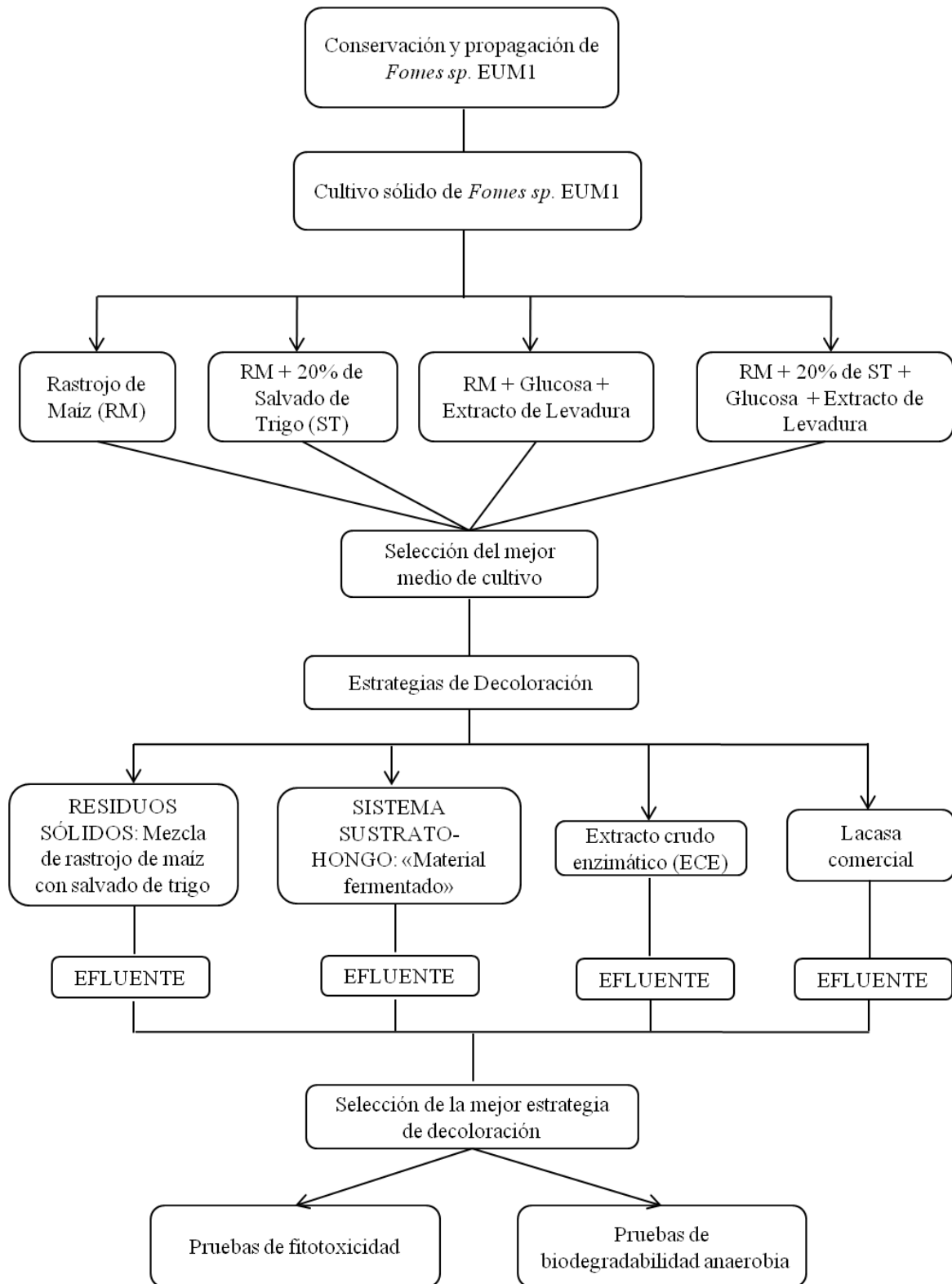
- Decoloración por acción de una lacasa comercial (Deni Lite II, Novozymes).

- Evaluar la actividad de una lacasa comercial y de las lacasas presentes en el ECE de *Fomes* sp. EUM1 en presencia de las condiciones de decoloración.

- Evaluar la toxicidad del efluente simulado antes y después de la decoloración del índigo carmín.

6. Materiales y Métodos

6.1 Esquema general de actividades



6.2 Microorganismo y preparación del inóculo

El hongo *Fomes* sp. EUM1 se aisló de residuos de madera en el estado de Yucatán y se seleccionó de entre otros hongos debido a su capacidad para oxidar el ABTS (2,2-azo-bis-(ácido etilbenzotiazol-6-sulfónico)) en medio sólido (Medina, 2003).

Para la preparación del inóculo, el hongo se cultivó en placas Petri que contenían 20 mL de agar extracto de malta (40 g/L) y extracto de levadura (3g/L) en infusión de rastrojo de maíz.

La infusión de rastrojo de maíz se preparó suspendiendo 5 g de rastrojo de maíz picado en 250 mL de agua destilada, la suspensión se mantuvo en agitación durante 20 min a 70 °C y después se filtró (Whatman #40). Debido a las pérdidas por evaporación, el volumen se ajustó nuevamente a 250 mL agregando agua destilada.

Las placas se inocularon con un disco de agar con micelio (6 mm diámetro) y se incubaron a 35 °C durante 7 días. El micelio así obtenido se utilizó como inóculo durante los cultivos en medio sólido.

6.3 Conservación de la cepa a largo plazo

La conservación de la cepa se realizó en viales con agua destilada estéril. Para ello, se utilizaron placas Petri con medio de cultivo fresco (*sección anterior*); en el centro de la placa se colocó un disco de agar con micelio del hongo (0.6 cm) y alrededor de este 5 tiras de papel Whatman N# 40 (aprox. 0.5 cm x 2 cm) distribuidas uniformemente. Después de mantener el cultivo en incubación a 40 °C durante 7 días las tiras de papel se retiraron y depositaron en viales que contenían 5 mL de agua destilada estéril y se almacenaron durante 5 meses a temperatura ambiente.

La viabilidad del hongo se determinó como velocidad de crecimiento radial (VCR) en mm/día. Para ello, se colocó un fragmento del papel filtro (aprox. 0.5 X 0.5 cm), utilizado durante la conservación, en el centro de una placa Petri conteniendo medio de cultivo fresco, las placas se incubaron a 35 °C durante 7 días. Con ayuda de un Vernier, se midió diariamente el diámetro de la colonia (en tres direcciones distintas) y con los valores obtenidos se calculó la velocidad de crecimiento radial del hongo. Los valores de VCR se compararon con los obtenidos del crecimiento de la cepa sin conservar. (Ordaz, 2008).

6.4 Cultivo en medio sólido

6.4.1 Sustratos

Los sustratos empleados fueron: rastrojo de maíz picado (RM) y salvado de trigo (ST). El rastrojo de maíz se tamizó y las partículas obtenidas de las mallas 6 (4.06 mm), 10 (2.52 mm) y 20 (0.61 mm) se mezclaron perfectamente y se utilizaron como sustrato. El salvado de trigo fue adquirido en el mercado local donde se encuentra disponible bajo el nombre de “Salvado Natural”.

6.4.2 Condiciones de cultivo

Los cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 3 g de sustrato seco humedecido con 13 mL de buffer de citratos (25 mM, pH 6.0) (8 mL se agregaron directamente y 5 mL se agregaron durante la inoculación).

Se evaluaron 4 medios de cultivo distintos:

1. Rastrojo de maíz (RM).
2. Mezcla de RM y Salvado de Trigo (ST) en proporción 80:20 (p/p).
3. RM adicionado con glucosa (G) (10 g/L) y extracto de levadura (EL) (5 g/L)
4. Mezcla de RM y (ST) en proporción 80:20 (p/p) adicionada con G (10 g/L) y EL (5 g/L).

En los medios suplementados con glucosa y extracto de levadura, la concentración de estos componentes en cada matraz fue de 0.13 y 0.065 g, lo que representó el 4.33 y 2.16% del sustrato seco, respectivamente.

Todos los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave (121 °C, 15 psi, 25 min) y posteriormente se inocularon con una suspensión de micelio preparada sumergiendo y posteriormente agitando 5 discos de agar con micelio (6 mm diámetro) en 5 mL de buffer de citratos (25 mM, pH 6.0). La incubación se realizó a 35 °C durante 12 días.

La cuantificación de la producción de enzimas se realizó diariamente en el extracto crudo enzimático (ECE) obtenido de cada cultivo. Todas las mediciones se realizaron por triplicado y en muestras independientes.

6.4.3 Obtención del extracto crudo enzimático (ECE)

Para la extracción de las enzimas extracelulares se agregaron 75 mL de agua destilada a cada matraz, agitando constantemente durante 30 minutos y manteniendo el matraz en un

baño de hielo durante todo el proceso. Posterior a esto, el contenido de los matraces se filtró a través de papel Whatman No. 40 y para eliminar los sólidos suspendidos, la fracción líquida se centrifugó a 10,000 rpm durante 12 minutos a 4° C (Centrifuge, Eppendorf 5402). El sobrenadante se utilizó durante los ensayos enzimáticos.

6.4.4 Determinaciones analíticas

-Actividad lacasa (Lac): Se determinó de acuerdo con el método descrito por Bourbonnais *et al.*, (1997) registrando la oxidación del ABTS ($\epsilon_{420\text{ nm}} = 36,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$), en un buffer de citratos (50 mM, pH 5.0) midiendo el incremento en la absorbancia cada 10 segundos durante 2 minutos a una longitud de onda de 420 nm a 40°C (DU 640 Beckman). La actividad enzimática se expresó en unidades internacionales por gramo de sustrato seco inicial (UI/gss), donde una UI se definió como la cantidad de enzima que oxida 1 μmol de ABTS por minuto bajo las condiciones de reacción.

-Actividad lignina peroxidasa (LiP): La actividad LiP se determinó por dos métodos. El primero se basó en la oxidación del alcohol veratrílico a veratrilaldehído. La mezcla de reacción consistió en 0.4 mL de buffer de tartrato de sodio (pH 3.0, 125 mM), 0.2 mL de alcohol veratrílico (10 mM), 0.2 mL de peróxido de hidrógeno (2 mM) y 0.2 mL de ECE. La reacción inició al agregar el H_2O_2 y el cambio en la absorbancia se determinó durante 3 minutos a una longitud de onda de 310 nm a 30 °C (DU 640 Beckman). Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μmol de veratrilaldehído por minuto (Tien y Kirk, 1988).

El segundo método se basó en la oxidación del colorante azure B (Sigma, Aldirch). La mezcla de reacción contenía 0.4 mL de buffer de tartrato de sodio (pH 3.0, 125 mM), 0.2 mL de azure B (0.160 mM), 0.2 mL de ECE y 0.2 mL de peróxido de hidrógeno (2 mM). La reacción inició con la adición del H_2O_2 y el cambio en la absorbancia se determinó durante 3 minutos a 651 nm a 25 °C (DU 640 Beckman). Una unidad de actividad enzimática se definió como un decremento en la densidad óptica de 0.1 unidades/min (Archibald, 1992).

-Actividad manganeso peroxidasa (MnP): Se determinó por medio de la oxidación del rojo de fenol ($\epsilon_{610\text{ nm}} = 22\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). La mezcla de reacción contenía: 50 μL de rojo

de fenol (0.01%), 50 μ L lactato de sodio (25 mM), μ L de $MnSO_4$ (100 μ M), 50 μ L albúmina de suero bovino (0.1 %), 50 μ L H_2O_2 (100 μ M) y 250 μ L buffer de succinato de sodio (pH 4.5, 20 mM) y 500 50 μ L de ECE en un volumen total de 1 mL. La reacción se llevó a cabo a 30°C por 5 min y se detuvo agregando 40 μ L de NaOH (2 N). La absorbancia se leyó a 610 nm (DU 640 Beckman) y la unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μ mol de rojo de fenol en un minuto (Kuwahara, *et al.*, 1984).

-Determinación de proteína extracelular: La proteína extracelular se determinó por el método de Bradford (1976). La mezcla de reacción consistió en 800 μ L de extracto enzimático y 200 μ L de reactivo de Bradford (Sigma Aldrich). Después de 5 minutos de reacción a temperatura ambiente se registró la absorbancia a 595 nm. El cálculo de la concentración de proteína se realizó mediante una curva estándar empleando albúmina de suero bovino (*Anexo I*). Los resultados se presentan como miligramos de proteína por gramo de sustrato seco inicial (mg/gss).

-Determinación de pH: Los cambios de pH durante el cultivo sólido se determinaron directamente de los extractos enzimáticos usando un potenciómetro (Conductronic pH120).

-Zimogramas

Se prepararon minigeles con 12% de acrilamida, los cuales se montaron y corrieron en una cámara mini-protean 2 (Bio Rad). La preparación de las soluciones y buffers requeridas durante el ensayo se realizó de acuerdo con Medina (2003).

El primer paso en la realización del zimograma fue el ensamble de los vidrios y espaciadores sobre la base de la cámara (Fig. 6.1).

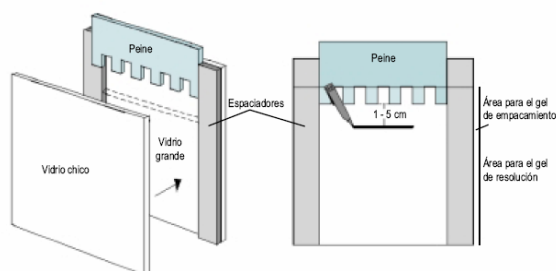


Fig. 6.1. Ensamble de los vidrios y espaciadores del dispositivo de moldeado del gel.

Una vez que se aseguró que el dispositivo no presentaba ninguna fuga, se procedió a la preparación de los geles (Fig. 6.2)

Gel de separación

- La solución de acrilamida se preparó de acuerdo con la Tabla 6.1. La solución se desgasificó durante 10 minutos por sonicación (Cole-Parmer 8892) y posteriormente se agregaron los catalizadores persulfato de amonio (APS) y N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina (TEMED) para iniciar la polimerización.
- Inmediatamente después, se agregaron aprox. 3.5 mL de la solución de acrilamida entre las placas de vidrio del dispositivo de moldeado. Posteriormente, se añadió una capa de isopropanol sobre la solución de acrilamida.
- El gel se dejó polimerizar a temperatura ambiente por aprox. 30 minutos, usando como control de polimerización la solución de acrilamida remanente.
- Una vez formado el gel, se descartó la capa de isopropanol y se lavó la parte superior del gel varias veces con agua desionizada hasta eliminar completamente los restos de acrilamida no polimerizada e isopropanol.

Gel de apilamiento

- Al igual que en el gel anterior, se mezclaron todos los componentes (Tabla 6.1) y se llevaron a desgasificar, posteriormente se agregaron los catalizadores agitando suavemente sin hacer burbujas.
- Luego, agregaron aprox. 2 mL de la solución entre los vidrios de la cámara (sobre el gel de separación ya polimerizado) e inmediatamente después, se colocó el peine entre ambos vidrios.
- El gel se dejó polimerizar a temperatura ambiente.
- Una vez formado, se retiró el peine cuidadosamente y se lavaron los pocillos con un poco de agua desionizada.

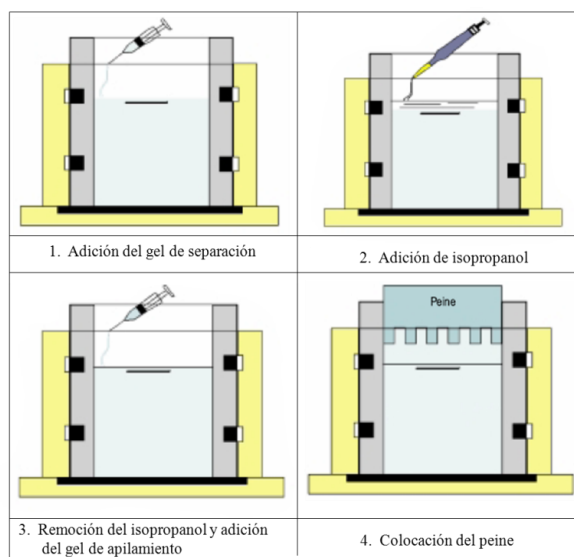


Fig. 6.2. Preparación del gel de poliacrilamida.

Tabla 6.1. Formulación de los geles de separación y apilamiento

	Agua desionizada (mL)	Acrilamida 30% (mL)	Buffer (mL)*	SDS 10% (mL)
Gel de separación. 12% acrilamida	3.4	4.0	2.5	0.1
Gel de apilamiento. 4% acrilamida	6.1	1.3	2.5	0.1

*Buffer para gel de Separación: 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

*Buffer para gel de apilamiento: 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

Inmediatamente antes de colocar el gel en el molde, se añadió (por cada 10 mL de solución:

Para el gel de Separación:

50 μ L de APS al 10% y

5 μ L TEMED

Para el gel de apilamiento:

50 μ L de APS al 10% y

10 μ L TEMED

Electroforesis

- Se colocó el dispositivo con los geles polimerizados en el tanque de corrida y se agregó al buffer de tanque asegurándose de que los pocillos estuvieran cubiertos por el buffer.
- Con ayuda de una micropipeta se colocaron 15 μ L de muestra en cada pocillo.
- Se cubrió el tanque con su tapa y se conectó a la fuente de poder.
- Se encendió la fuente de poder ajustando el voltaje a 150 V. La electroforesis terminó cuando el frente de corrida llegó a aprox. 1 cm de la parte inferior del gel.

- Los geles se desmontaron cuidadosamente y se colocaron en recipientes de plástico con agua desionizada, donde se lavaron durante 15 minutos con 3 cambios de agua.
- Finalmente se agregaron 50 mL de ABTS 50 mM en buffer de citratos (pH 5.0, 50 mM) para revelar las bandas con actividad lacasa (Téllez-Téllez *et al.*, 2005).

6.5 Pruebas de decoloración

6.5.1 Preparación del efluente simulado

Inicialmente se preparó una solución 0.05 M de NaCl empleando para ello agua desionizada con 18 mΩ-1 cm-1 de resistividad. Posteriormente se disolvieron 100 mg/L de índigo carmín (Sigma Aldrich) en la solución de NaCl preparada inicialmente. El pH del efluente simulado fue de 6.45.

6.5.2 Estrategias de decoloración

El efluente simulado se sometió a tres sistemas de tratamiento distintos, dos de ellos basados en cultivos del hongo sobre una mezcla de residuos agroindustriales, y un tercero basado en la adsorción del índigo carmín sobre la mezcla de residuos. Adicionalmente, se trabajó con una lacasa (Deni Lite II) producida industrialmente por Novozymes que se comercializa para su aplicación en el deslavado de prendas de mezclilla teñidas con índigo. La Tabla 6.2 muestra un breve resumen sobre los mecanismos que participaron en la remoción del colorante en cada uno de los tratamientos. La metodología detallada se describe en el texto.

Tabla 6.2. Estrategias de decoloración del efluente simulado

Mecanismo	Sistema Decolorante	Descripción
Adsorción	Mezcla de sustratos sólidos: RM-ST	Decoloración causada por la adsorción del índigo carmín sobre una mezcla de rastrojo de maíz-salvado de trigo.
Adsorción + Catálisis enzimática	Sistema sustrato-hongo: MF	Decoloración debida a la adsorción del índigo carmín sobre la mezcla de RM-ST y sobre el micelio del hongo. Decoloración causada por la acción de las enzimas sintetizadas por el hongo durante el cultivo en medio sólido.
Catálisis enzimática	Extracto crudo enzimático (ECE) Lacasa comercial (Novozymes)	Decoloración causada por la actividad de las enzimas presentes en el ECE de <i>Fomes</i> sp. EUM1 o por la lacasa comercial

A. Sistema sustrato-hongo “material fermentado”. El material fermentado se obtuvo por medio del cultivo del hongo en medio sólido. El sustrato utilizado se eligió de acuerdo con los resultados obtenidos durante las cinéticas de producción de enzimas y consistió en una mezcla de rastrojo de maíz-salvado de trigo en proporción 80:20 (p/p). Los cultivos se realizaron siguiendo la metodología descrita en la *sección 6.4.2*. Una vez concluido el periodo de incubación (6 días: máxima producción de lacasas), el contenido de 6 matraces (“material fermentado”) se mezcló perfectamente y se dividió en 4 partes de 20 g (peso húmedo) cada una. Tres de ellas se emplearon en los ensayos de decoloración y con la porción restante se realizó la extracción de enzimas (*sección 6.4.3*) y la cuantificación de la actividad lacasa. En este caso, la actividad lacasa se reporta como unidades internacionales por mililitro de extracto crudo enzimático (UI/mL de ECE).

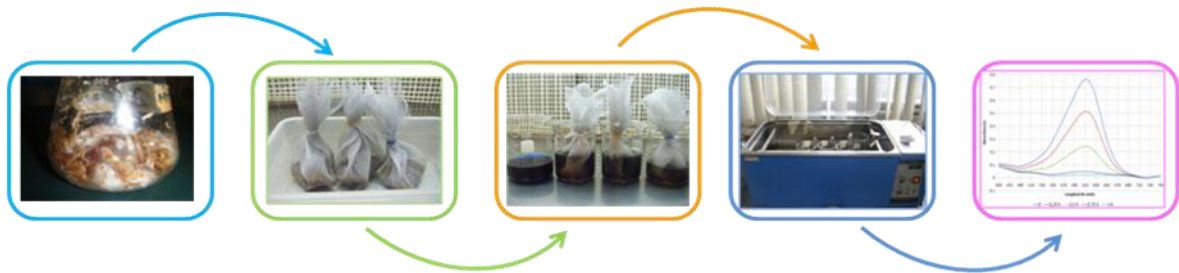


Fig. 6.3. Esquema general de la metodología empleada en las pruebas de decoloración.

Para la decoloración del efluente simulado se colocaron 20 g (peso húmedo) del material fermentado (MF) dentro de una malla plástica en forma de una bolsa, la cual se introdujo en un vaso de precipitados de 600 mL que contenía 200 mL del efluente simulado (Fig. 6.3). En un ensayo posterior se realizó el mismo procedimiento pero disminuyendo a 10 g (peso húmedo) la cantidad de MF. En ambos casos los vasos se incubaron en un baño de agua a 40 °C y en agitación a 100 rpm. *A intervalos de 1 h se determinó el porcentaje de decoloración (sección 6.5.5) y la actividad lacasa en el efluente en tratamiento. Los resultados de la actividad lacasa se reportan como actividad lacasa aparente debido a la probable interferencia del índigo carmín durante la cuantificación de la enzima.*

B. Mezcla de sustratos sólidos. Se colocaron 3 g de la mezcla rastrojo de maíz-salvado de trigo en matraces Erlenmeyer de 250 mL, el material se humedeció con 13 mL de buffer de citratos (pH 6.0, 25 mM) y posteriormente se llevó a esterilización en

autoclave (121°C, 15 psi, 25 min). Al término del proceso de esterilización el contenido de varios matraces se mezcló perfectamente para después colocar porciones de 20 g (peso húmedo) dentro de mallas plásticas. Las mallas se sumergieron dentro de vasos de precipitados que contenía 200 mL del efluente simulado y se llevaron a incubación a 40 °C en agitación a 100 rpm (Fig. 6.3). *A intervalos de 1 h se determinó el porcentaje de decoloración del efluente en tratamiento (sección 6.5.5)*

C. Extracto crudo enzimático (ECE): Los ensayos se realizaron en vasos de precipitado de 250 mL que contenían 18 U/L de lacasa comercial o de lacasa de *Fomes* sp. EUM1 en 100 mL de efluente simulado. La incubación, muestreo y análisis del efluente se llevó a cabo de la misma forma que en los ensayos anteriores.

6.5.3 Efecto de la velocidad de agitación en el proceso de decoloración mediado por el sistema sustrato-hongo

Para este ensayo se retomó la metodología empleada en la *sección 6.5.2 A* con la diferencia de que la incubación del sistema se realizó a 100, 50 y 0 rpm. En todos los casos la incubación se realizó en un baño de agua a 40°C (Fig. 6.3). El porcentaje de decoloración y la actividad lacasa en el efluente en tratamiento se determinaron a intervalos de 1 h durante 8 h.

6.5.4 Decoloraciones sucesivas empleando el sistema sustrato-hongo

Se sumergieron muestras de 20 g (peso húmedo) de MF en 200 mL del efluente simulado (efluente 1-decoloración 1) (*sección 6.4.2 A*). Tras 5 h de contacto el material se retiró de la solución y se sumergió en un nuevo efluente simulado recién preparado (efluente 2-decoloración 2). La incubación se realizó a una temperatura de 40 °C y en agitación a 100 rpm. El porcentaje de decoloración del efluente se determinó a intervalos de una hora durante 5 h durante ambas decoloraciones.

6.5.5 Cálculo del porcentaje de decoloración

Para calcular el porcentaje de decoloración (%D), se tomaron muestras del efluente a lo largo del periodo de tratamiento. Las muestras se diluyeron 5 veces en agua destilada y

posteriormente se analizaron por espectrofotometría (Varian Cary 50 Conc) realizando un barrido en un rango de longitudes de onda de 450 a 750 nm.

El % de decoloración se calculó de acuerdo con la fórmula:

$$\% \text{ de Decoloración} = \left(\frac{A_i - A_f}{A_i} \right) 100$$

En donde:

A_i = Absorbancia inicial a 609 nm (Longitud de onda de máxima absorción del índigo carmín)

A_f = Absorbancia final a 609 nm

6.6 Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*)

Se realizó una curva Dosis-Respuesta para evaluar los efectos fitotóxicos de las siguientes *soluciones problema* en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas de *Lactuca sativa* durante los primeros 5 días de crecimiento (Castillo, 2004).

- Efluente simulado de la industria textil (*sección 6.5.1*).
- Efluente simulado decolorado por acción del MF (Condiciones del tratamiento: El efluente fue tratado durante 5 h a 40°C en agitación constante a 100 rpm) (*sección 6.5.2 A*).
- Efluente simulado tratado con una lacasa comercial (Deni Lite II Novozymes) (Condiciones del tratamiento: El efluente fue tratado durante 1.5 h a 40°C en agitación constante a 100 rpm) (*sección 6.5.2 C*).
- Solución de NaCl 0.05 M.

Se realizaron 5 diluciones de cada solución problema (0, 25, 50, 75 y 100%) empleando para ello agua dura reconstituida (*preparación del agua dura reconstituida, Anexo III.1*).

El ensayo se realizó de acuerdo con la siguiente metodología:

1. Se colocaron 2 discos de papel filtro (Whatman #1) en placas de Petri de 9.5 cm de diámetro.

2. Se humedeció la base de papel filtro adicionando 4.5 mL de la solución problema (dilución correspondiente).
3. Con ayuda de unas pinzas, se colocaron 20 semillas en cada placa cuidando que el espacio entre cada semilla fuera equitativo. Se realizaron 4 repeticiones para cada dilución ensayada y como control se empleó agua dura reconstituida.
4. Las placas se taparon y posteriormente se guardaron en bolsas plásticas para evitar la pérdida de humedad.
5. La incubación se realizó en oscuridad a 22 ± 2 °C durante 5 días.
6. Terminado el periodo de exposición (5 días), se procedió a cuantificar el efecto en la germinación y en la elongación de la radícula e hipocótilo. En cada caso, se comparó el efecto generado en los organismos expuestos a la solución problema con respecto a la respuesta en los organismos del control negativo expuestos sólo al agua dura reconstituida.

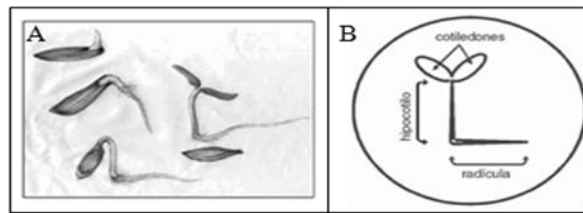


Fig. 6.4. Plántulas de *Lactuca sativa*. A) Estadios por los que atraviesa la semilla de *L. sativa* durante el ensayo de fitotoxicidad. B) Esquema de plántula de *L. sativa* al finalizar el periodo de ensayo (5 días de incubación).

Efecto en la germinación. Se registró el número de semillas que germinaron normalmente, considerando como criterio de germinación la aparición visible de la radícula.

Efecto en la elongación de la radícula e hipocótilo. Con ayuda de una regla se midió la longitud de la radícula e hipocótilo de cada una de las plántulas correspondientes a cada dilución de muestra y al control negativo. La medida de elongación de la radícula se consideró desde el nudo (región más engrosada de transición entre la radícula y el hipocótilo) hasta el ápice radicular. La medida de elongación del hipocótilo se consideró desde el nudo hasta el sitio de inserción de los dos cotiledones (Fig. 6.4 B).

6.7 Pruebas de biodegradabilidad anaerobia

Las pruebas de biodegradabilidad anaerobia se realizaron en lote en botellas serológicas de 60 mL, cada botella contenía 38 mL de la fuente de carbono (solución tratada con el material fermentado) y 2 mL de lodo metanogénico como inóculo (Durán, 2005). Dado que la muestra original presentó un valor de DQO elevado, se procedió a diluir el efluente en agua destilada. En la Tabla 6.3 se resume la preparación del experimento, todos los ensayos se realizaron por duplicado y como controles se utilizaron botellas con medio mineral Visser e inóculo pero sin fuente de carbono (*preparación del medio mineral Visser, Anexo III.2*).

Tabla 6.3. Pruebas de biodegradabilidad anaerobia.

Dilución	Medio mineral (mL)	Agua destilada (mL)	Efluente tratado con el MF (mL)	Lodo metanogénico (mL)	DQO (mg/L)*
Muestra directa (sin diluir)	0	0	38	2	2932 ± 75
Dilución 1:5	0	30.4	7.6	2	969 ± 70
Dilución 1:10	0	34.2	3.8	2	667 ± 190
Control	38	0	0	2	200.7 ± 2.5

*Los resultados muestran el promedio ± las diferencias entre los resultados de ensayos realizados por duplicado.

Las botellas se sellaron con tapones de neopreno y se realizó un intercambio de atmósfera burbujando nitrógeno a través de una aguja durante 1 minuto. Finalmente se incubaron a 35 °C durante 6 días. El biogás producido se cuantificó considerando su equivalencia con el volumen desplazado en tubos con solución salina (pH 2) conectados a las botellas (Fig. 6.5).



Fig. 6.5 Recolección de las muestras de biogás

6.7.1 Determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) (NMX-AA-030-SCFI-2001).

Esta técnica se realizó para determinar el contenido de materia orgánica susceptible de oxidación en la muestra con base al oxígeno equivalente determinado por el método de reflujo cerrado con dicromato de potasio (*Técnica para la determinación de la DQO, Anexo II*). Inicialmente, se realizó una curva estándar de DQO (mg/L) a diferentes concentraciones, los datos experimentales se ajustaron por regresión lineal para obtener una ecuación a partir de la cual se interpolaran los resultados obtenidos en el análisis de las muestras problema.

Ecuación:

$$DQO = \frac{(Absorbancia - 0.018)}{0.0004}$$

Donde los valores 0.0004 y 0.018 corresponden a la pendiente y ordenada al origen, respectivamente, del modelo ajustado ($r^2 = 0.988$).

Se realizó la determinación de la DQO de las siguientes soluciones (muestras problema):

- Efluente simulado de la industria textil (antes del tratamiento con el material fermentado).
- Efluente simulado tratado con el material fermentado
- Muestras empleadas durante las pruebas de biodegradabilidad anaerobia en tiempo 0 y al final del ensayo (6 días).

6.7.2 Determinación de metano y CO₂ por cromatografía de gases.

El análisis de la composición del biogás se realizó por cromatografía de gases en un equipo Gow-Mac con un detector de conductividad térmica (TCD), las condiciones de corrida se describen en la Tabla 6.4.

Tabla 6.4. Condiciones del análisis por cromatografía de gases.

Temperatura de la columna: 140 °C
Temperatura del detector: 190 °C
Temperatura del inyector: 170 °C
Empaque de columna: Carbosphere 80/100
Gas acarreador: Helio
Presión: 40 psi
Flujo: 25 mL/min
Polaridad: 120 mA
Volumen de inyección: 100 µL de biogás

6.7.3 Determinación de la eficiencia de eliminación de la DQO.

Al término del periodo de incubación el contenido de las botellas se homogeneizó perfectamente y se determinó el pH (Conductronic pH 120), posteriormente las muestras permanecieron en reposo para permitir la sedimentación del lodo metanogénico y emplear el sobrenadante para la cuantificación de la DQO final. La eficiencia en la remoción de la DQO (E) se determinó empleando la siguiente fórmula:

$$E = \frac{DQO_{inicial} - DQO_{final}}{DQO_{inicial}} \times 100$$

6.8 Análisis estadístico

El cálculo de medias, diferencias (en el caso de los ensayos realizados por duplicado) y desviaciones estándar se realizó con el programa Microsoft Excel (Microsoft Office 2007). Durante la evaluación del efecto de los diferentes medios de cultivo en la producción y productividad de lacasas, así como durante las pruebas de fitotoxicidad, se realizaron análisis de varianza y pruebas de comparación múltiple de medias por el método de Tukey utilizando el programa estadístico NCSS 2007.

7. Resultados y Discusión

7.1 Conservación de la cepa a largo plazo

La conservación del hongo se realizó en tiras de papel filtro sumergidas en agua destilada estéril, la viabilidad de la cepa se evaluó como velocidad de crecimiento radial (mm/día). Los resultados de las pruebas de viabilidad no mostraron diferencias significativas entre la velocidad de crecimiento radial (VCR) de la cepa conservada durante cinco meses y la cepa control (sin conservar) ($p=0.05$). La VCR de la cepa conservada durante 5 meses fue de 7.4 ± 0.6 mm/día, mientras que la de la cepa control fue de 7.2 ± 0.9 mm/día. Tampoco se observaron cambios en la morfología de crecimiento del hongo por lo que se concluye que el método aplicado es confiable para la conservación de la cepa al menos durante 5 meses.

7.2 Cultivo en medio sólido

La mayoría de los hongos de pudrición blanca son capaces de producir lacasas extracelulares en gran cantidad ya sea en cultivo líquido (CL) o sólido (CS) (Mazumder *et al.*, 2009). Sin embargo, el cultivo en medio sólido ofrece ventajas interesantes frente al CL, entre ellas:

- Una mayor producción de enzimas (Rodríguez y Sanromán, 2005).
- Mayor productividad de las enzimas excretadas (Mazumder *et al.*, 2009).
- Menor costo (Jing *et al.*, 2007).
- Es una técnica más sencilla, y además, la baja humedad evita la contaminación bacteriana (Mitra *et al.*, 1996).

En los últimos años se ha incrementado el estudio del sistema ligninolítico de los hongos de pudrición blanca tanto en CL como en CS, esto debido al potencial de estas enzimas para degradar una gran variedad de contaminantes. Desafortunadamente, muy pocos de estos hongos se han podido utilizar exitosamente en estos procesos (Maganhotto *et al.*, 2005), por lo que el estudio de nuevas especies y condiciones de cultivo continúa siendo un tema de gran interés para muchos investigadores alrededor del mundo.

Continuando con el estudio del hongo *Fomes* sp. EUM1, el presente trabajo se centró en la producción de enzimas ligninolíticas en CS que posteriormente se aplicaron en la decoloración de un efluente simulado de la industria textil.

Se sabe que muchos factores afectan la producción de las enzimas ligninolíticas en CS, entre ellos, el sustrato es uno de los más importantes, ya que de su adecuada selección depende el éxito de todo el proceso.

En este caso, el cultivo de *Fomes* sp. EUM1 se realizó en cuatro medios basados en el empleo de rastrojo de maíz como sustrato. Los medios probados fueron:

1. Rastrojo de maíz (RM).
2. Mezcla de RM y Salvado de Trigo (ST) en proporción 80:20 (p/p).
3. RM adicionado con glucosa (G) (10 g/L) y extracto de levadura (EL) (5 g/L)
4. Mezcla de RM y (ST) en proporción 80:20 (p/p) adicionada con G (10 g/L) y EL (5 g/L).

Las condiciones de temperatura, tamaño de inóculo, tamaño de partícula del sustrato y humedad se ajustaron según lo reportado por Ordaz, (2008).

Bajo las condiciones probadas, se observó el desarrollo de micelio fúngico en todos los medios de cultivo. La primera observación de micelio se detectó 2 a 3 días después de la inoculación, mientras que la completa invasión del sustrato se observó después de 6 a 8 días (Fig. 7.1). Estas observaciones coinciden con lo reportado por Elisashvili *et al.*, (2008), quienes encontraron una completa colonización del sustrato entre los 7 y 9 días de incubación de 7 basidiomicetos; el sustrato empleado fue salvado de trigo y hojas del árbol *Fagus sylvatica*. De forma similar, Murugesan *et al.*, (2007) observaron el crecimiento micelial de *Ganoderma lucidum* después de 24 h de incubación y la completa colonización del sustrato dentro de los siguientes 5 días.

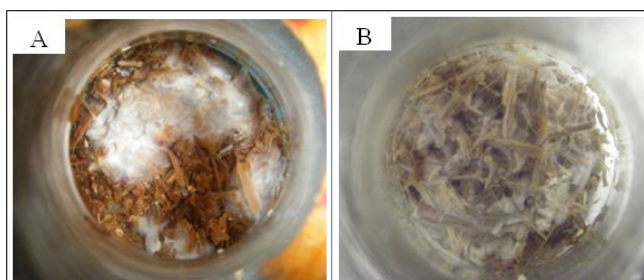


Fig. 7.1. Desarrollo del micelio fúngico durante el cultivo de *Fomes* sp. EUM1 sobre rastrojo de maíz. A) 6 días de cultivo, B) 12 días de cultivo

7.2.1 Producción de proteína extracelular durante el cultivo sólido

Los perfiles de producción de proteína extracelular durante el cultivo de *Fomes* sp. EUM1 muestran que las máximas producciones se obtuvieron 6 a 10 días después de la inoculación.

La máxima producción ocurrió en los medios de cultivo suplementados con 20% de salvado de trigo (Fig. 7.2), siendo de 6.8 y 6.6 mg/gss para el medio 1 y 4, respectivamente.

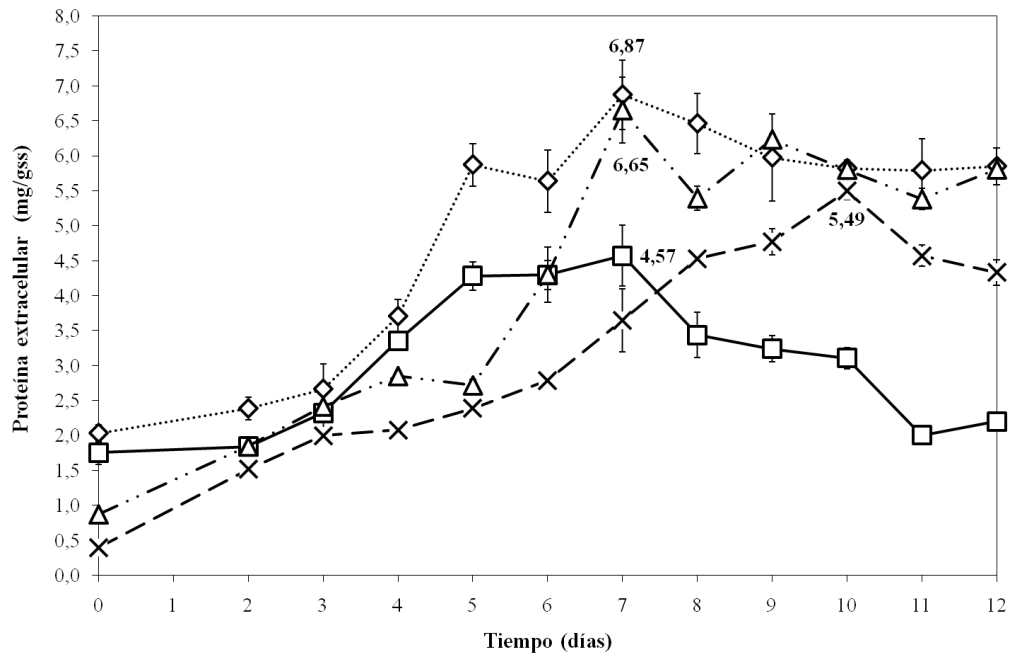


Fig.7.2. Producción de proteína extracelular durante el cultivo de *Fomes* sp. EUM1. Medio 1) Rastrojo de maíz (□), Medio 2) Rastrojo de maíz con salvado de trigo (◇), Medio 3) Rastrojo de maíz, glucosa y extracto de levadura (X), Medio 4) Rastrojo de maíz, salvado de trigo, glucosa y extracto de levadura (Δ).

7.2.2 Cambios de pH durante el cultivo

Se ha reportado que la producción de enzimas lignocelulolíticas en CS se afecta drásticamente cuando el pH del medio está por debajo de 5 o por arriba de 7 (Ordaz, 2008). Debido a esta influencia del pH sobre la producción de enzimas, se realizó la determinación del pH en los ECE obtenidos diariamente en cada medio de cultivo.

El pH inicial del medio fue cercano a 6, la adición del buffer de citratos al inicio de la cinética permitió mantener este valor casi constante durante los primeros 4 días de incubación (Fig. 7.3). A partir del 5° día el pH empezó a elevarse en los cultivos que contenían rastrojo de maíz con salvado de trigo, mientras que en los demás medios esta elevación comenzó 24 h después.

A partir de este punto se observó un aumento constante del pH hasta alcanzar su máximo valor entre los días 10 y 11. No se encontraron diferencias significativas entre los valores máximos de pH obtenidos en los 4 medios de cultivo ($p < 0.05$). Los incrementos en el pH podrían estar relacionados con la degradación de las proteínas por acción de enzimas proteolíticas. (Ordaz, 2008).

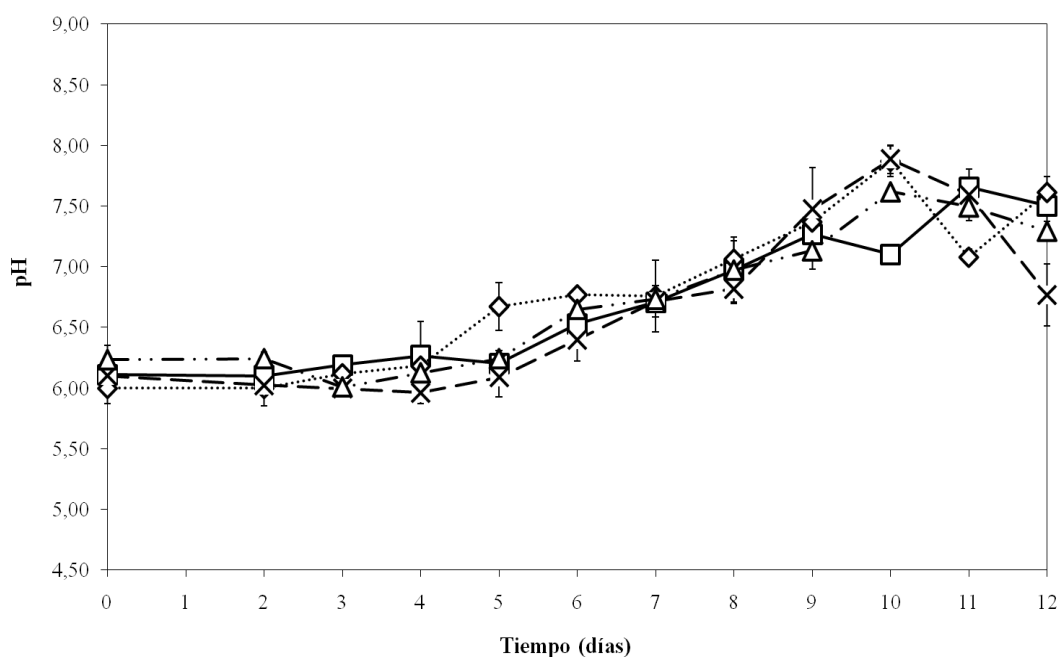


Fig. 7.3. Cambios de pH durante el cultivo de *Fome* sp. EUM1 sobre los diferentes medios de cultivo. Medio 1) Rastrojo de maíz (□), Medio 2) Rastrojo de maíz con salvado de trigo (◇), Medio 3) Rastrojo de maíz, glucosa y extracto de levadura (X), Medio 4) Rastrojo de maíz, salvado de trigo, glucosa y extracto de levadura (Δ).

7.2.3 Producción de enzimas ligninolíticas

En ninguno de los cultivos se detectó actividad LiP ni MnP, lo que sugiere que el hongo no sintetiza estas enzimas o que las condiciones de cultivo no fueron adecuadas para su producción. Por el contrario, la producción de lacasas presentó características particulares en cada uno de los sustratos ensayados. Los perfiles de producción obtenidos en cada medio de cultivo se muestran en la Fig. 7.4.

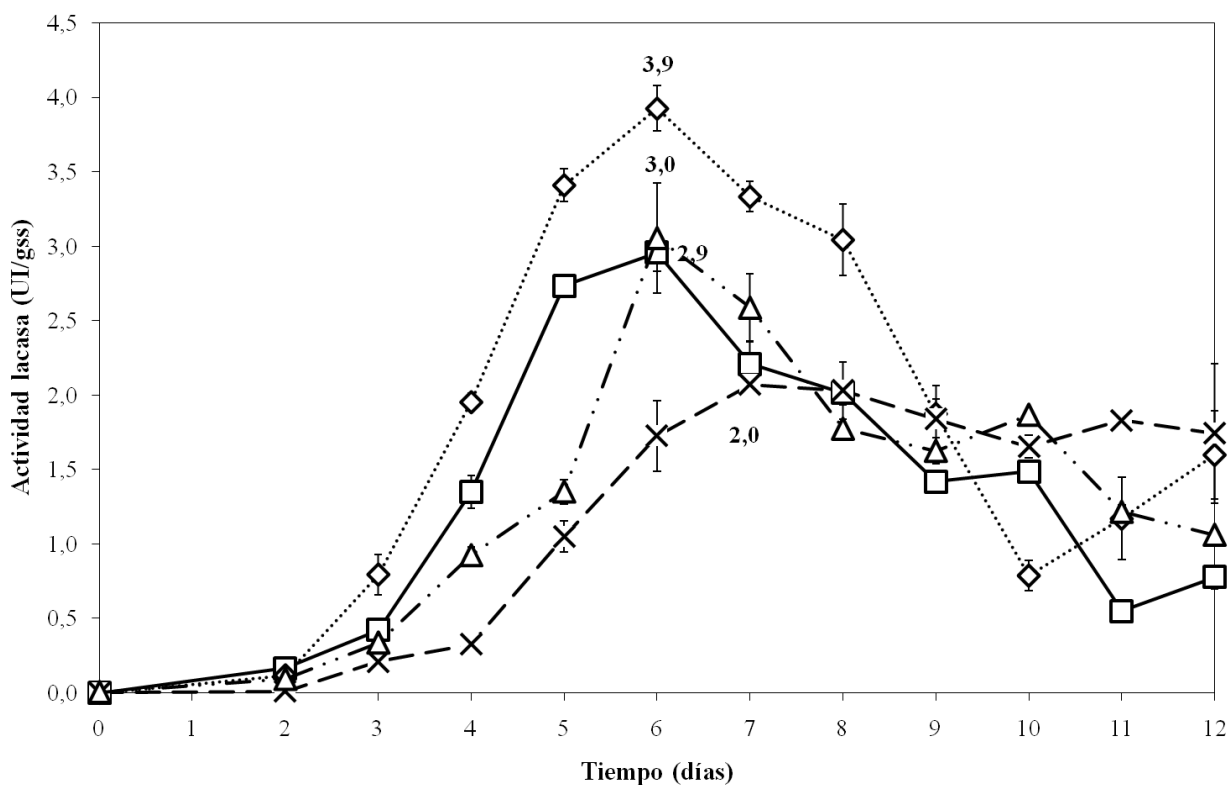


Fig. 7.4. Cinética de producción de lacasas por *Fomes* sp. EUM1 en diferentes medios de cultivo. Medio 1) Rastrojo de maíz (□), Medio 2) Rastrojo de maíz con salvado de trigo (◇), Medio 3) Rastrojo de maíz, glucosa y extracto de levadura (X), Medio 4) Rastrojo de maíz, salvado de trigo, glucosa y extracto de levadura (Δ).

En general, la producción de lacasas inició 2 días después de la inoculación y continuó incrementándose durante los siguientes 4 o 5 días dependiendo del medio de cultivo. A partir de las 72 h, la mayor actividad lacasa se detectó en el medio 2 (RM-ST), situación que se mantuvo durante los siguientes 5 días.

Hacia el 6° día se obtuvo el pico de máxima producción en tres de los cuatro medios evaluados:

- Medio 1) Rastrojo de maíz
- Medio 2) Mezcla de rastrojo de maíz con salvado de trigo
- Medio 4) Mezcla de rastrojo con salvado, Glucosa y Extracto de levadura

Las producciones alcanzadas fueron de 2.9, 3.9 y 3.0 UI/gss, respectivamente.

En la Fig. 7.4 puede observarse que el enriquecimiento del rastrojo de maíz con salvado de trigo, glucosa y extracto de levadura no modificó la producción de lacasas (comparando con el medio 1), por el contrario, el empleo de rastrojo de maíz suplementado únicamente con salvado de trigo afectó positivamente la producción, mejorándola 1.34 veces respecto a la obtenida en el medio 1 (RM).

Se sabe, que en cultivo sólido la producción de lacasas se favorece por la presencia de residuos lignocelulósicos, los cuales en su mayoría se encuentran formados por polisacáridos (celulosa y hemicelulosa), lignina (Jing *et al.*, 2007), compuestos aromáticos y microelementos que se liberan durante el cultivo y que son capaces de estimular la síntesis de enzimas ligninolíticas (Elisashvili *et al.*, 2008). En el presente estudio, la elevada producción de lacasas en el medio suplementado con salvado de trigo, pudo deberse a la composición nutricional del mismo, el cual no sólo contó con los elementos aportados por el rastrojo de maíz (Tabla 7.1), sino que además, la composición del salvado de trigo contribuyó en gran medida a la producción de estas enzimas; este sustrato es rico en polisacáridos, proteínas, sales inorgánicas y compuestos fenólicos solubles (ácido ferúlico, cumárico y siríngico), que lo convierten en uno de los sustratos ideales para la producción de enzimas ligninolíticas (Jing *et al.*, 2007).

Tabla 7.1 Composición del rastrojo de maíz y salvado de trigo (%)

Sustrato	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina	Proteína
Rastrojo de maíz	42.6	21.3	8.2	5.2
Salvado de trigo	10-15	30	4-8	15-22

(Peiji *et al.*, 1997; Neifar *et al.*, 2009)

La producción de lacasas en cultivo sólido sobre ST se ha reportado en numerosas ocasiones (Jing *et al.*, 2007; Papinutti *et al.*, 2008; Campos *et al.*, 2001; Murugesan *et al.*,

2007; Elisashvili *et al.*, 2008; Neifar *et al.*, 2009). En menor medida se ha reportado, la producción de estas enzimas empleando RM, el cual es un residuo económico y sobre todo muy abundante en muchas regiones de México.

Además, se cuenta con escasa información acerca del sistema ligninolítico de las especies del género *Fomes*. Songulashvili *et al.*, (2007), estudiaron la producción de lacasas y MnP (en CL) de 18 basidiomicetos de varios géneros, entre ellos, dos cepas de *Fomes fomentarius*. En la cepa *F. fomentarius* 649 encontraron producciones de lacasas de 8970 y 960 U/L, empleando ralladura de mandarina (MP) y residuos de la producción de etanol (REP), respectivamente; mientras que en *F. fomentarius* 938, la mayor producción se obtuvo sobre REP, siendo de 5970 U/L, y de 2280 U/L sobre MP. En cuanto a la producción de MnP, sólo se encontró actividad en la cepa 649 crecida en ralladura de mandarina donde su producción fue de 30 U/L. Más tarde, Neifar *et al.*, (2009), reportaron la producción de lacasas (en CS) por *Fomes fomentarius* (MUCL 35117) sobre ST suplementado con sulfato de cobre, en este caso la producción máxima obtenida después de 20 días fue de 9626 U/L; estos autores, también encontraron que un aumento en el tamaño de partícula del sustrato (de 0.2-1.0 mm a 1-5 mm) da lugar a una elevación en la producción de lacasas de hasta 1.5 veces. Si se comparan los valores anteriores con la máxima producción de lacasas de *Fomes* sp. EUM1, su producción queda muy por debajo, sin embargo, hay que considerar que en este trabajo no se agregaron inductores para la síntesis de estas enzimas.

Por otro lado, si se compara la producción de *Fomes* sp. EUM1 con la reportada para *Pleurotus ostreatus* (0.52 UI/gss) sobre una mezcla de bagazo con ST, la producción de *Fomes* sp. EUM1 resulta ser 7.5 veces mayor (Sugimoto *et al.*, 2001). Más aún, si se le compara con la producción de *Pleurotus ostreatus* (0.073 UI/gss) crecido en CS sobre paja de trigo, la producción de *Fomes* sp. EUM1 es hasta 53 veces mayor (Valascová y Baldrian, 2006).

Ciertamente, se ha demostrado que algunos hongos son capaces de producir lacasas en magnitudes mayores, por ejemplo, Papinutti *et al.*, (2003), encontraron una elevada producción de lacasas por *Fomes sclerodermeus*, crecido sobre ST. Su producción máxima fue de 270 UI/gss después de 28 días de incubación. También se determinó que la adición de sulfato de cobre, sulfato de amonio, glucosa o extracto de malta, no incrementó la producción de estas enzimas. En estos medios de cultivo también se cuantificó la

producción de LiP y MnP, sin embargo, en ninguno de ellos se detectó actividad LiP, mientras que la máxima producción de MnP fue de 6.3 U/gss a los 14 días de incubación. Más recientemente, Murugesan *et al.*, (2007), obtuvieron una producción de 2540 U/gss después de 7 días del cultivo de *Ganoderma lucidum* sobre ST.

Por su parte, algunos investigadores se han dado a la tarea de buscar las condiciones óptimas para la producción de enzimas ligninolíticas. En un estudio sobre la optimización de la producción de lacasas por *Trametes versicolor* en CS, Jing *et al.*, (2007) determinaron que el medio de cultivo óptimo para este fin era aquel formulado por 10.8% de glucosa, 27.7% de salvado de trigo, 9.0% de sulfato de amonio y 52.2% de agua. La actividad lacasa esperada para este medio fue de 18.16 U por gramo de materia seca. Por su parte, Levin *et al.*, (2008), también realizaron la optimización de la producción de lacasas en CS pero empleando madera de álamo (aserrín y virutas) y extracto de malta como sustratos. Los factores analizados fueron: pH inicial, concentración de cobre (CuSO₄) y concentración de nitrógeno (en forma de peptona). En este caso, las condiciones óptimas de cultivo consistieron en un pH inicial de 4.5, 12.5 g/L de peptona y CuSO₄ en una concentración de 11 mM. Las actividades esperadas para *Trametes trogii* en estas condiciones fueron: lacasa, 901 U/gss y MnP, 20 U/gss. De igual manera, la optimización del medio de cultivo para *Fomes* sp. EUM1 podría elevar su producción de lacasas favoreciendo su aplicación en el tratamiento de aguas residuales industriales o en otros procesos biotecnológicos.

Es de señalar, que en los casos anteriores, la producción de lacasas se realizó a temperaturas menores a los 30 °C, en contraparte, *Fomes* sp. EUM1 es capaz de crecer y producir estas enzimas a temperaturas mayores a 40 °C (Ordaz, 2008).

Otro de los parámetros importantes durante los procesos de producción de enzimas es la *productividad*, es decir, la velocidad con la que el hongo produce sus enzimas. En la Fig. 7.5 puede observarse que la mayor y menor productividad de lacasas se obtuvieron en los medios de cultivo 2 y 3, respectivamente (p<0.01). El enriquecimiento del rastrojo de maíz con un 20% de salvado de trigo permitió incrementar la productividad de lacasas de 0.59 a 0.68 UI/gss*día, por el contrario, la adición de glucosa y extracto de levadura disminuyó este valor casi en un 50%.

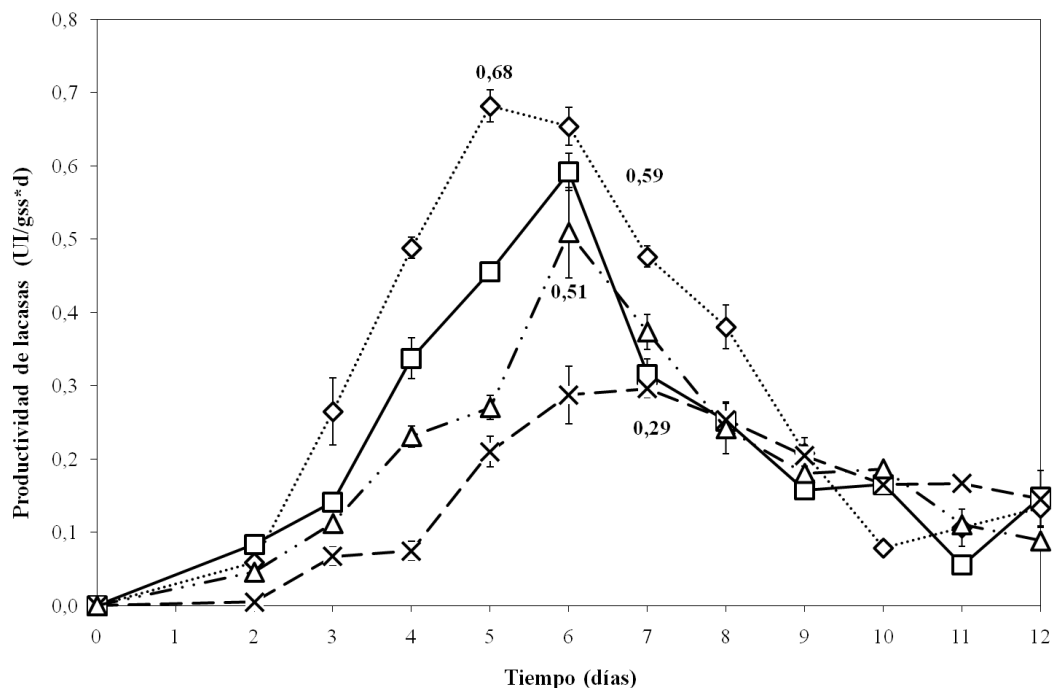


Fig. 7.5. Productividad de lacasas en *Fomes* sp. EUM1 en los diferentes medios de cultivo. Medio 1) Rastrojo de maíz (□), Medio 2) Rastrojo de maíz con salvado de trigo (◇), Medio 3) Rastrojo de maíz, glucosa y extracto de levadura (X), Medio 4) Rastrojo de maíz, salvado de trigo, glucosa y extracto de levadura (Δ).

Por otra parte, el enriquecimiento de los residuos lignocelulósicos con glucosa para su uso como sustrato en los cultivos en medio sólido, se ha aplicado en numerosas ocasiones. Vares *et al.*, (1995) realizaron la producción de enzimas ligninolíticas por *Phlebia radiata* empleando paja de trigo adicionada con glucosa (0.15 g/100g de paja); Murugesan *et al.*, (2007), obtuvieron una elevada producción de lacasas por *Ganoderma lucidum*, empleando salvado de trigo humedecido con un medio de cultivo de baja concentración de nitrógeno y 2 g/L de glucosa. Asimismo, se ha encontrado que la adición de glucosa y fuentes adicionales de nitrógeno, estimula la producción de lacasas en *Ceriporiopsis subvermispora* creciendo en CS sobre materiales lignocelulósicos (Brasil de Souza-Cruz, *et al.*, 2004).

El enriquecimiento de los residuos lignocelulósicos con una fuente extra de carbono y nitrógeno se realiza con base en el hecho de que en algunos hongos, la producción de lacasas se asocia con la producción de biomasa, así, la adición de nutrientes que

favorezcan el crecimiento podría también incrementar la producción de estas enzimas (Papinutti *et al.*, 2003).

En *Fomes* sp. EUM1, la adición de glucosa y extracto de levadura como fuente adicional de carbono y nitrógeno, no dió lugar a una elevación en los niveles de producción (Fig. 7.4). En el medio 3, formulado con rastrojo de maíz, glucosa y extracto de levadura, la producción de lacasas disminuyó un 30% en comparación con los resultados obtenidos en el medio 1 (Rastrojo de Maíz), y en el medio 4, (RM+ST+G+EL), la producción alcanzada fue igual a la obtenida en el medio 1 (RM), lo que correspondió a una disminución de más del 25% en comparación con el medio 2 (RM+ST).

Si bien es cierto que en algunos hongos *no* se han encontrado fenómenos de represión por carbono aún cuando la concentración de glucosa es de hasta 100 g/L (Viniegra y Favela, 2006), los resultados obtenidos para *Fomes* sp. EUM1 podrían deberse a un mecanismo de esta naturaleza ó a una inhibición por nitrógeno, ya que se sabe que este elemento también posee un fuerte efecto regulador sobre la maquinaria ligninolítica de los hongos de pudrición blanca (Jiménez *et al.*, 1999).

En cuanto a los perfiles de producción de lacasas, generalmente se observa un decaimiento en la actividad enzimática una vez que se ha alcanzado un nivel máximo (Ordaz, 2008). En *Fomes* sp. EUM1 se observó este tipo de perfil en los medios 1, 2 y 4 (RM, RM-ST y RM-ST-G-EL), no obstante, la producción de lacasas en el medio 3 (RM-G-EL) presentó un perfil distinto. En este caso, la producción se elevó suavemente durante los primeros 7 días, alcanzando en este tiempo una producción máxima de 2.07 UI/gss, después de este punto, *no* se presentó un decaimiento en la producción, sino que ésta se mantuvo *constante* durante los siguientes días y hasta el final del ensayo. Aunque en este medio se obtuvo la menor producción de enzimas ($p < 0.01$), fue el único en el que la actividad se mantuvo estable. Este fenómeno podría explicarse en función de una modificación en la producción de proteasas, ya que como lo demostraron Farani De Souza *et al.*, (2006), en cultivo sólido, los hongos de pudrición blanca son capaces de producir proteasas a la par de la producción de enzimas ligninolíticas. Por lo anterior, es frecuente atribuir parte de la caída de la actividad enzimática a la destrucción de las *enzimas* por acción de *proteasas*. Esto explicaría, los perfiles de actividad lacasa obtenidos en los medios 1, 2 y 4.

En contraparte, en el medio 3 la presencia de extracto de levadura como fuente adicional de nitrógeno podría haber causado una disminución en la producción de proteasas,

permitiendo mantener prácticamente constante la actividad lacasa a lo largo de los últimos 6 días del cultivo. En todo caso, sería indispensable la cuantificación de proteasas a lo largo de una cinética, antes de realizar conclusiones al respecto.

Finalmente, aunque el medio 4 (RM + ST + G + EL) también fue adicionado con extracto de levadura, en éste *no* se observaron niveles constantes de actividad lacasa a lo largo del tiempo. El hecho puede atribuirse a un efecto combinado causado por la adición simultánea de los tres suplementos (ST, G, EL), en donde cada uno generó un efecto particular.

Si se retoman los resultados obtenidos en los demás medios se tiene que:

- 1.- La adición de salvado de trigo incrementó la producción de lacasas (medio 2)
- 2.- La glucosa y/o el Extracto de levadura disminuyeron la producción de lacasas (medios 3 y 4)
- 3.- El extracto de levadura favoreció que la actividad lacasa permaneciera estable a lo largo del cultivo (medio 3).

Por otro lado, se ha encontrado que el salvado de trigo favorece la producción de proteasas en cultivos en medio sólido (Boer y Peralta, 2000; Haq y Mukhar, 2004; Macchione *et al.*, 2008), por lo que presumiblemente, la adición de este elemento en los medios 2 y 4 también favoreció la síntesis de proteasas impidiendo mantener constante la producción de lacasas a lo largo de la cinética (aún en presencia de extracto de levadura). De esta forma, el perfil de producción observado en el medio 4, mostró el efecto de la interacción entre el aumento de la producción de *lacasas* y *proteasas* causado por la presencia de salvado de trigo y la represión de la síntesis debida a la adición de glucosa o extracto de levadura.

7.2.2 Zimograma

Los hongos de pudrición blanca producen varias isoenzimas de oxidasas y peroxidasas extracelulares que en la naturaleza participan en la degradación de la lignina. Estas enzimas presentan baja especificidad de sustrato por lo que son capaces de oxidar un amplio espectro de compuestos estructuralmente distintos, entre ellos, compuestos fenólicos tóxicos y colorantes textiles (Palmieri *et al.*, 2000).

Con la finalidad de evaluar la expresión diferencial de isoenzimas de lacasas en *Fomes* sp. EUM1, se realizaron zimogramas utilizando muestras de los ECE obtenidos en los días de máxima producción de lacasas para cada medio de cultivo (Fig. 7.6).

En un primer ensayo se trabajó con las muestras directas obtenidas del proceso de extracción sin dilución ni ajuste de concentraciones (zimograma 1) y en un segundo ensayo (zimograma 2) se homogeneizó la cantidad de proteína extracelular colocando 3.4 µg de proteína en cada pozo. Ambos zimogramas fueron revelados utilizando ABTS como sustrato.

El primer zimograma mostró la aparición de 2 bandas de oxidación del ABTS en la muestra proveniente del cultivo del hongo sobre el medio 2 (Fig. 7.6A), sin embargo, al repetir el ensayo (zimograma 2) la banda inferior (más débil) no se detectó (Fig. 7.6B).

Debido a que la concentración de proteína en el extracto del medio 2 fue mayor, éste se diluyó hasta igualar su concentración con la de las demás muestras. Probablemente la ausencia de la segunda banda de oxidación en el zimograma 2 se debió a la baja actividad lacasa que quedó en el ECE después de su dilución. El resultado deberá corroborarse posteriormente.

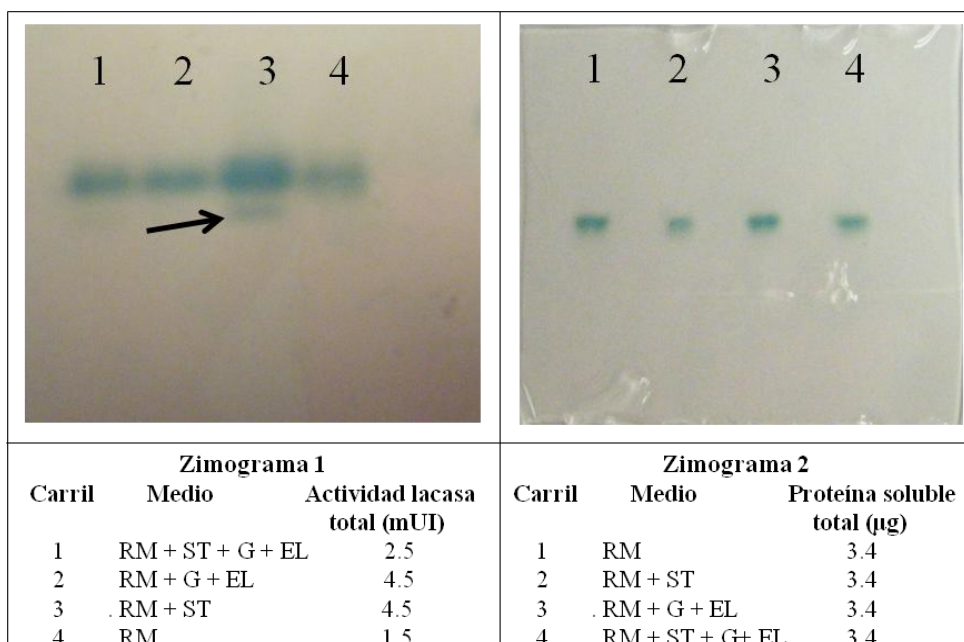


Fig. 7.6. Zimogramas obtenidos con el extracto crudo enzimático (ECE) de los distintos medios. La flecha muestra la segunda banda de oxidación del ABTS en la muestra proveniente del cultivo del hongo en el medio 2 (RM+ST).

La expresión diferencial de genes de lacasas se ha reportado en algunos hongos; *Trametes* sp. I-62 posee 3 secuencias genómicas que corresponden a lacasas y que se expresan diferencialmente en respuesta a la presencia de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo (Arora y Sharma, 2009), *Rhizoctonia solani*, posee 4 secuencias distintas que codifican para lacasas, *Trametes villosa*, contiene más de 5 genes de lacasa y en *Agaricus bisporus* se han encontrado 2 genes que codifican para estas enzimas (Palmieri *et al.*, 2000).

Por otro lado, mediante la extracción de las lacasas a diferentes etapas del crecimiento del hongo, se ha encontrado que los patrones de producción de isoenzimas varían en respuesta al nivel de degradación de la lignina a un determinado tiempo de incubación (Vares *et al.*, 1995). Resultados similares se publicaron por Téllez-Téllez *et al.*, (2008), quienes trabajando con el cultivo en medio sólido del hongo *Pleurotus ostreatus*, encontraron que el patrón de producción de isoenzimas de lacasas se modifica en función del tiempo de incubación, encontrándose la presencia de una isoenzima durante la fase lag, dos o probablemente tres en la fase exponencial de crecimiento y dos durante la fase estacionaria. Bajo este contexto, se ha reportado que aquellas isoenzimas que aparecen durante la fase lag o exponencial de crecimiento podrían estar relacionadas con la degradación del sustrato, mientras que las que aparecen durante la fase estacionaria podrían relacionarse con procesos de morfogénesis y pigmentación del hongo (Temp y Eggert, 1999).

Existen pocos estudios sobre la producción de lacasas en cepas del género *Fomes*, la especie más estudiada corresponde a *Fomes sclerodermeus*, así, Papinutti *et al.*, (2008) determinaron que el hongo *F. sclerodermeus* produce tres isoenzimas de lacasa en cultivo sólido sobre salvado de trigo, además, determinaron que estas formas alternativas de la enzima exhiben diferentes patrones de sensibilidad térmica y afinidad por el colorante verde de malaquita. Estos hallazgos toman importancia al considerar que el objetivo principal de este trabajo fué utilizar las enzimas de *Fomes* sp. EUM1 para la decoloración del índigo carmín.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, puede concluirse que la producción de distintas isoenzimas de lacasas depende de factores como: la especie fúngica y su fase de crecimiento, la composición del medio de cultivo y las condiciones operacionales durante

el mismo (CL o CS). Además, que las isoenzimas de lacasa pueden exhibir distintos patrones de inactivación térmica y afinidad por su sustrato.

7.3 Pruebas de decoloración

Entre los microorganismos capaces de degradar colorantes textiles, los hongos de pudrición blanca son los mejor conocidos. Estos organismos sintetizan una serie de enzimas intracelulares y extracelulares que contribuyen con el proceso de decoloración. Además, la estructura macromolecular de su pared actúa como soporte, permitiendo la adsorción del colorante sobre ella y contribuyendo así con la remoción del mismo.

La mayor parte de los trabajos de decoloración de colorantes textiles se han enfocado en la degradación enzimática de los mismos empleando enzimas purificadas o semi-purificadas (lacasas o peroxidadas). Desafortunadamente, aunque estos trabajos muestran la eficiencia de estas enzimas para degradar el colorante, el costo de los procesos de producción y purificación de las enzimas continúa siendo el paso limitante para su aplicación a gran escala.

Retomando los resultados obtenidos durante los ensayos de producción de enzimas (*sección 7.2.1*) se seleccionó el medio de cultivo 2 (RM+ST) como el mejor medio para la producción de lacasas.

A partir del cultivo de *Fomes* sp. EUM1 sobre este medio se probó su capacidad para decolorar un efluente simulado de la industria textil contaminado con índigo carmín. Los resultados de estos ensayos se muestran a continuación.

7.3.1 Estrategias de decoloración

- Decoloración por adsorción y catálisis enzimática: Sistema sustrato-hongo. Este sistema permitió evaluar la remoción del colorante por medio de la interacción entre mecanismos de adsorción (sobre el sustrato residual y el micelio fúngico) y catálisis enzimática (enzimas fúngicas sintetizadas durante el cultivo). El material fermentado (MF) (20 g peso húmedo) obtenido al cultivar al hongo sobre la mezcla de rastrojo de maíz-salvado de trigo fue capaz de decolorar más del 80% del índigo carmín después de 4 h de incubación a 40°C. En la Fig. 7.7 2B se muestran los espectros de absorción del efluente simulado durante el tratamiento con el MF.

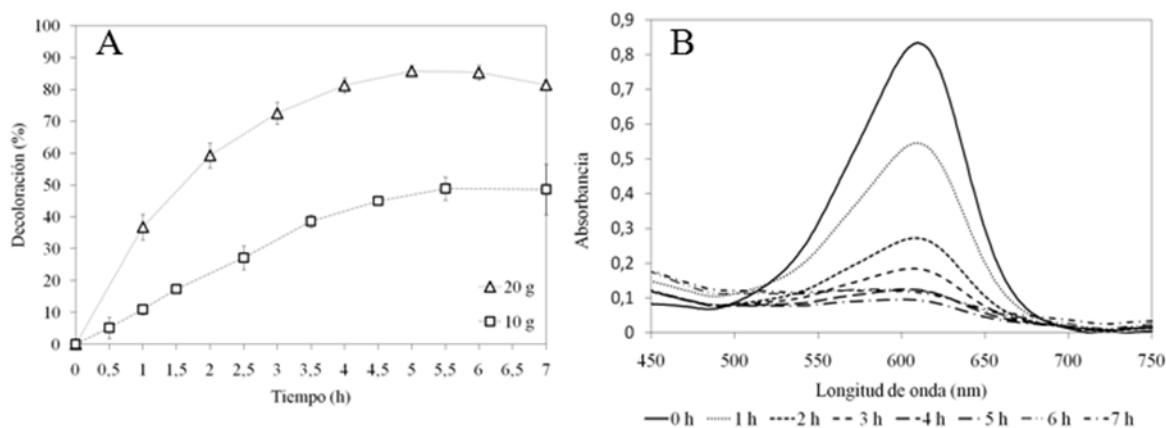


Fig. 7.7 Decoloración del índigo carmín por acción del MF. A) Cinética de decoloración: 10 y 20 g de MF, los tratamientos se realizaron en agitación a 100 rpm y en incubación a 40°C. Los datos indican los promedios \pm la desviación estándar de experimentos realizados por triplicado. B) Espectros de absorción del efluente durante el tratamiento con 20 g de MF.

Con la finalidad de evaluar el efecto de la cantidad de MF sobre el porcentaje de decoloración, se repitió el experimento reduciendo a 10 g la cantidad de material. El resultado mostró una disminución de más del 40% en la decoloración del efluente después de 5 h, lo que sugiere que la decoloración depende de la cantidad de MF aplicado (Fig. 7.7A).

-Actividad lacasa

La actividad lacasa en el efluente en tratamiento se cuantificó a intervalos de una hora tomando una muestra del efluente simulado directamente de cada vaso de precipitados. Por otro lado, con la finalidad de estimar la concentración de esta enzima en cada sistema (malla plástica con MF), una porción de 20 g del material se utilizó para la obtención del extracto crudo enzimático (ECE) en el cual se realizó la determinación de la actividad lacasa (ver sección 6.5.2 punto A).

La actividad encontrada en el ECE fue de 0.12 UI/mL. Como el volumen total de ECE fue de 75 mL la actividad lacasa total correspondió a 9 UI. Para calcular la actividad lacasa teórica por mililitro de efluente simulado, se dividió la actividad total entre el volumen de efluente (0.2 L), resultando en 45 UI/L de efluente. Este valor representó una

aproximación de la actividad lacasa total que al entrar en contacto con el efluente contribuyó con la decoloración del índigo carmín.

Por otro lado, al cuantificar la actividad lacasa *aparente* durante el ensayo de decoloración, se encontró que esta aumentó de 0 a 75 UI/L de efluente a lo largo de 7 h de tratamiento. El aumento en la actividad enzimática se debe probablemente a la solubilización progresiva de las enzimas (presentes sobre el MF) en el efluente en tratamiento (Ullah *et al.*, 2000), sin embargo, como puede observarse, la actividad lacasa *teórica* calculada a partir del ECE (45 UI/L de efluente) fué menor a la actividad máxima encontrada al cabo de 7 h de tratamiento (75 UI/mL de efluente). Esta disparidad puede atribuirse a que durante la obtención de un ECE no se consigue recuperar el 100% de las enzimas presentes, ya que una parte de ellas permanece adsorbida en las paredes celulares del sustrato (RM+ST). Brasil De Souza-Cruz *et al.*, (2004) demostraron que es necesario realizar hasta 5 extracciones sucesivas para poder recuperar el total de las MnP producidas por *Ceriporiopsis subbermispora* (en CS) sobre astillas de madera, además, también encontraron que durante la primera extracción sólo se logró recuperar el 50% de estas enzimas. Sin embargo, las técnicas que se emplean rutinariamente para la cuantificación de la actividad enzimática consideran sólo a las enzimas presentes en el caldo de cultivo (CL) o en los ECE (CS) y no a las enzimas ligadas al sustrato residual o inclusive al micelio fúngico (Valasková y Baldrian, 2006).

Finalmente, la observación de un aumento progresivo de la actividad lacasa *aparente* y no la disminución de la misma, sugiere que las lacasas de *Fomes* sp. EUM1 son estables a las condiciones del tratamiento, al menos durante el periodo de ensayo.

- Efluente y material fermentado

Al final del experimento el MF se retiró del efluente para su observación macroscópica. El material presentó sólo una ligera coloración verdosa, sugiriendo que la decoloración se debió mayormente a degradación enzimática y no a adsorción sobre los sustratos sólidos (Fig. 7.8C). Por otro lado el efluente tratado perdió por completo el color azul inicial convirtiéndose en una solución ligeramente turbia color café claro (Fig. 7.8 A y B).

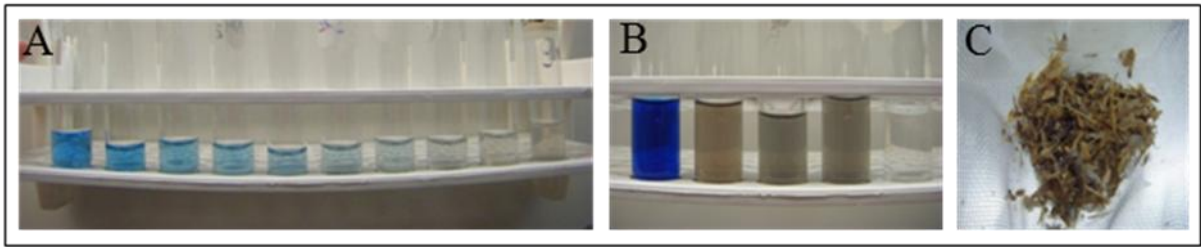


Fig. 7.8. Fotografías del efluente tratado y del MF. A) Decoloración del efluente a lo largo del tratamiento (las muestras se diluyeron 5 veces en agua destilada para facilitar su análisis espectrofotométrico). B) Decoloración del efluente después de 7 h de tratamiento, de izquierda a derecha: Control (efluente sin tratar), efluente tratado repetición 1, 2 y 3 (las muestras del efluente tratado se muestran sin diluir. C) “Material fermentado” después de 7 h de tratamiento.

-Decoloración por adsorción sobre los residuos lignocelulósicos

Con la finalidad de determinar la proporción de la decoloración causada por la adsorción del colorante sobre los residuos lignocelulósicos y no por la degradación enzimática, se realizó el tratamiento del efluente empleando la mezcla RM-ST como adsorbente. El periodo de contacto fue de 7 h y la dosis de adsorbente 20 g (peso húmedo).

Efluente en tratamiento												
	t (h)	0	0.25	0.5	0.75	1	1.5	2	3	4	5	6
%D	0±0.0	6±4.1	6±2.9	6±1.9	6±4.2	7±3.1	7±3.0	7±2.4	5±4.3	6±2.3	0±1.4	3±3.0

Fig. 7.9. Fotografías del efluente tratado durante 7 h con la mezcla de RM-ST. En la parte inferior se muestran los porcentajes de decoloración alcanzados a cada hora del tratamiento.

Los resultados encontrados indicaron que bajo las condiciones probadas la mezcla de residuos (RM-ST) tuvo baja capacidad ($\approx 7\%$) para adsorber el colorante (Fig. 7.9).

-Efluente tratado y residuos lignocelulósicos

Aunque la cantidad de colorante adsorbido en la mezcla de RM-ST fue muy baja, al término del periodo de contacto el material presentó un fuerte color azul y el efluente tratado conservó su color y se observó ligeramente turbio (Fig. 7.10).

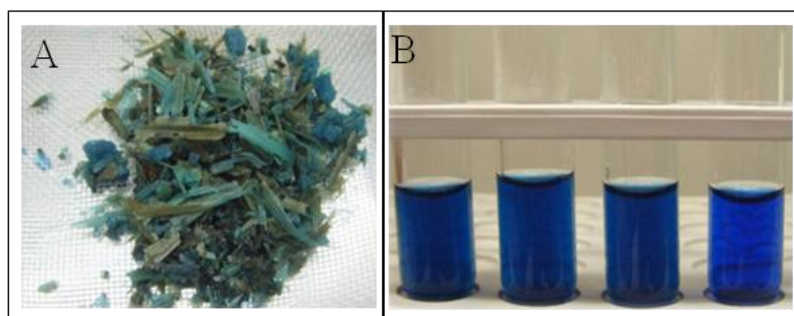


Fig. 7.10. Fotografías de efluente tratado y de los residuos lignocelulósicos al final del tratamiento. A) Residuos lignocelulósicos al final del periodo de contacto. B) De derecha a izquierda: efluente sin tratar, efluente tratado repetición 1, 2 y 3 (sin diluir).

Recientemente, las técnicas de adsorción han ganado importancia, debido a su eficacia en la remoción de contaminantes persistentes. Aunque el carbón activado es el adsorbente más común, su aplicación en este tipo de procesos implica un costo elevado, por ello, aún continúa la búsqueda de nuevos adsorbentes más económicos e igualmente efectivos.

La utilización de diversos residuos agroindustriales como adsorbentes en la remoción de colorantes textiles ha sido estudiada por algunos autores. Robinson *et al.*, (2002a,b) lograron un 80 % de decoloración de un efluente simulado empleando trozos de mazorca de maíz o de paja de trigo como adsorbentes.

Es importante considerar que la decoloración en este tipo de tratamientos depende de muchos factores fisicoquímicos, como la interacción colorante-adsorbente, la estructura del colorante, el área superficial del adsorbente, el tamaño de partícula, la temperatura, pH y el tiempo de contacto.

En la Tabla 7.2, se realiza una comparación entre las condiciones del ensayo empleando la mezcla RM-ST como adsorbente y las condiciones empleadas por otros autores.

Tabla. 7.2 Remoción de colorantes textiles por adsorción sobre residuos agroindustriales.

	Trabajos previos		
	Ensayo actual	(Robinson <i>et al.</i> , 2002a)	(Robinson <i>et al.</i> , 2002b)
Adsorbente	Mezcla de RM-ST (proporción 80:20)	Mazorcas de maíz	Paja de trigo
Tamaño de partícula	Mezcla de tamaños: mallas 6 (4.06 mm), 10 (2.52 mm) y 20 (0.61 mm)	≤600 µm	2 X 4 mm
Temperatura de incubación	40°C	Temperatura ambiente 20±2°C	Temperatura ambiente 20±2°C
pH	6.45	ND	ND
Dosis de adsorbente	20 g de materia húmeda, aprox. 4.5 g de materia seca	5 g de material seco	5 g de material seco
Tiempo de contacto en que se obtuvo la mayor decoloración	3 h	50 h	50 h
Decoloración máxima	7.9%	80%	80 %
Concentración de colorante	100 ppm	50 ppm	200 ppm
Colorante	Índigo Carmín	Mezcla de 5 colorantes reactivos: Cibacron amarillo C-2R, Cibacron rojo C-2G, Cibacron azul C-R, Remazol negro B and Remazol rojo RB.	Mezcla de 5 colorantes reactivos: Cibacron amarillo C-2R, Cibacron rojo C-2G, Cibacron azul C-R, Remazol negro B and Remazol rojo RB

ND. No determinado

Como puede observarse, existen diferencias importantes entre las condiciones empleadas en este trabajo y las analizadas previamente; sin embargo, debido a que el objetivo del ensayo era determinar la proporción de la decoloración alcanzada en el sistema A debida a la adsorción del índigo sobre los residuos lignocelulósicos y no a degradación enzimática, el ensayo se realizó exactamente igual que en el sistema A pero en ausencia de crecimiento fúngico.

Es probable que una modificación en las condiciones del ensayo dé lugar a porcentajes de decoloración más elevados utilizando la mezcla de RM-ST como material adsorbente.

-Decoloración por catálisis enzimática: Extracto crudo enzimático y lacasa comercial

Se probó la decoloración del índigo carmín por acción de las enzimas presentes en un ECE obtenido a partir del cultivo de *Fomes* sp. EUM1 sobre la mezcla de rastrojo de maíz con salvado de trigo. El ensayo se realizó en vasos de precipitado de 250 mL que contenían 18 U/L de lacasa del hongo en un volumen total de 100 mL del efluente simulado.

La máxima decoloración alcanzada fue del 3% aún después de 8 h de tratamiento, sin embargo, al determinar la actividad lacasa durante la decoloración, se encontró que esta no disminuyó después de 10 h de incubación, lo que indica que la baja decoloración no se debió a la inestabilidad de la enzima (Fig.7.14), sino probablemente a su baja concentración. Comparando en términos de actividad enzimática, se tiene que en el ensayo con el MF, se tenía una actividad lacasa de 75 UI/L a las 8 h de tratamiento, mientras que en este ensayo la actividad fue de 18 UI/L.

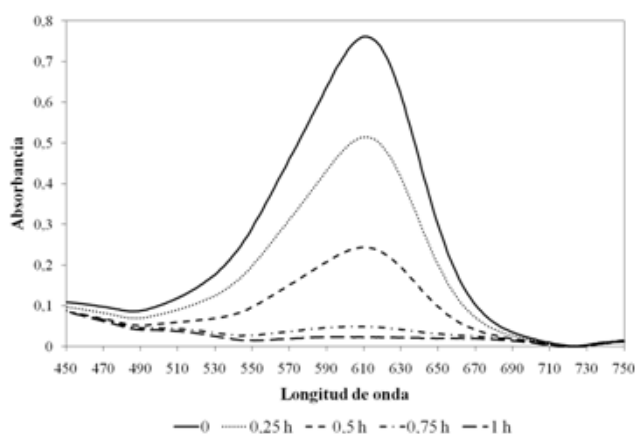
Por otro lado, si se demuestra la contribución de lacasas asociadas al MF en el proceso de decoloración, el ECE se encontraría en desventaja debido a la ausencia de estas enzimas.

La decoloración de efluentes empleando extractos crudos se ha considerado como una alternativa al empleo de enzimas puras, sin embargo, como se mostró en el ensayo anterior, un extracto crudo (que generalmente se obtiene muy diluido) resulta ineficiente para este fin. Para mejorar el proceso sería indispensable concentrar el extracto, y aún las técnicas más sencillas de concentración implicarían un elevado costo de operación si se aplicaran a mayor escala. Ejemplo de ello, es el trabajo de Murugesan *et al.*, (2007); este estudio comenzó con la producción de lacasas por *Ganoderma lucidum* en cultivo sólido sobre salvado de trigo, luego de 7 días de cultivo, se realizó la extracción de enzimas empleando un buffer de acetatos (100 mM, pH 5.0). Debido a la baja concentración de enzimas en el extracto, éste fue concentrado por precipitación con sulfato de amonio, posteriormente dializado durante 24 h contra un buffer de acetatos (20 mM, pH 5.0) y finalmente filtrado a través de una membrana de 0.22 µm. El extracto así obtenido fue utilizado para decolorar 2 colorantes reactivos (RBBR y RB-5), y aunque se utilizó una concentración elevada de enzima (20 U de lacasa por mL de solución coloreada), no se obtuvo decoloración de la

solución de RB-5 y en la de RBBR se logró una decoloración del 95%, pero después de 12 h de reacción.

Según algunos autores, es posible mejorar la decoloración causada por extractos crudos enzimáticos y aún por enzimas purificadas, agregando mediadores redox (cuyo potencial redox sea mayor que el del compuesto a decolorar), sin embargo, aunque se han logrado buenos resultados durante estos procesos, la adición de muchos de estos mediadores eleva la toxicidad de la solución decolorada (Khlifi *et al.*, 2010).

En relación con la lacasa comercial, el ensayo se realizó ajustando la actividad enzimática a la misma concentración que en el experimento anterior (18 UI/L de efluente). Bajo estas condiciones la lacasa comercial fue capaz de decolorar casi por completo la solución en sólo 1 h de incubación (Fig. 7.12, Tabla 7.3).



Tiempo (h)	Decoloración (%)
0	0±0
0.25	42,9 ± 1.54
0.5	73,9 ± 0.32
0.75	94,8 ± 0.41
1	97,4 ± 0.09

Fig.7.11. Espectros de absorción de las muestras tratadas con la lacasa comercial.

Tabla. 7.3. Porcentaje de decoloración de las muestras tratadas con la lacasa comercial.

En estudios previos se ha reportado que este producto comercial se encuentra adicionado con un mediador conocido como ácido fenotiazin-10 propiónico (Solís, 2005), por lo que, al parecer, la rápida decoloración del índigo carmín se debió precisamente a la acción de este sistema lacasa-mediador. A lo largo del tratamiento la coloración azul del efluente fue desapareciendo hasta transformarse en una solución color amarillo (Fig. 7.13B).

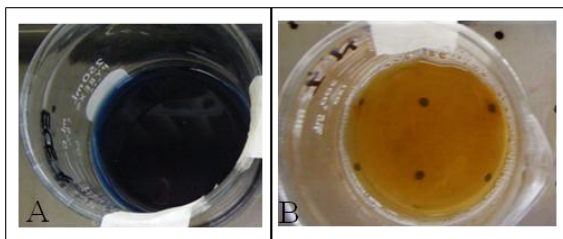


Fig.7.12. Fotografías del efluente simulado, antes y después del tratamiento con la lacasa comercial A) Efluente simulado antes del tratamiento. B) Efluente simulado después de 1h de tratamiento con la lacasa comercial a 40°C en agitación a 100 rpm.

-Actividad lacasa

Al igual que en el experimento anterior, se determinó la actividad lacasa *aparente* durante la decoloración del efluente, los resultados se presentan como actividad lacasa residual (Fig. 7.14).

Aunque la lacasa comercial fue capaz de decolorar por completo el índigo carmín en sólo 1 h, la enzima perdió más del 20% de su actividad *aparente* después de 2 h de incubación bajo las condiciones del ensayo, y más del 60% a las 10 h de incubación (Fig. 7.14).

Adicionalmente, también se determinó la actividad lacasa en el ECE de *Fomes* sp. EUM1 a lo largo de 10 h de incubación a 40°C en ausencia del efluente simulado (Fig. 7.14). Los resultados mostraron que la enzima conservó su actividad (18 U/L) después de 10 h de incubación bajo estas condiciones.

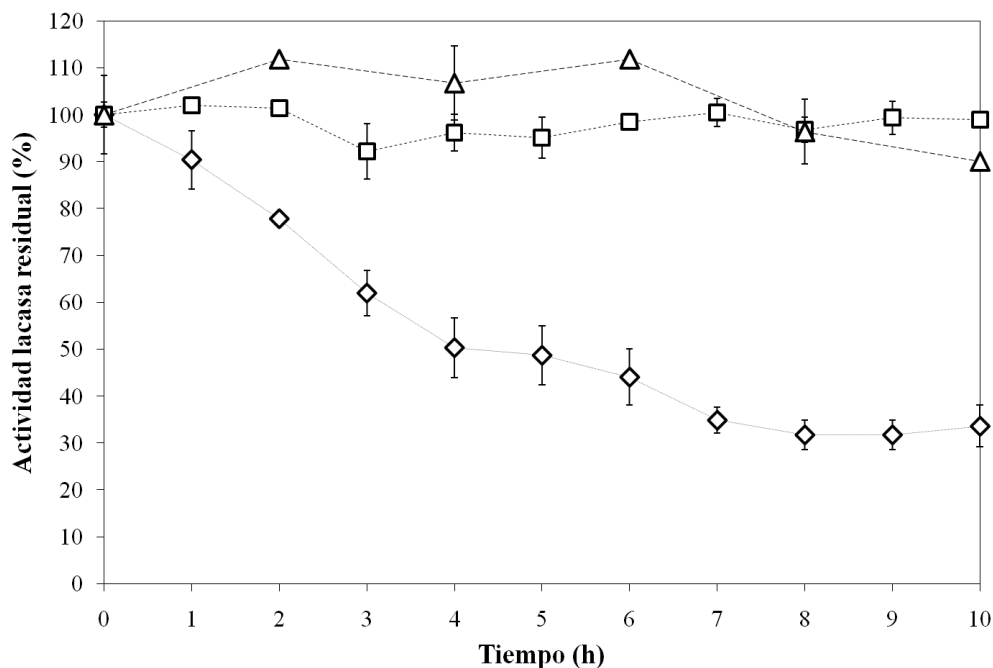


Fig. 7.13. Actividad lacasa residual durante la decoloración por catálisis enzimática. (◇) Actividad lacasa residual en el efluente tratado con la lacasa comercial, (□) Actividad lacasa residual en el efluente tratado con el ECE de *Fomes* sp. EUM1. (Δ) Actividad lacasa residual en el ECE de *Fomes* sp. EUM1 incubado a 40 °C en ausencia del efluente simulado.

Existe escasa información sobre la estabilidad de estas enzimas frente a la presencia de colorantes textiles y sus productos de degradación, sin embargo, la estabilidad de las lacasas de *Fomes* sp. EUM1 podría ser comparable con los resultados encontrados por otros autores, por ejemplo, Zille *et al.*, (2003) determinaron la estabilidad de una lacasa de *Trametes villosa* en forma libre e inmovilizada en esferas de alúmina, frente a las condiciones de decoloración de un efluente simulado contaminado con RB-5 (1 g/L) y NaCl (30 g/L) (45°C, pH 5.0, agitación: 90 rpm) y encontraron que el tiempo de vida media de la enzima en forma libre fue de 194 h, mientras que para la enzima inmovilizada fue de 79 h. Más recientemente, Champagne y Ramsey, (2010), determinaron la actividad lacasa (enzima pura de *Trametes versicolor*) durante el proceso de decoloración de una solución 0.036 M de índigo carmín y encontraron que la enzima conservó el 100% de su actividad después de 3 h de incubación bajo estas condiciones, alcanzando en este tiempo, una decoloración del 70%.

Como puede observarse las lacasas extracelulares de *Fomes* sp. EUM1 presentan una notable estabilidad que podría igualar a la encontrada en las enzimas de otros hongos, por lo tanto, se sugiere una posterior determinación del tiempo de vida media de estas enzimas. Otro de los retos que se presentan al utilizar enzimas puras o extractos crudos en el tratamiento de efluentes, es la disminución en la estabilidad y capacidad catalítica de las enzimas. Como se mostró anteriormente las lacasas presentes en el ECE de *Fomes* sp. EUM son estables durante 10 h en presencia del efluente simulado, si bien no se logró la decoloración del mismo, posiblemente la búsqueda de un mediador adecuado mejoraría este resultado.

7.3.2 Efecto de la velocidad de agitación en el proceso de decoloración

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos durante la decoloración del efluente con los distintos sistemas de tratamiento, se eligió el sistema 1 para la realización de los ensayos posteriores.

En esta sección se muestran los resultados de la evaluación del efecto de la velocidad de agitación en el proceso de decoloración. Las velocidades de agitación ensayadas fueron 100, 50 y 0 rpm; en la Fig. 7.15 se muestran los porcentajes de decoloración (%D) alcanzados durante un periodo de exposición de 8 h.

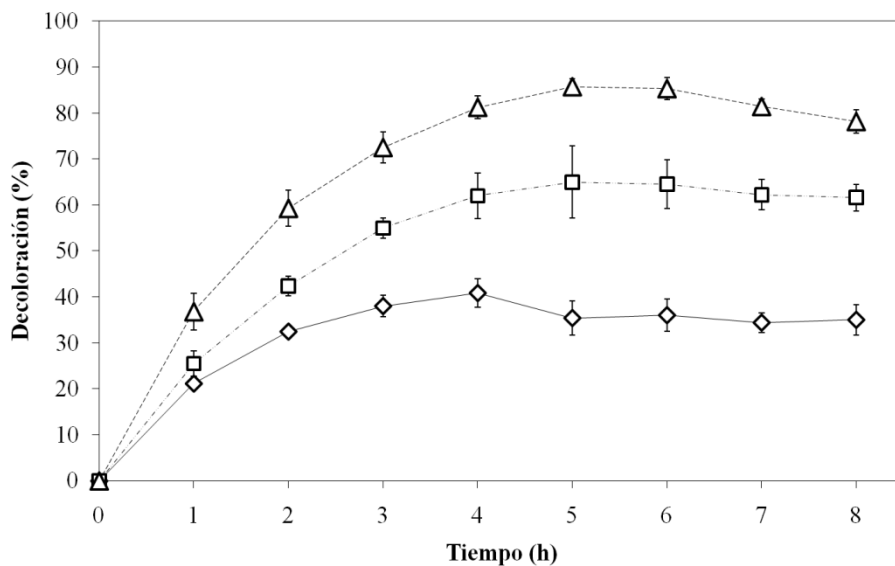


Fig. 7.14. Porcentaje de decoloración de efluente simulado durante el tratamiento con el MF a diferentes velocidades de agitación, 0 rpm (◇), 50 rpm (□), 100 rpm (△).

Bajo las tres condiciones, los porcentajes de decoloración máximos se alcanzaron después de 4 h de tratamiento, siendo estos de 82, 61 y 36% respectivamente. De forma simultánea, también se cuantificó la actividad lacasa en el efluente en tratamiento. Los resultados se muestran en la Fig. 7.16.

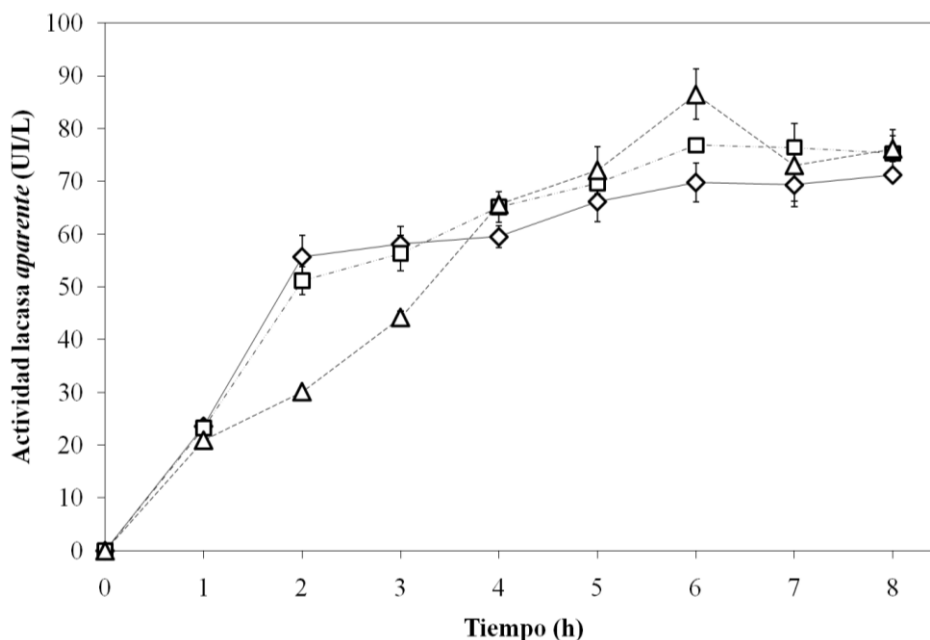


Fig. 7.15. Actividad lacasa en el efluente simulado durante el tratamiento con el MF a diferentes velocidades de agitación, 0 rpm (◇), 50 rpm (□), 100 rpm (△). La actividad enzimática se reporta en unidades internacionales por mililitro de efluente en tratamiento.

Como puede observarse, la velocidad de agitación no afectó el desprendimiento de estas enzimas desde el MF hacia el efluente en tratamiento. En todos los casos se observó un aumento gradual de la actividad lacasa, alcanzando un máximo entre las 4 y 5 h de incubación; después de este tiempo, la actividad se mantuvo prácticamente constante durante el resto del periodo de ensayo.

Los resultados muestran que la disminución en la velocidad de agitación afecta negativamente la capacidad del MF para decolorar el efluente, así, una disminución de 100 a 50 rpm ocasiona una baja en el %D de más del 20%, además, si el tratamiento se realiza bajo condiciones estáticas (sin agitación), el %D disminuyó en un 56%.

Contrario a esto, un aumento en la velocidad de agitación desde 0 hasta 100 rpm no modificó los perfiles de actividad lacasa *aparente* medidos en el efluente a través del periodo de tratamiento, lo que sugiere que el proceso de decoloración no sólo dependió de la acción de las lacasas disueltas, sino también de la actividad de las enzimas que permanecieron unidas al MF.

Algunos estudios han mostrado la capacidad de ciertos hongos de sintetizar enzimas intracelulares y asociadas al micelio que resultan capaces de degradar distintos colorantes de uso textil. Tavcar *et al.*, (2006), encontraron que el hongo *Irpex lacteus* crecido en cultivo líquido produce 8000 veces más lacasas asociadas al micelio que lacasas extracelulares, y además que estas enzimas participan en la decoloración del colorante reactivo Naranja 16. Posteriormente se mostró que las enzimas asociadas al micelio son las principales responsables de la decoloración de este compuesto y también del RBBR, ya que ninguno de estos pudo ser decolorado empleando el caldo de cultivo filtrado (que contenía enzimas extracelulares), mientras que se lograron decoloraciones del 79 y 90%, respectivamente empleando únicamente el micelio del hongo (Svobodová *et al.*, 2008).

También se ha demostrado la participación de las enzimas del sistema citocromo P-450 de *Cunninghamella elegans* (un hongo no ligninolítico) en la decoloración del verde de malaquita (Cha *et al.*, 2001). Por lo anterior, en este trabajo es posible que la presencia de enzimas asociadas al micelio, adsorbidas sobre los residuos lignocelulósicos o enzimas intracelulares, marque la diferencia entre los resultados observados a distintas velocidades de agitación. De acuerdo con esto, una mayor agitación favorece la transferencia de masa entre el MF y el fluido en tratamiento, aumentando así la velocidad de decoloración del efluente.

7.3.3 Decoloraciones sucesivas empleando el sistema sustrato-hongo

Se probó la capacidad del MF para decolorar sucesivamente dos muestras de 200 mL del efluente simulado (soluciones 1 y 2). Inicialmente, se realizó el tratamiento de la solución 1 sumergiendo en ella 20 g del MF hasta alcanzar $\approx 85\%$ de decoloración, posteriormente, el MF se retiró cuidadosamente de la solución 1 permitiendo el escurrimiento del exceso de humedad, antes de sumergirlo en la solución 2. En ambos casos el sistema se incubó a 40°C y en agitación constante a 100 rpm. El %D se determinó a intervalos de 1 h durante 5 h, los resultados se muestran en la Fig. 7.17.

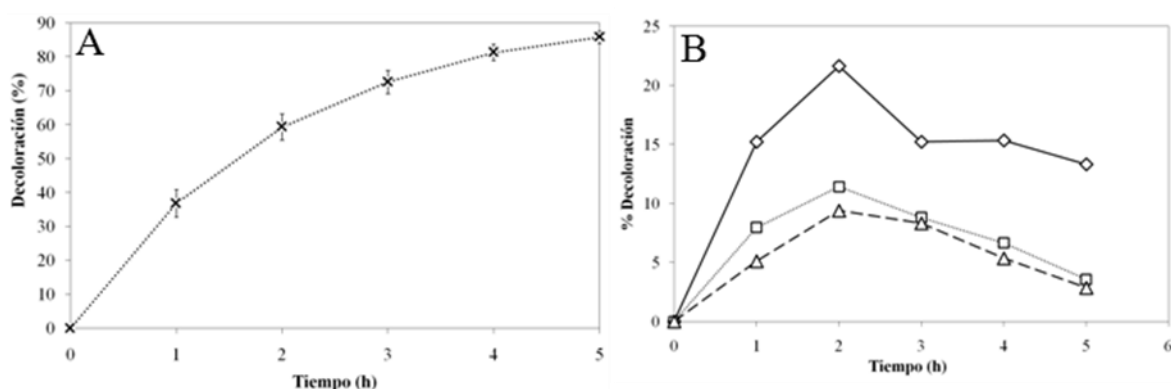


Fig. 7.16. Decoloraciones sucesivas. A) Cinética de decoloración de la solución 1. B) Decoloración de la solución 2. Debido a la variabilidad de los resultados de la 2ª decoloración, la Fig. 7.17B muestra la cinética de decoloración de cada una de las réplicas en estudio (Réplica 1 (\diamond), Réplica 2 (\square), Réplica 3 (Δ)).

Durante el tratamiento de la solución 1, se logró una decoloración del 85% en 5 h. En este caso la variación entre los resultados obtenidos en cada una de las réplicas (el ensayo se realizó por triplicado) fue menor al 11%. La Fig. 7.17A muestra los promedios de los resultados obtenidos en las 3 réplicas y las barras de error indican las desviaciones estándar correspondientes. Sin embargo, durante el tratamiento de la solución 2, la cinética de decoloración obtenida para cada réplica fue variable por lo que en este caso se decidió no promediar los resultados y reportarlos por separado (Fig. 7.17B).

En general, puede observarse que durante el tratamiento de la solución 2, los mayores %D se obtuvieron a las 2 h de incubación, sin embargo, después de este tiempo los %D disminuyeron.

En la réplica 1 se alcanzó una decoloración del 15% en 3 h, resultado que se mantuvo constante durante el resto del tratamiento. En el caso de las réplicas 2 y 3, a partir de las 2 h de incubación los %D disminuyeron de 11 y 9% a 4 y 3%, respectivamente a las 5 h de incubación.

Esta caída en la eficiencia, en comparación con los resultados obtenidos durante la primera decoloración, podría ser explicada en función de la pérdida de actividad de las enzimas asociadas al MF y a que gran parte de las enzimas extracelulares permaneció diluida en la solución 1.

7.4 Ensayos de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*)

Diversos sistemas basados en la actividad de enzimas fúngicas han probado ser útiles en la degradación de muchos colorantes textiles, sin embargo, la decoloración del efluente no necesariamente viene acompañada por la destoxificación del mismo (Khelifi *et al.*, 2010).

Aunque el primer reporte sobre la decoloración de efluentes textiles empleando hongos de pudrición blanca ocurrió hace más de 15 años (McMullan *et al.*, 2001), el estudio de la decoloración-destoxificación de estos efluentes aún es insuficiente.

Por lo anterior, en los últimos años la realización de ensayos de toxicidad ha cobrado gran importancia durante el desarrollo de sistemas para el tratamiento de efluentes industriales. En el presente estudio, se realizó una curva dosis-respuesta para evaluar el efecto de distintas muestras (*soluciones problema*) sobre la germinación y crecimiento de plántulas de lechuga (*Lactuca sativa*). La Tabla 7.4 muestra los resultados obtenidos durante la prueba de germinación.

En el efluente simulado y en la solución salina una concentración del 100% equivale a 100 mg/L de índigo carmín y 2.9 g/L de NaCl, respectivamente. En los efluentes decolorados esta misma concentración (100%) corresponde a 100 mg/L de colorante residual o sus productos de degradación y a una concentración desconocida de otros compuestos agregados durante el tratamiento (enzimas disueltas, productos de la degradación del RM-ST etc.).

Tabla 7.4. Germinación de las semillas de *Lactuca sativa* en presencia de las soluciones problema.

Concentración de la solución problema (%)	% de Germinación			
	Efluente simulado	MF	LC	NaCl 0.05 M
0 (Solo agua dura reconstituida)	97±6 ^{a,V}	97±6 ^{a,Z}	97±6 ^{a,W}	97±6 ^{a,V}
25	83±16 ^{b,Z,V}	48±8 ^{a,Y}	76±9 ^{b,V}	78±7 ^{b,Z}
50	50±5 ^{a,X,Y}	43±3 ^{a,Y}	51±5 ^{a,b,Z}	60±5 ^{b,Y}
75	67±6 ^{c,Y,Z}	18±9 ^{a,X}	25±9 ^{a,b,Y}	42±8 ^{b,X}
100	32±6 ^{b,X}	5±0 ^{a,X}	8±3 ^{a,X}	43±6 ^{c,X,Y}

Se muestran las medias y las desviaciones estándar de experimentos realizados por triplicado. Los valores seguidos por la misma letra minúscula dentro del mismo renglón y los valores seguidos por la misma letra mayúscula dentro de la misma columna no difieren significativamente de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). MF: Efluente tratado con el material fermentado, LC: Efluente tratado con la lacasa comercial.

El porcentaje de germinación (%G) en los controles fue del 97%. En general, todas las soluciones problema causaron un descenso en el %G. A bajas concentraciones (Dilución 25%) no se observaron diferencias significativas entre los %G obtenidos en presencia del efluente simulado, el efluente tratado con la lacasa comercial (LC) o la solución salina, por el contrario, el efluente tratado con el material fermentado (MF) causó una inhibición de $\approx 51\%$.

En las muestras directas (sin diluir), la mayor toxicidad se observó en los efluentes decolorados, ya sea con la lacasa comercial o con el material fermentado. Los %G registrados en cada caso fueron 8 y 5% respectivamente. El efluente simulado causó una inhibición en la germinación de poco más del 60%,

A partir de los datos de la Tabla 7.4, se determinó la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀), es decir, la concentración de la muestra que es capaz de inhibir la germinación en un 50% (Tabla 7.5). En el caso de los efluentes tratados, además del índigo remanente existen moléculas derivadas de su degradación que podrían ser más tóxicas para la germinación.

Tabla 7.5. Concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) para: Germinación de las semillas.

Solución problema	CI ₅₀ (%)	Equivalencia (mg/L)	
		Índigo carmín	NaCl
Efluente simulado	77.8	77.8	2.25
Efluente tratado con MF	41.8	41.8*	1.21
Efluente tratado con la LC	56.1	56.1*	1.62
Solución NaCl 0.05 M	77.1	0.0	2.29

*En los efluentes decolorados los resultados no sólo corresponden a la toxicidad causada por la presencia del colorante, el NaCl y/o sus productos de degradación, sino también a otros compuestos adicionados durante el ensayo de decoloración (compuestos presentes en el MF o en el producto comercial).

Aunque la CI₅₀ de la solución tratada con la LC fué mayor a la calculada para la solución tratada con el MF, es importante recordar que el criterio empleado para determinar el efecto de las soluciones sobre la germinación, fue sólo *la aparición visible de la radícula*, sin embargo, debe considerarse que al final de un ensayo de germinación se cuenta con dos tipos de plántulas procedentes de semillas que han *germinado*: plántulas normales y plántulas anormales.

Según Besnier (1988), son plántulas normales las que cultivadas en buen suelo, libre de patógenos y de semillas extrañas, en condiciones favorables de luz, temperatura y humedad, muestren capacidad para continuar su desarrollo hasta convertirse en plantas normales. Las estructuras esenciales de las plántulas normales son:

- Un sistema radicular bien desarrollado.
- Hipocótilo o epicótilo bien desarrollado.
- Uno o dos cotiledones, según el caso.

Por el contrario, se consideran plántulas anormales, a aquellas con defectos tales que impidan dar lugar a plantas normales en condiciones favorables de cultivo. Las tres clases principales de plántulas anormales son:

- Plántulas dañadas en las que faltan estructuras esenciales o en las que algunas de estas estructuras están tan dañadas que no cabe esperar un desarrollo equilibrado.
- Plántulas deformes o desequilibradas, con desarrollo débil o aquellas con estructuras esenciales deformadas.
- Plántulas infectadas, que son aquellas cuyas estructuras esenciales están muy dañadas como resultado de una infección y en las que es imposible un desarrollo normal.

Aunque la apreciación de la normalidad o anormalidad de las plántulas es una tarea muy delicada y debe realizarse sólo por analistas experimentados, durante el ensayo se realizó la clasificación de las plántulas como normales y anormales considerando los criterios expuestos anteriormente.

Se encontró que todas las plántulas provenientes de las semillas expuestas al efluente tratado con la lacasa comercial presentaron bajo desarrollo y deformaciones en algunas de sus estructuras; mientras que las provenientes de semillas expuestas al efluente tratado con el MF resultaron ser normales en cuanto a la forma de sus estructuras y únicamente presentaron una disminución en la elongación de la radícula. En la Tabla 7.6 se muestran las fotografías de las plántulas obtenidas al final del ensayo (5 días).

Tabla. 7.6. Plántulas obtenidas de las semillas expuestas a las soluciones problema después de 5 días de incubación.

		Concentración de la solución problema (%)				
		0	25	50	75	100
Solución problema	Efluente simulado					
	Efluente simulado tratado con el MF					
	Efluente simulado tratado con la LC					
	Solución de NaCl 0.05 M					

Al término del periodo de incubación también se registró la longitud de la radícula e hipocótilo de cada plántula (Tablas 7.7 y 7.9). La longitud de la radícula e hipocótilo en las plántulas control fue de 31.5 y 28.9 mm, respectivamente. Todas las soluciones causaron una disminución en la elongación de la radícula, sin embargo, esta disminución fue mayor en las semillas expuestas al efluente tratado con la lacasa comercial, el cual causó una Inhibición en la Elongación de la Radícula (IER) del 92%.

Tabla 7.7. Longitud de la radícula de las plántulas de *Lactuca sativa* a los 5 días de incubación.

Concentración de la solución problema (%)	Longitud de la radícula (mm)			
	Efluente simulado	MF	LC	Solución NaCl 0.05 M
0 (Solo agua dura reconstituida)	31.5±1.8 ^{a,Z}	31.5±1.8 ^{a,Z}	31.5±1.8 ^{a,V}	31.5±1.8 ^{a,W}
25	29.5±1.7 ^{b,Z}	25.7±4.9 ^{b,Y,Z}	17.4±1.2 ^{a,Z}	26.0±2.4 ^{b,V}
50	21.0±3.6 ^{b,Y}	20.2±1.9 ^{b,X,Y}	13.9±0.6 ^{a,Y,Z}	19.1±0.7 ^{b,Z}
75	16.4±1.5 ^{b,Y}	16.6±3.1 ^{b,X}	9.8±1.3 ^{a,Y}	15.3±1.0 ^{b,Y}
100	11.3±1.1 ^{b,X}	15.9±2.8 ^{c,X}	2.5±0.9 ^{a,X}	9.6±1.0 ^{b,X}

Se muestran las medias y las desviaciones estándar de experimentos realizados por triplicado. Los valores seguidos por la misma letra minúscula dentro del mismo renglón y los valores seguidos por la misma letra mayúscula dentro de la misma columna no difieren significativamente de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). MF: Efluente tratado con el material fermentado, LC: Efluente tratado con la lacasa comercial.

Por otro lado, no se registraron diferencias significativas entre la longitud de la radícula de las plántulas expuestas al efluente simulado y las expuestas a la solución salina, aparentemente, la inhibición del crecimiento podría deberse únicamente a la concentración de sal y no a la presencia del colorante. En estos casos se registró una IER del 64 y 69%, respectivamente.

Por otro lado, la *menor* inhibición del crecimiento de la radícula se registró en las plántulas crecidas en presencia del efluente tratado con el material fermentado (MF), en este caso, la longitud promedio alcanzada a los 5 días de incubación fue de 15.9 mm.

A partir de los valores presentados en la Tabla 7.7 se calcularon las concentraciones inhibitorias 50 (CI₅₀), para el parámetro Inhibición de la Elongación de la Radícula (IER). Los resultados se muestran en la Tabla 7.8.

Tabla 7.8. Concentración inhibitoria 50 para: Elongación de la radícula.

Solución problema	CI ₅₀ (%)	Equivalencia	
		Índigo carmín (mg/L)	NaCl (g/L)
Efluente simulado	77.8	77.8	2.25
Efluente tratado con MF	90.4	90.4*	2.62
Efluente tratado con la LC	47.1	47.1*	1.36
Solución NaCl 0.05 M	70.8	0.0	2.05

*En los efluentes decolorados los resultados no sólo corresponden a la toxicidad causada por la presencia del colorante, el NaCl y/o sus productos de degradación, sino también a otros compuestos adicionados durante el ensayo de decoloración (compuestos presentes en el MF o en el producto comercial).

Como puede observarse, la mayor y menor toxicidad corresponden a los efluentes tratados con la lacasa comercial y con el “material fermentado”, respectivamente; sin embargo, es importante resaltar que, aunque en el caso del efluente tratado con el MF, la longitud de la radícula de las plántulas fue mayor que en el efluente sin tratar, este sistema no permitió la elongación de la radícula hasta su valor normal (31.5 mm), de hecho este efluente causó una IER del 50%.

Por otro lado, se encontró que las muestras diluidas (25%) del efluente simulado, el efluente tratado con el MF y la solución salina, ocasionaron un *aumento* en la elongación del hipocótilo (Tabla 7.9). Este fenómeno, denominado *hormesis* ocurre cuando ciertos compuestos a bajas concentraciones producen exaltación del crecimiento por ser micronutrientes vegetales, sin embargo, esta respuesta no debe ser interpretada como un efecto favorable o estimulante y debe ser evaluada de manera conjunta con los efectos registrados en otras pruebas (Castillo, 2004).

Tabla 7.9. Longitud del hipocótilo de las plántulas de *Lactuca sativa* a los 5 días de incubación.

Concentración de la solución problema (%)	Longitud del hipocótilo (mm)			
	Efluente simulado	MF	LC	Solución NaCl
0 (Agua dura reconstituida)	28.9±2.0 ^{a,X}	28.9±2.0 ^{a,X}	28.9±2.0 ^{a,V}	28.9±2.0 ^{a,X}
25	36.9±1.6 ^{b,Y}	36.0±2.8 ^{b,Y}	27.3±2.7 ^{a,V}	36.0±1.2 ^{b,Y}
50	34.0±2.9 ^{b,X,Y}	37.1±4.8 ^{b,Y}	21.8±1.7 ^{a,Z}	37.4±1.7 ^{b,Y}
75	33.0±0.7 ^{b,X,Y}	33.3±1.9 ^{b,X,Y}	12.9±2.1 ^{a,Y}	33.8±0.5 ^{b,Y}
100	30.8±5.2 ^{b,X,Y}	32.2±3.4 ^{b,X,Y}	3.2±1.1 ^{a,X}	28.1±2.2 ^{b,X}

Se muestran las medias y las desviaciones estándar de experimentos realizados por triplicado. Los valores seguidos por la misma letra minúscula dentro del mismo renglón y los valores seguidos por la misma letra mayúscula dentro de la misma columna no difieren significativamente de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). MF: Efluente tratado con el material fermentado, LC: Efluente tratado con la lacasa comercial.

En las plántulas sometidas a la presencia del efluente tratado con la LC, ocurrió un comportamiento similar al registrado para la elongación de la radícula; *a mayor concentración del efluente, menor elongación del hipocótilo*; de hecho, la longitud disminuyó de 27.3 mm en la dilución 25% a 3.2 mm en la muestra directa (Tabla 7.9).

Los ensayos de toxicidad se han realizado mediante varios métodos, empleando principalmente bacterias, como *Pseudomonas putida* (Abadulla *et al.*, 2000) y *Vibrio fischeri* (Champagne y Ramsay, 2010; Khlifi *et al.*, 2010) y hongos como *Phanerochaete chrysosporium* (Maalej-Kammoun *et al.*, 2009).

Uno de los ensayos más comunes es el bioensayo Microtox®, el cual se basa en la reducción de la bioluminiscencia natural de la bacteria marina *Vibrio fischeri* en presencia de agentes contaminantes. Mediante este ensayo Champagne y Ramsay (2010) determinaron que una solución de índigo carmín 0.036 mM es más tóxica que ciertos colorantes del tipo antraquinona, entre ellos el Azul reactivo 19 y el Azul Disperso 3. Estos autores también encontraron que la decoloración de la solución de índigo con una lacasa purificada de *Trametes versicolor*, no elimina por completo su toxicidad, aunque sí la disminuye.

Por su parte Khlifi *et al.*, (2010), observaron que la decoloración de un efluente textil empleando un sistema lacasa-mediador eleva notablemente su toxicidad, aún utilizando mediadores naturales.

Si bien, el ensayo Microtox® se utiliza ampliamente, un sólo ensayo no es capaz de detectar todos los efectos que podría causar una muestra contaminada en un sistema biológico, por lo que se recomienda la aplicación de una batería de ensayos que permitan revelar las respuestas de distintos organismos. Idealmente, la evaluación de la toxicidad debe incluir ensayos con bacterias, plantas y células o tejidos de mamíferos (Kapanen e Itävaara, 2001).

Considerando que en muchas ocasiones los efluentes de la industria textil se mezclan con el agua de riego, la estimación de la fitotoxicidad de los colorantes textiles antes y después de cualquier tratamiento es muy importante.

La toxicidad de cada efluente dependerá de la concentración y tipo de colorante presente, así, en este trabajo se encontró que el efluente simulado (contaminado con índigo carmín) causó una inhibición de la germinación de poco más del 60%, mientras que Gomare *et al.*, (2009) encontraron que el Amarillo Oro HER (0.1 g/L) causa una inhibición del 50 y 90% en semillas de *Sorgum vulgare* y *Phaseolus mungo*, respectivamente.

Finalmente, la elevada toxicidad del efluente decolorado por la lacasa comercial, representa un problema mucho mayor, ya que este producto se utiliza actualmente en escala industrial y por lo tanto los efectos observados durante estos ensayos, presumiblemente están ahora ocurriendo en el medio ambiente.

7.5 Prueba de biodegradabilidad anaerobia

Los resultados de las pruebas de decoloración mostraron que el sistema Sustrato-Hongo (MF) es capaz de decolorar el índigo carmín en más del 80% en 4 h, sin embargo, la estrategia empleada para lograr este resultado implica por sí misma un aumento en la cantidad de materia orgánica presente en el efluente. Esto se debe a que al sumergir el MF en la solución e incubar en agitación, no sólo ocurre la decoloración del índigo carmín sino también el desprendimiento de diversos elementos (enzimas extracelulares, productos del metabolismo del hongo, productos de la degradación del sustrato -rastrajo de maíz/salvado de trigo-) hacia el efluente en tratamiento. Además, la decoloración del efluente no asegura la disminución de la demanda química de oxígeno (DQO) (Svobodová *et al.*, 2007).

Por lo anterior y como parte de los análisis previos al ensayo de biodegradabilidad anaerobia, se realizó la cuantificación de la DQO del efluente simulado antes y después del tratamiento con el material fermentado, los resultados probaron la afirmación anterior, ya que la DQO de la “solución tratada” resultó ser considerablemente mayor que la del efluente inicial (Tabla 7.10).

Tabla 7.10. Determinación de la Demanda Química de Oxígeno de la efluente simulado antes y después del tratamiento con el sistema Sustrato-Hongo (MF)

	Antes	Después
DQO(mg/L)	79.5	3345

Con la finalidad de disminuir la DQO y considerando las ventajas que ofrecen los sistemas de tratamiento basados en la actividad de bacterias metanogénicas, se realizó una prueba de biodegradabilidad anaerobia. Para ello, se trabajó con una “solución tratada” con las siguientes características:

Decoloración: 85%

DQO: 3.35 g/L

pH: 6.09

Los ensayos se realizaron con la muestra original (Directa), así como con la muestra diluida 5 y 10 veces en agua destilada. A diferentes intervalos de tiempo se recolectó el biogás producido en cada sistema y se determinó la composición del mismo.

La producción de biogás en la muestra directa (“solución tratada” sin diluir) fue mayor que en las muestras diluidas, sin embargo, se encontró que la composición de este biogás era casi en su totalidad CO_2 , sólo después de 137 h se logró obtener metano. Al realizar la determinación del pH final de estas muestras, se encontró un valor de 4.41. Se sabe que la actividad de las bacterias metanogénicas disminuye a valores de pH por debajo de 7.0 (Martínez, 2009). Por lo tanto, es probable que la falta de un ajuste del pH al inicio de la cinética fue la causa por la cual durante la primera etapa de la digestión anaerobia (Hidrólisis y Acidogénesis) el pH del medio bajó lo suficiente como para limitar el paso del proceso hacia la etapa de Acetogénesis (Fig. 7.17).

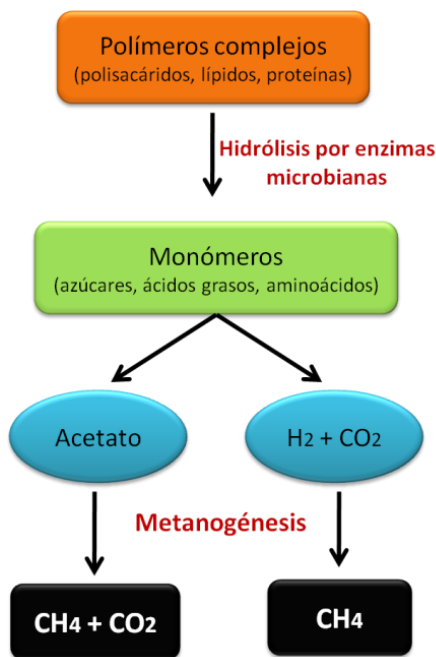


Fig 7.17. Principales procesos microbianos que tienen lugar durante la digestión anaerobia (Madigan *et al.*, 2004).

Por otro lado, en el caso de las muestras diluidas 5 veces, se alcanzó una eficiencia en la remoción de la DQO del 74.5% con un pH final de 5.97 (Tabla 7.11). El análisis de la composición del biogás, fue de 72% metano y 28% CO_2 a las 113 h de incubación.

Tabla 7.11. Eficiencias de eliminación de la DQO

Dilución	DQO_{inicial} (mg/L)	DQO_{final} (mg/L)	Eficiencia de remoción de la DQO (%)
Muestra directa	2932 ± 75	3103 ± 537.5	0 ± 0.00
Dilución 1:5	969 ± 70	247 ± 35	74.5 ± 1.77
Dilución 1:10	667 ± 190	117 ± 20	81.8 ± 8.16
Control	200.7 ± 2.5	10.75 ± 2	94.6 ± 8.65
Se muestran los promedios entre los resultados de experimentos realizados por duplicado.			

Finalmente, en las muestras diluidas 1:10, se encontró una remoción de la DQO del 81.9%, sin embargo, debido a que la cantidad de materia orgánica inicial fue baja (667 mg/L), la degradación de la misma dio lugar a la formación de cantidades muy pequeñas de biogás dificultando con ello el análisis de su composición.

8. Conclusiones

- * La adición de glucosa y extracto de levadura al medio de cultivo disminuyó la producción de lacasas en *Fomes* sp. EUM1. La adición de un 20% de salvado de trigo mejoró la producción, productividad y al parecer favoreció la síntesis de una nueva isoenzima de lacasa que no se produjo en ausencia de salvado.
- * La estrategia basada en el cultivo sólido del hongo *Fomes* sp. EUM1 sobre una mezcla de RM-ST fué capaz de decolorar un efluente simulado de la industria textil contaminado con índigo carmín.
- * Debido a la ausencia de LiP y MnP, la decoloración del efluente se atribuyó tanto a la actividad de lacasas fúngicas extracelulares como a la actividad de otras enzimas, probablemente lacasas asociadas al micelio fúngico o a enzimas intracelulares.
- * La decoloración del efluente por acción del ECE obtenido del cultivo del hongo sobre una mezcla de RM-ST fué muy baja, sin embargo, las lacasas presentes en el extracto conservaron el 100% de su actividad después de 10 h de tratamiento, por lo que la falta de decoloración no se debió a la disminución de la estabilidad de estas enzimas, sino probablemente a la baja concentración de las mismas aplicadas durante el tratamiento.
- * Las pruebas de fitotoxicidad mostraron que la decoloración del efluente no garantiza su destoxicación. Tanto el MF como la LC fueron capaces de decolorar el efluente simulado, sin embargo, ambos tratamientos elevaron su fitotoxicidad siendo mayor el daño en las plántulas expuestas al efluente decolorado con la LC.
- * En cuanto a las pruebas de biodegradabilidad anaerobia, los resultados sugieren que el efluente decolorado por el sistema sustrato-hongo puede ser tratado por un proceso de digestión anaerobia para disminuir la DQO, siempre que la muestra sea diluida adecuadamente. En el caso de la muestra directa (sin diluir) un ajuste inicial de pH podría permitir su tratamiento sin la necesidad de realizar diluciones, aunque es probable que la formación de metano sea lenta.

9. Perspectivas

Dada la eficacia del sistema sustrato-hongo para decolorar el efluente simulado, resultaría interesante la realización de estudios encaminados a la identificación de los productos de la degradación del índigo carmín. La información obtenida podría orientar la investigación hacia la identificación de los compuestos responsables de la fitotoxicidad del efluente decolorado, así como a la búsqueda de un adecuado sistema secundario para su tratamiento. En este mismo contexto, será necesario determinar con precisión si el motivo de la inhibición de la actividad metanogénica, durante las pruebas de biodegradabilidad anaerobia, se debió únicamente a la caída en el pH o a otros factores que impiden la mineralización completa de los compuestos presentes.

Por otro lado, será necesario determinar si las enzimas involucradas en la decoloración del efluente corresponden a lacasas asociadas al micelio. El primer paso sería reproducir el ensayo utilizando como sistema decolorante únicamente el micelio del hongo. En caso de que la decoloración se debiera mayormente a la actividad de estas enzimas, el sistema de tratamiento deberá rediseñarse. En caso contrario, deberá estudiarse la forma de elevar la eficiencia del sistema para lograr el tratamiento de un mayor volumen de efluente o de efluentes sucesivos, así como la reutilización del MF agotado como sustrato para un nuevo cultivo del hongo.

Finalmente, también, deberá estudiarse la capacidad de la mezcla de RM-ST para adsorber las moléculas de índigo carmín, ya que una alternativa a la utilización del sistema sustrato-hongo (material fermentado), podría ser la adsorción del colorante sobre los residuos (RM-ST) y la posterior degradación de los mismos por acción del hongo. Mediante esta estrategia podría disminuirse la toxicidad del efluente ya que la degradación del colorante no ocurriría en la fase acuosa.

10. Referencias

- Abadulla E., Tzanov T., Costa S., Robra K., Cavaco-Paulo A., Gübitz G. (2000). Decolorization and Detoxification of Textile Dyes with a Laccase from *Trametes hirsuta*. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**:3357-3362.
- Ali N., Hameed A., Ahmed S., Khan A. (2008). Decolorization of structurally different textile dyes by *Aspergillus niger* SA1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **24**:1067–1072.
- Archibald FS. (1992). A new assay for lignin-type peroxidase employing the dye Azure B. *Applied Environmental Microbiology*. **58**:3110–3116.
- Arora D., Sharma R. (2009). Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **160**:1760-1788.
- Besnier R. F. (1988). Semillas. Biología y Tecnología. Mundi-Prensa. España, pp. 637.
- Boer C. G., Peralta R. M. (2000). Production of extracellular protease by *Aspergillus tamari*. *Journal of Basic Microbiology*. **40**: 75-81.
- Bourbonnais R., Pice M. G., Freiermuth B., Bodie E. y Borneman S. (1997). Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Applied Environmental Microbiology*. **63**: 4627-4632.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. **72**: 248-254.
- Brasil de Souza-Cruz P., Freer J., Siika-Aho M., Ferraz A. (2004). Extraction and determination of enzymes produced by *Ceriporiopsis subvermispora* during biopulping of *Pinus taeda* wood chips. *Enzyme and Microbial Technology*. **34**: 228-234.
- Camarero S., Ibarra D., Martínez M., Martínez M. (2005). Lignin-Derived Compounds as Efficient Laccase Mediators for Decolorization of Different Types of Recalcitrant Dyes. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**:1775–1784.

- Campos R., Kandelbauer A., Robra K., Cavaco-Paulo A., Gübitz G. (2001). Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Biotechnology*. **89**:131–139.
- Cano-Hernández M., Solís-Oba M., Loera O. (2009). Discoloration of Direct Brown 2 dye from a solution using *Trametes versicolor*, *Phanerochaete cryssporium* and *Pleurotus ostreatus*. Enviado a la *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*.
- Castillo G. (2004). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. IDRC, IMTA, Canadá. pp. 202.
- Cha C., Doerge D., Cerniglia C. (2001). Biotransformation of Malachite Green by the Fungus *Cunninghamella elegans*. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**: 4358-4360.
- Champagne P. P., Ramsay J. A. (2010). Dye decolorization and detoxification by laccase immobilized on porous glass beads. *Bioresource Technology*. **101**: 2230–2235.
- CONAGUA, Comisión Nacional del Agua. Acerca del agua. <http://www.cna.gob.mx/Espaniol/TmpContenido.aspx?id=e7820bc7-2da0-4646-a13e-ba8d39bd2493|%20%20%20%20%20%20%20%20ACERCA%20DEL%20AGUA|2|0|0|0>. Fecha de consulta: 17 de mayo de 2010a.
- CONAGUA, Comisión Nacional del Agua. Usos del agua e infraestructura. <http://www.conagua.gob.mx/Espaniol/TmpContenido.aspx?id=712f904d-5122-48e5-94f6-22b3972b422a%7CAgua%20en%20el%20mundo%7C0%7C0%7C281%7C0%7C0>. Fecha de consulta: 17 de mayo de 2010b.
- COVENIN. Norma Venezolana 1283-90. (1990). Colorantes textiles. Definiciones y clasificación (1ª revisión). *Comisión Venezolana de Normas Industriales Ministerio de fomento*.

- D'Acunzo F., Galli C., Masci B. (2002). Oxidation of phenols by laccase and laccase-mediator systems solubility and steric issues. *European Journal of Biochemistry* . **269**: 5330-5335.
- Días A., Bezerra R., Lemos P., y Pereira A.N. (2003). In vivo and laccase-catalysed decolourization of xenobiotic azo dyes by a basidiomycetous fungus: characterization of its ligninolytic system. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **19**:969–975.
- Dogan D., Türkdemir H. (2005). Electrochemical oxidation of textile dye indigo. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **80**:916–923.
- Durán U. (2005). Tratamiento de aguas residuales procedentes de la industria de resinas poliméricas con aceptores de electrones simultáneos. Tesis de maestría. *Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa*. México, D.F.
- Duygu H., Ünyayar A., Mazmanc M. A. (2005). Decolourisation of reactive textile dyes Drimarene Blue X3LR and Remazol Brilliant Blue R by *Funalia trogii* ATCC 200800. *Biodegradation*. **16**: 195–204.
- Elisashvili V., Kachlishvili E., Penninckx M. (2008). Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **35**:1531–1538.
- Farani de Souza D., Kirst Tychanowicz G. K., Marques de Souza C. G., Peralta R. M. (2006). Co-production of ligninolytic enzymes by *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state cultures. *Journal of Basic Microbiology*. **46**: 126-134.
- García B., Solís J. (2008). ¿Contaminando con sus jeans?. *La ciencia y el hombre. Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana*. **21**(1).
- Gomare S. S., Tamboli D. P., Kagalkar A. N., Govindwar S. P. (2009). Eco-friendly biodegradation of a reactive textile dye Golden Yellow HER by *Brevibacillus laterosporus* MTCC 2298. *International Biodeterioration & Biodegradation*. **63**: 582–586.

- Haq IU., Mukhtar H. (2004). Biosynthesis of proteases by *Rhizopus oligosporus* IHS13 in low-cost medium by solid-state fermentation. *Journal of Basic Microbiology*. **44**: 280-287.
- Husain Q. (2006). Potential Applications of the Oxidoreductive Enzymes in the Decolorization and Detoxification of Textile and Other Synthetic Dyes from Polluted Water: A Review. *Critical Reviews in Biotechnology*. **26**:201–221.
- INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Industria manufacturera. Producto interno bruto por entidad federativa 1998-2003. <http://cuentame.inegi.org.mx/economia/secundario/manufacturera/default.aspx?tema=E>. Fecha de consulta: 17 de mayo de 2010a.
- INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Número de habitantes. Estadísticas Sociodemográficas. Población total según sexo 1950 a 2005. <http://cuentame.inegi.org.mx/poblacion/habitantes.aspx?tema=P>. Fecha de consulta: 17 de mayo de 2010b.
- Jagadeesh R. V., Vaz N., Gowda N. M. (2008). Ruthenium Catalyzed Oxidative Conversion of Isatins to Anthranilic Acids: Mechanistic Study. *American Institute of Chemical Engineers Journal*. **54**:756-765.
- Jiménez G., Mejía A., López B. (1999). Actividad de las enzimas linginolíticas de *Phanerochaete chrysosporium* y su variación con la adición de Mn^{+2} . *Revista Académica Colombiana de Ciencia*. **23**: 587-594.
- Jing D., Li P., Stagnitti F., Xiong X. (2007). Optimization of laccase production from *Trametes versicolor* by solid fermentation. *Canadian Journal of Microbiology*. **53**: 245-251.
- Johannes C. Majcherczyk A. (2000). Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**: 524-528.

- Juárez M.E. (2008). Tratamiento de efluentes generados por la industria textil, aplicando sistemas biotecnológicos, químicos y electroquímicos. Tesis de Maestría. *Instituto Politécnico Nacional*. Tlaxcala.
- Kandelbauer A., Erlacher A., Cavaco-Paulo A., Guebitz G. (2004). Laccase-catalyzed Decolorization of the Synthetic Azo-dye Diamond Black PV 200 and of some Structurally Related. *Biocatalysis and Biotransformation*. **22**: 331-339.
- Kapanen A., Itävaara M. (2001). Ecotoxicity Tests for Compost Applications. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **49** 1-16.
- Khelifi R., Belbahri L., Woodward S., Ellouz M., Dhouib A., Sayadi S., Mechichi T. (2010). Decolourization and detoxification of textile industry wastewater by the laccase-mediator system. *Journal of Hazardous Materials*. **175**: 802–808.
- Kumarasamy Murugesan & In-Hee Yang & Young-Mo Kim & Jong-Rok Jeon & Yoon-Seok Chang. (2009). Enhanced transformation of malachite green by laccase of *Ganoderma lucidum* in the presence of natural phenolic compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **82**: 341–350.
- Kuwahara M., Glenn J. K., Morgan M. A., Gold M. H. (1984). Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Federation of European Biochemical Societies*. **169**: 247-250.
- Levin L., Herrmann C., Papinutti V. L. (2008). Optimization of lignocellulolytic enzyme production by the white-rot fungus *Trametes trogii* in solid-state fermentation using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*. **39**: 207–214.
- Levin L., Papinutti L., Forchiassin F. (2004). Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. *Bioresource Technology* 94: 169–176.

- Loera O., Pérez Ma., Barbosa J., Villaseñor F. (2006). In: Guevara-González R., Torres-Pacheco I, editors. *Laccases. Advances in Agricultural and Food Biotechnology*. 323-340.
- Maalej-Kammoun M., Zouari-Mechichi H., Belbahri L., Woodward S., Mechichi T. (2009). Malachite green decolourization and detoxification by the laccase from a newly isolated strain of *Trametes* sp. *International Biodeterioration & Biodegradation*. **63**: 600–606.
- Macchione M. M, Merheb C. W., Gomes E., Da Silva R. (2008). Protease production by different thermophilic fungi. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **146**: 223-230.
- Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. (2004). Brock. *Biología de los microorganismos*. PEARSON, Prentice Hall. 10ª Edición pag. 931.
- Maganhotto de Souza Silva C. M, Soares de Melo I., de Oliveira P. R. (2005). Ligninolytic enzyme production by *Ganoderma spp.* *Enzyme and Microbial Technology*. **37**: 324–329.
- Martínez F. J. (2009). *Metanogénesis de lixiviados provenientes de reactores anaerobios que tratan residuos sólidos urbanos*. Tesis de Especialización. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, D.F.
- Mazumder S. Basu S. K., Mukherjee M. (2009). Laccase production in solid-state and submerged fermentation by *Pleurotus ostreatus*. *Engineering in Life Sciences*. **9**: 45–52.
- McMullan G., Meehan C., Conneely A., Kirby N., Robinson T., Nigam P., Banat I. M., Marchant R., Smyth W. F. (2001). Microbial decolourisation and degradation of textile dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology* . **56**:81–87.
- Medina R. E. (2003). *Caracterización de lacasas producidas por un hongo termofílico silvestre aislado a partir de desechos lignocelulósicos*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, D.F.
- Mitra P., Chakraverty R., Chandra A. (1996). Production of proteolytic enzymes by solid state fermentation. *Journal of Scientific and Industrial Research*. **55**: 439-442.

- Mohandass R., Anusha B., Kalavathy S. (2008). Decolorization and biodegradation of Indigo carmine by a textile soil isolate *Paenibacillus larvae*. *Biodegradation*. **19**:283–291.
- Morrison R., Boyd R. (1998). Química Orgánica. 5a Edición. *Pearson Addison Wesley*. México. pag. 964.
- Mouso N., Diorio L., Forchiassin F. (2007). Accion de *Stereum hirsutum* (Wild) Pers. en la degradación de colorantes. *Revista Iberoamericana de Micología*. **24**: 294-298.
- Munteanu F., Pancan B. (2008). Bioelectrochemical Monitoring of a Reactive Dye Using Laccase Biosensor. *Chemical Bulletin of "POLITEHNICA" University of Timisoara*. **53**: 1-2.
- Murugesan K., Nam I., Kim Y., Chang Y. (2007). Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid state cultura. *Enzyme and Microbial Technology*. **40**: 1662–1672.
- Neifar M., Jaouani A., Ellouze-Ghorbel R., Ellouze-Chaabouni S., Penninckx M. J. (2009). Effect of culturing processes and copper addition on laccase production by the white-rot fungus *Fomes fomentarius* MUCL 35117. *Letters in Applied Microbiology*. **49**: 73-78.
- NMX-AA-030-SCFI-2001. Determinación de la demanda Química de oxígeno en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - método de prueba. Secretaría de Economía.
- Ordaz A. (2008). Efecto de la temperatura en la producción de enzimas lignocelulolíticas por *Trametes* sp. EUM1 en cultivo sólido. Tesis de Maestría. *Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa*. México, D.F.
- Osma J. F., Toca-Herrera J. L., Rodríguez-Couto S. Toca-Herrera B. (2010). Biodegradation of a simulated textile effluent by immobilised-coated laccase in laboratory-scale reactors. *Applied Catalysis A: General*. **373**: 147–153.

- Palmieri G., Giardina P., Bianco C., Fontanella B., Sannia G. (2000). Copper Induction of Laccase Isoenzymes in the Ligninolytic Fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**: 920–924.
- Papinutti L., Dimitriu P., Forchiassin F. (2008). Stabilization studies of *Fomes sclerodermeus* laccases. *Bioresource Technology*. **99**: 419–424.
- Papinutti V. L., Diorio L. A., Forchiassin E. F. (2003). Production of laccase and Manganese peroxidase by *Fomes sclerodermeus* grown on wheat bran. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*. **30**: 157–160.
- Park C., Lee M., Lee B., Kim S. W., Chase H. A., Lee J., Kim S. (2007). Biodegradation and biosorption for decolorization of synthetic dyes by *Funalia trogii*. *Biochemical Engineering Journal*. **36**: 59–65.
- Pazarlioglu N. K., Sarik M., Telefoncu A. (2005). Laccase: production by *Trametes versicolor* and application to denim washing. *Process Biochemistry*. **40**: 1673-1678.
- Peiji G., Yinbo Q., Xin Z., Mingtian Z., Yongcheng D. (1997). Screening microbial strain for improving the nutritional value of wheat and corn straws as animal feed. *Enzyme and Microbial Technology*. **20**: 581-584.
- Podgornik H, Poljansek I., Perdih A. (2001). Transformation of Indigo carmine by *Phanerochaete chrysosporium* ligninolytic enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*. **29**: 166–172.
- Prigione V., Tigini V., Pezzella C., Anastasi A., Sannia G., Varese G. (2008). Decolourisation and detoxification of textile effluents by fungal biosorption. *Water Research*. **42**: 2911–2920.
- Robinson T., Chandran B., Nigam P. (2002a). Removal of dyes from an artificial textile dye effluent by two agricultural waste residues, corncob and barley husk. *Environment International*. **28**: 29–33.

- Robinson T., Chandran B., Nigam P. (2002b). Removal of dyes from a synthetic textile dye effluent by biosorption on apple pomace and wheat straw. *Water Research*. **36**: 2824–2830.
- Robinson T., McMullan G., Marchant R., Nigam P. (2001). Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology*. **77**: 247-255.
- Rodríguez S., Sanromán Ma. (2005). Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal*. **22**:211-219.
- Rodríguez S., Toca-Herrera J. (2006). Lacasses in the textile industry. *Biotechnology and Molecular Biology Review*. **1**: 117-122.
- Sarnthima R. y Khammuang S. (2008). Laccase isozymes of *Pleurotus sajor-caju* culture on husk and bran of black sticky rice and their potential on indigo carmine decolourisation. *African Journal of Biotechnology* . **7**: 3731-3736.
- Sathiya P., Deecaraman M., Periyar S., Murugesan K., Kalaicheivan T. (2007). Biosorption of textile dyes and effluents by *Pleurotus florida* and *Trametes hirsute* with evaluation of their laccase activity. *Iranian Journal of Biotechnology*. **5**: 114-118.
- Selvam K., Swaminathan K., Chae K. S. (2003). Decolourization of azo dye industry effluent by a white rot fungus *Thelephora* sp. *Bioresource Technology*. **88**: 115-119.
- Solís M. M. (2005). Estudio del mecanismo de acción del ABTS y la lacasa para la oxidación de compuestos orgánicos. Tesis de Doctorado. *Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa*. México, D.F.
- Songulashvili G., Elisashvili V., Wasser S., Nevo E., Hadar Y. (2007). Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. *Enzyme and Microbial Technology*. **41**: 57–61.
- Sugimoto H., Barbosa A., Dekker R., Castro-Gomez R. (2001). Veratryl alcohol stimulates fruiting body formation in the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *Microbiology Letters*. **194**: 235-238

- Svobodová K., Majcherczyk A., Novotný C., Kües U. (2008). Implication of mycelium-associated laccase from *Irpex lacteus* in the decolorization of synthetic dyes. *Bioresource Technology*. **99**: 463–471.
- Svobodová K., Senholdt M., Novotný C., Rehorek A. (2007). Mechanism of Reactive Orange 16 degradation with the white rot fungus *Irpex lacteus*. *Process Biochemistry*. **42**: 1279–1284.
- Tavcar M., Svobodová K., Kuplenk S., Novotný C, Pavko A. (2006). Biodegradation of Azo Dye RO16 in Different Reactors by Immobilized *Irpex lacteus*. *Acta Chimica Slovenica*. **53**: 338–343.
- Téllez-Téllez M., Fernández F. J., Montiel-González A. M., Díaz-Godínez G. (2008). Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **81**: 675–679.
- Téllez-Téllez M., Sánchez C., Loera O., Díaz-Godínez G. (2005). Differential patterns of constitutive intracellular laccases of the vegetative phase for *Pleurotus* species. *Biotechnology Letters*. **27**:1391–1394.
- Temp U, Eggert C. (1999). Novel interaction between lacasse and cellobiose dehydrogenase during pigment synthesis in the white rot fungus. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 389–395.
- Tien M., Kirk T. K. (1988). Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*, In: *Methods in Enzymology*. **49**: 161:238
- Ullah M. A., Kadhim H., Rastall R. A., Evans C. S. (2000). Evaluation of solid substrates for enzyme production by *Coriolus versicolor*, for use in bioremediation of chlorophenols in aqueous effluents. *Applied Microbiology and Biothechnology*. **54**: 832-837.
- Valasková V., Baldrian P. (2006). Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Piptoporus betulinus*. *Research in Microbiology*. **157**: 119-124.

- Vares T., Kalsi M., Hatakka A. (1995). Lignin peroxidases, manganese peroxidases, and other ligninolytic enzymes produced by *Phlebia radiata* during solid-state fermentation of wheat straw. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**: 3515-3520.
- Viniegra-González y Favela-Torres. (2006). Why Solid-State Fermentation Seems to be Resistant to Catabolite Repression?. *Food Technology and Biotechnology*. **44**: 397–406
- Wadhia K., Thompson K. C. (2007). Low-cost ecotoxicity testing of environmental samples using microbiotests for potential implementation of the Water Framework Directive. *Trends in Analytical Chemistry*. **26**: 300-307.
- Wambuguh D. y Chianelli R. R. (2008). Indigo dye waste recovery from blue denim textile effluent: a by-product synergy approach. *New Journal of Chemistry*. **32**: 2189–2194.
- World Water Assessment Programme. (2009). The United Nations World Water Development. *Water in a Changing World*. UNESCO. Paris and London: Earthscan.
- Young L, Yu J. (1997). Ligninase-catalysed decolorization of synthetic dyes. *Water Research*. **31**: 1187–1193.
- Zhang S. J., Yang M., Yang Q. X., Zhang Y., Xin B. P., Pan F. (2003). Biosorption of reactive dyes by the mycelium pellets of a new isolate of *Penicillium oxalicum*. *Biotechnology Letters*. **25**: 1479–1482.
- Zille A., Tzanov T., Gübitz G. M., Cavaco-Paulo A. (2003). Immobilized laccase for decolourization of Reactive Black 5 dyeing Effluent. *Biotechnology Letters*. **25**: 1473–1477.

11. Anexos

Anexo I: Curva estándar de albúmina sérica bovina (ASB)

Se preparó una solución de ASB (1 mg/mL), diluyendo 0.05 g de ASB en 50 mL de agua destilada. Posteriormente se tomó un volumen de 2.5 mL de ésta solución y se diluyó con agua destilada hasta 50 mL en un matraz aforado para obtener una concentración final de 50 µg/mL. A partir de ésta solución se realizó una serie de diluciones con agua destilada para obtener un intervalo de concentraciones de ASB de 1 a 7 µg/mL. Para iniciar la reacción se agregaron 0.2 mL de reactivo de Bradford (Sigma Aldrich) en cada una de las concentraciones evaluadas. Después de 5 min de reacción a temperatura ambiente se determinó la absorbancia a 595 nm utilizando como blanco la solución sin ASB. La curva se realizó por duplicado. La Fig I.1 muestra los datos experimentales y el modelo ajustado.

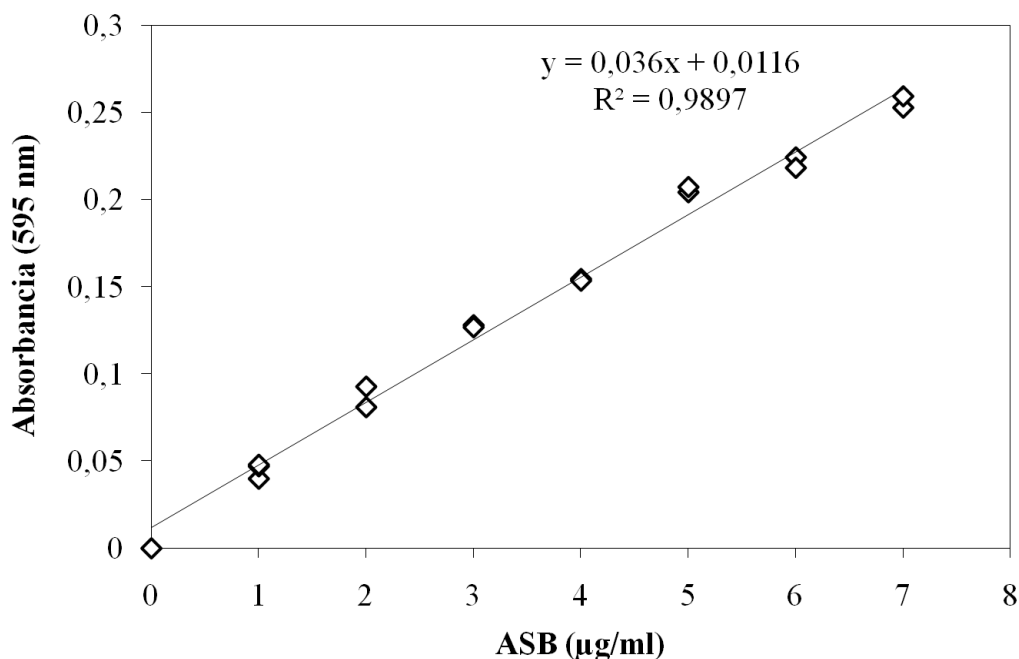


Fig. I.1 Curva patrón para la determinación de proteína extracelular.

Anexo II: Determinación de la demanda Química de oxígeno en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - método de prueba. NMX-AA-030-SCFI-2001

PRINCIPIO DEL MÉTODO. Una gran cantidad de compuestos orgánicos e inorgánicos son oxidados con una mezcla de ácido crómico y sulfúrico a ebullición. La muestra se coloca a reflujo en una disolución de ácido fuerte con un exceso conocido de dicromato de

potasio ($K_2Cr_2O_7$). Después de la digestión, el dicromato no reducido se mide por titulación o espectrofotométricamente para determinar la cantidad de dicromato consumido y calcular la materia oxidable en términos de oxígeno equivalente.

REACTIVOS Y PATRONES. Todos los productos químicos usados en este método deben ser grado reactivo, a menos que se indique otro grado.

Agua: Debe entenderse agua que cumpla con las siguientes características:

- a) Resistividad: megaohm-cm a 25°C: 0,2 min.;
- b) Conductividad: $\mu S/cm$ a 25°C: 5,0 máx., y
- c) pH: 5,0 a 8,0.

Método reflujo cerrado / método espectrofotométrico:

- Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4)
- Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)
- Sulfato mercúrico ($HgSO_4$)
- Sulfato de plata (Ag_2SO_4)
- Biftalato de potasio patrón primario ($HOOC_6H_4COOK$)
- Disolución estándar de biftalato de potasio (1 mL= 1 mg de DQO).

Deshacer los grumos y secar el biftalato de potasio a 120°C. Pesar aproximadamente y con precisión 0,851 g de biftalato de potasio, disolver en agua y aforar a 1 L. Es estable hasta por 3 meses cuando se mantiene en refrigeración y si no se observa crecimiento biológico.

Disolución de sulfato de plata en ácido sulfúrico. Pesar aproximadamente y con precisión 15 g de sulfato de plata (ver inciso 4.1.4) y disolver en 1 L de ácido sulfúrico concentrado (ver inciso 4.1.1). El sulfato de plata requiere un tiempo aproximado de dos días para su completa disolución. La disolución formada debe mantenerse en la obscuridad para evitar su descomposición.

Disolución de digestión A (alta concentración). Pesar aproximadamente y con precisión 10,216 g de dicromato de potasio, previamente secado a 103°C por 2 h, y añadirlos a 500 mL de agua, adicionar 167 mL de ácido sulfúrico concentrado y aproximadamente 33,3 g de sulfato mercúrico. Disolver y enfriar a temperatura ambiente. Aforar a 1 L con agua.

Disolución de digestión B (baja concentración). Pesar aproximadamente y con precisión 1,021 6 g de dicromato de potasio, previamente secado a 103°C por 2 h, y añadirlos a 500 mL de agua. Adicionar 167 mL de ácido sulfúrico concentrado y 33,3 g de sulfato mercúrico. Disolver y enfriar a temperatura ambiente. Aforar a 1 L con agua.

PROCEDIMIENTO. Método a reflujo cerrado/ método espectrofotométrico.

- Precalentar a 150°C el digestor de DQO
- Colocar en los tubos de reacción 2 mL de la muestra previamente homogeneizada.
- Agregar cuidadosamente 1 mL de la solución digestora.
- Añadir cuidadosamente 2 mL de la disolución de sulfato de plata en ácido sulfúrico.
- Suavemente invertir los tubos varias veces.

NOTA.-La disolución es fuertemente ácida y el tubo se calienta en este proceso, trabajar con guantes aislantes.

- Colocar los tubos en el digestor previamente calentado a 150°C y reflujar por 2 h.
- Retirar los tubos del digestor y dejar que los tubos se enfríen a temperatura ambiente, permitiendo que cualquier precipitado se sedimente.
- Medir la absorbancia en el espectrofotómetro (620 nm), previamente calibrado.

Para aguas que contengan una DQO baja (5 mg/L a 75 mg/L), utilizar la disolución de digestión B. Si el valor de la DQO determinado es más alto que 75 mg/L después de usar estos reactivos, reanalizar la muestra, utilizando la disolución A.

Anexo III: Preparación de soluciones

1. Agua dura reconstituida (Castillo, 2004)

Para su preparación se colocaron en un garrafón: 9.5 L de agua desionizada y se adicionaron:

- 1.2 g de $MgSO_4$
- 1.92 g de $NaHCO_3$
- 0.08 g de KCl .

La solución se agitó hasta disolver completamente las sales. Paralelamente, se disolvieron 1.2 g de $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ en 0.5 L de agua desionizada. Terminada la solubilización de la sal, se incorporó la solución de $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ al garrafón, permitiendo obtener 10 L de agua dura reconstituida.

2. Medio Mineral de Visser

La siguiente tabla muestra la formulación del medio mineral y de la solución de elementos traza.

Tabla III.1 Formulación del medio mineral Visser

Componente	Concentración (g/L)
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.703
K ₂ HPO ₄	0.6
NH ₄ Cl	0.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.111
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1
Fuente de Carbono (Glucosa)	0.795
Solución de elementos traza	1
Solución de elementos traza	
FeCl ₂ ·4H ₂ O	2
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.786
Na ₂ SeO ₃	0.1
H ₃ BO ₃	0.05
ZnCl ₂	0.05
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂	0.05
AlCl ₃	0.05
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.05
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.07
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.05
HCl 36% (Concentrado) 0.5	0.5 mL

(Durán, 2005)