SEP SNEST DGEST

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TOLUCA

TRATAMIENTO DEL AGUA RESIDUAL DE UNA INDUSTRIA ALIMENTICIA UTILIZANDO LA BIOMASA INMOVILIZADA *Phanerochaete chrysosporium* EN UN REACTOR AIRLIFT CON PARÁMETROS CONTROLADOS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA AMBIENTAL

PRESENTA

ROSARIO ESMERALDA SIERRA SOLACHE

DIRECTORA

DRA. CLAUDIA ROSARIO MURO URISTA

CO-DIRECTOR

DR. ALEJANDRO TÉLLEZ JURADO

METEPEC, ESTADO DE MÉXICO, AGOSTO 2014.

" 2014, Año de Octavio Paz"

Metepec, Méx., 14/Julio/2014

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

DEPI-395-569/2014

ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DE TESIS

C. ROSARIO ESMERALDA SIERRA SOLACHE
Candidata al Grado de Maestra en Ciencias,
en Ingeniería Ambiental
P R E S E N T E.

De acuerdo con el Reglamento de Titulación del Sistema Nacional de Educación Superior Tecnológica de la Subsecretaría de Educación Superior de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora realizó con respecto a su Trabajo de Tesis titulado **"TRATAMIENTO DEL AGUA RESIDUAL DE UNA INDUSTRIA ALIMENTICIA UTILIZANDO LA BIOMASA INMOVILIZADA Phanerochaete chrysosporium EN UN REACTOR AIRLIFT CON PARAMETROS CONTROLADOS"** la División de Estudios de Posgrado e Investigación concede autorización para que proceda a la impresión del mismo.

Sin más por el momento, quedo de usted.

A T E N T A M E N T E

DRA. YESICA IMELDA SAAVEDRA BENÍTEZ
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

SECRETARIA DE EDUCACION PUBLICA
INSTITUTO TECNOLOGICO DE TOLUCA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

YISB/MICM

" 2014, Año de Octavio Paz"

Metepec, Méx., 11/Julio/2014

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

DEPI-395-566/2014

DRA. YESICA I. SAAVEDRA BENÍTEZ
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN
P R E S E N T E.

Por este medio comunicamos a usted que la Comisión Revisora designada para analizar la tesis denominada **"TRATAMIENTO DEL AGUA RESIDUAL DE UNA INDUSTRIA ALIMENTICIA UTILIZANDO LA BIOMASA INMOVILIZADA Phanerochaete chrysosporium EN UN REACTOR AIRLIFT CON PARAMETROS CONTROLADOS"**, que como parte de los requisitos para obtener el grado académico de Maestría en Ciencias en Ingeniería Ambiental presenta la **C. ROSARIO ESMERALDA SIERRA SOLACHE**, con número de control 1228M1097 para sustentar el acto de Recepción Profesional, ha dictaminado que dicho trabajo reúne las características de contenido y calidad necesario para proceder a la impresión del mismo.

ATENTAMENTE

DRA. CLAUDIA ROSARIO MURO URISTA
DIRECTORA DE TESIS

DR. ALEJANDRO TÉLLEZ JURADO
CO-DIRECTOR DE TESIS

DRA. MA. DEL CARMEN DÍAZ NAVA
REVISORA

DR. ISAÍAS DE LA ROSA GÓMEZ
REVISOR

DRA. AINOHA ARANA CUENCA
REVISORA

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado para el desarrollo de este trabajo a través del programa de “Becas Nacionales de Estudios de Posgrado”, al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) por el apoyo de asistencia al congreso de investigación y apoyo a la titulación.

A la División de Estudios de Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico de Toluca y al Laboratorio de Investigación en Ingeniería Ambiental (LIIA), por las facilidades otorgadas durante el desarrollo del trabajo experimental, así como al Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Politécnica de Pachuca por las asesorías brindadas.

Agradezco en especial a la Dra. Claudia Muro y al Dr. Alejandro Téllez Jurado por la oportunidad otorgada de realizar esta investigación, así como a los revisores Dra. María del Carmen Díaz Nava y Dr. Isaías de la Rosa Gómez por sus valiosas aportaciones.

A mi familia, amigas, profesores y compañeros por todo el apoyo recibido para este estudio.

RESUMEN

La generación de grandes volúmenes de aguas residuales y la diferencia en su contaminación, exigen la investigación y diseño de tratamientos eficientes y sustentables, de bajo costo con equipos sencillos, fáciles de operar y cuyo gasto energético no supere el beneficio por la depuración del efluente.
La búsqueda de nuevas estrategias en tratamientos biológicos es el tema que ocupa esta investigación. Particularmente en lo que se refiere al uso de un microorganismo inmovilizado (*Phanerochaete chrysosporium*) en el tratamiento aerobio de efluentes de una industria alimenticia en un biorreactor airlift.

Los experimentos desarrollados abarcan la caracterización del influente en estudio, el mantenimiento de la cepa HEMIM-5 de *P. chrysosporium* y la inmovilización de su biomasa en esferas de alginato de sodio-calcio, probando diferentes variantes en el tratamiento, como tamaño de esfera, cantidad de esferas y la modificación de porosidad y consistencia de la esfera.

El tratamiento del efluente se dividió en dos etapas, pruebas realizadas a nivel laboratorio utilizando un matraz bajo un régimen de operación tipo batch durante 8 días, empleando un sistema de agitación de orbital para proporcionar la aeración adecuada, y pruebas realizadas a nivel piloto en un reactor airlift de 4 L con suministro de aire de 1.5 L/min, el cual fue operado también en batch durante 8 días.

En estas dos pruebas se uso biomasa viva en forma libre e inmovilizada de *Phanerochaete chrysosporium*, se obtuvieron en todos los *casos,* datos sobre la calidad del agua tratada, biomasa del hongo y producción de enzimas*.*

Dentro de los resultados representativos de la caracterización del efluente, se encontró que la DQO se encuentra alrededor de 4400 mg/L, mostrando a través de este parámetro, que la carga contenida en el efluente es alta.

Con respecto a la inmovilización del *P. chrysosporium*, se determinó que la concentración más adecuada del alginato de sodio fue de 3.5 % p/v, la concentración de cloruro de calcio del 30%, proporcionando una consistencia firme en la esfera y alcanzando una considerable expansión del micelio. Por otro lado, la adición de $CaCO_3$, permitió obtener una esfera porosa suficiente, para conducir los nutrientes al hongo. Con respecto a la estabilidad de la esfera en contacto con el efluente, el tamaño de 4 mm de diámetro, mostró un mejor resultado, considerando el uso de 10 g de esferas por litro de efluente.

El tratamiento a nivel matraz, dio como resultado en micelio libre, una reducción de DQO de 37 %, mientras que los experimentos con biomasa inmovilizada, redujeron la DQO en un 47 %.

El tratamiento a nivel piloto desarrollado en el reactor airlift, reportó con micelio libre, una reducción de DQO de 63.3 % y con biomasa inmovilizada de *P. chrysosporium* se obtuvo una reducción de la DQO del 70 %.

El micelio libre tuvo un crecimiento significativo al desarrollarse 12 veces más, sin embargo generó aglomeraciones en el biorreactor.
Pese a estos alentadores resultados, se encontró una limitante; la imposibilidad de del reuso de las esferas para posteriores experimentos, por lo que es necesario realizar nuevas investigaciones para determinar un material con mayor resistencia a la permanencia en el agua.

ABSTRACT

The generation of large volumes of wastewater and the difference in pollution, require research and design of efficient, sustainable treatments, simple equipment of low cost, easy to operate and whose energy expenditure does not exceed the benefit obtained by scrubbing effluent.

The search for new strategies in biological treatments is the issue of this research. Particularly in regards to the use an immobilized microorganism (*Phanerochaete chrysosporium*) in the aerobic treatment of effluents from food-processing industry in an airlift bioreactor.

The experiments performed include the influent characterization, maintaining HEMIM-5 strain of *P. chrysosporium* and biomass immobilization in alginate beads sodium-calcium, trying different variations in treatment, such as field size, quantity of spheres, modification of porosity and consistency of the sphere.

The effluent treatment was divided into two stages: a flask level tests under a regime operation type of batch for 8 days, using a system of orbital agitation to provide adequate aeration, and tests on a pilot level of airlift reactor 4 L with 1.5 L/min air supply, which was also operated in batch for 8 days.

In both tests living biomass was used in free and immobilized *Phanerochaete chrysosporium* form, obtaining in all cases, data on the quality of treated water, fungal biomass and enzyme production.

Within the representative results characterization of effluent, it was found that the COD is about 4400 mg/L, showing by this parameter, the charge contained in effluent is high.

Regarding the immobilization of *P. chrysosporium*, we determined the most suitable concentration of sodium alginate was 3.5% w/v, the concentration of calcium chloride was 30 %, providing a strong consistency in the sphere and reaching a considerable expansion of mycelium. Furthermore, the addition of $CaCO_3$, yielding porosity enough to the sphere, to conduct nutrients to the fungi. In reference to the stability of area in contact with effluent, size of 4 mm in diameter, showed a better result, considering use of spheres 10 g per liter of effluent.

The result of the flask level treatment using free mycelium was, a COD reduction of 37%, while experiments with immobilized biomass, reduced COD of 47%.

The pilot treatment developed in the airlift reactor level reported with free mycelium, a COD reduction of 63.3 % and immobilized *P. chrysosporium* biomass, the COD reduction of 70 % was obtained.

Free mycelium had a significant growth, it developed 12 times more, however agglomerates were generated in bioreactor.
Despite these encouraging results, a limitation was found; impossibility to reuse spheres for further experiments, so further research is necessary to determine a material with greater resistance to stay in the water.

ÍNDICE

	pág
ÍNDICE DE TABLAS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
INTRODUCCIÓN	1
1. FUNDAMENTOS	3
1.1 Agua residual de la industria alimenticia	4
1.1.1 Agua residual de la Industria Cervecera	9
1.2 Procesos de tratamiento de efluentes provenientes del sector alimenticio	12
1.2.1 Biorremediación	16
1.3 Hongos de podredumbre blanca	17
1.3.1 Enzimas ligninolíticas de los hongos de podredumbre blanca	18
1.3.2 *Phanerochaete chrysosporium*	21
1.4 Inmovilización de microorganismos	23
1.4.1 Inmovilización pasiva	25
1.4.2. Inmovilización activa	26
1.5 Biorreactores	31
1.5.1 Biorreactor airlift	33
2. MÉTODO	37
2.1 Caracterización del efluente	38
2.2 Inmovilización de *P. chrysosporium*	46
2.2.1 Adaptación del hongo en medios de cultivo sólido	46
2.2.2 Inmovilización del *P. chrysosporium* en esferas de alginato de sodio-calcio	47
2.2.2.1. Variación de la concentración de alginato	48
2.2.2.2. Variación de la concentración de la solución de cloruro de calcio	48
2.2.2.3. Adición de carbonato de calcio a la solución de alginato	50
2.2.3. Caracterización de la esfera de alginato	50
2.3 Evaluación del efecto de la inmovilización del *P. chrysosporium* en	52

diferentes medios de cultivo
2.3.1 Preparación de los medios de cultivo 53
2.3.1.1 Medio compuesto por el remojo de cebada 54
2.3.1.2 Medio AB suplementado con dextrosa 55
2.3.1.3 Medio AB sin dextrosa 57
2.4 Tratamiento de agua a nivel laboratorio 57
2.4.1 Determinación de la relación biomasa sustrato del efluente 58
2.4.2 Determinación de las características del efluente tratado 58
2.4.3 Determinación de la biomasa de *P. chrysosporium* 59
2.4.4 Determinación de enzimas secretadas por el *P. chrysosporium* 59
2.5 Instrumentación y automatización del Biorreactor 60
2.6 Tratamiento del agua residual a nivel piloto 62
2.6.1 Evaluación de las características del efluente residual con micelio libre 62
2.6.2 Evaluación de las características del efluente residual con micelio inmovilizado 63
3. RESULTADOS 64
3.1 Caracterización del agua residual de la industria cervecera 64
3.2 Inmovilización del *P. chrysosporium* 67
3.2.1 Adaptación del hongo en medios de cultivo sólido 67
3.2.2 Inmovilización del *P. chrysosporium* en esferas de alginato de sodio-calcio 68
3.2.2.1 Variación de la concentración de alginato 69
3.2.2.2 Variación de la concentración de la solución de cloruro de calcio 70
3.2.2.3 Adición de carbonato de calcio a la solución de alginato 71
3.2.3. Caracterización de la esfera de alginato 75
3.3 Evaluación del efecto de la inmovilización del *P. chrysosporium* en diferentes medios de cultivo 76
3.4 Tratamiento de agua residual a nivel laboratorio 82
3.4.1 Determinación de la relación biomasa sustrato del efluente 82

3.4.2 Determinación de las características del efluente tratado 84
3.4.3 Determinación de la biomasa de *P. chrysosporium* 85
3.4.4 Determinación de enzimas secretadas por el *P. chrysosporium* 85
3.5 Instrumentación y automatización del Biorreactor 86
3.6 Tratamiento de agua residual a nivel piloto 88
3.6.1 Evaluación de las características del efluente residual con micelio libre 88
3.6.2 Evaluación de las características del efluente residual con micelio inmovilizado 92
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 99
REFERENCIAS 101

ÍNDICE DE TABLAS

		pág.
1.1.	Resumen tratamientos de aguas residuales en México (CONAGUA 2009).	5
1.2.	Contenido de agua virtual por unidad de producto (Hoekstra y Chapagaing, 2007).	6
1.3.	Abastecimiento y descarga de agua de acuerdo al tipo de industria alimenticia (IMTA, 2010).	7
1.4.	Volumen y carga contaminante de los efluentes de diferentes etapas de proceso de algunas industrias alimenticias (Muro *et al.*, 2012).	8
1.5.	Operaciones y procesos unitarios de tratamiento de aguas residuales (Simate *et al.,* 2011).	14
1.6.	Hongos productores de enzimas ligninolíticas (Dávila y Vázquez-Duhalt, 2006).	19
1.7.	Enzimas ligninolíticas y sus reacciones (Rodríguez, 2009).	20
1.8.	Clasificación del *P. chrysosporium.*	23
1.9.	Clasificación de métodos y técnicas de inmovilización (Fajardo-Ochoa *et al.,* 2011).	24
1.10.	Producción de enzimas ligninolíticas en algunos compuestos comúnmente utilizados como soporte para el *Phanerochaete chrysosporium* (Rodríguez y Sanromán, 2004).	26
1.11.	Comparación entre polímeros naturales y sintéticos usados en la inmovilización y aplicado a aguas residuales (Garzón-Jiménez, Barragán-Huerta; 2008).	28
1.12.	Resumen de algunas aplicaciones del *Phanerochaete chrysosporium* inmovilizado.	30
3.1.	Parámetros de calidad de los efluentes de la industria cervecera sin tratar y tratado en una planta convencional.	66
3.2.	Micelio *P. chrysosporium* desarrollado en PDY, PDA y AB.	68

3.3.	Prueba de esferas de alginato con $CaCO_3$ de 3 y 4 mm de diámetro.	72
3.4.	Datos de la modificación de algunos parámetros del medio de cultivo en contacto con micelio inmovilizado de *P chrysosporium* durante 8 días.	77
3.5.	Comparativa de azucares reductores de 3 diferentes medios de cultivo en contacto con micelio inmovilizado de *P. chrysosporium* durante 8 días.	79
3.6.	Apariencia y biomasa con diferentes cantidades de esferas.	83
3.7.	Calidad del efluente del reactor utilizando biomasa libre para *P. chrysosporium.*	89
3.8.	Calidad del efluente del reactor utilizando *P. chrysosporium* inmovilizado.	93
3.9.	Biomasa del *P. chrysosporium* inmovilizada obtenida al finalizar el tratamiento del efluente con el reactor airlift	97

ÍNDICE DE FIGURAS

		pág.
1.1.	Proceso de remojo de grano (izquierda Maltería Tibito Bavaria, derecha Grupo Modelo).	11
1.2.	Proceso de elaboración de la cerveza (Grupo Modelo, 2014).	11
1.3.	*Phanerochaete chrysosporium* (Universidad de Wisconsin, 2014).	22
1.4.	Hifas al microscopio del *P. chrysosporium* (Ingraham, 1998).	22
1.5.	Esquema de un Biorreactor Airlift.	35
2.1.	Bosquejo del método.	37
2.2.	pH-metro HANNA modelo HI 9126.	38
2.3.	Turbidímetro Cole Parmer	39
2.4.	Conductímetro Denver Instrument	40
2.5.	Digestor modelo DBR 200 marca HACH, encendido a 150 ºC en modo COD.	41
2.6.	Enfriamiento de muestras posteriores a la digestión.	43
2.7.	Medidor de oxigeno HANNA modelo HI4195	43
2.8.	Espectrofotómetro marca PerkinElmer modelo Lambda 35.	45
2.9.	Curva de calibración para determinación de proteínas (r^2=0.9980)	45
2.10.	Contenido de una caja de Petri de *P. chrysosporium cultivado* en PDA y cuadriculado para obtener micelio suspendido en forma homogénea.	47
2.11.	Mezcla alginato de sodio y micelio suspendido.	48
2.12.	Vertido por goteo de la mezcla de alginato de sodio y micelio suspendido de *P. chrysosporium* en cloruro de calcio para formar perlas con micelio inmovilizado.	49
2.13.	Microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM-6610LV.	51
2.14.	Sortómetro BELSORP-aqua^3 (izquierda), introducción de muestras al equipo (derecha).	51

2.15.	Analizador orgánico CHNS-O vista exterior e interior.	53
2.16.	Cebada utilizada en el remojo.	54
2.17.	Remojo de cebada en agua, izquierda proporción de 100 g/130 mL, derecha proporción de 17.5 g/100 mL.	55
2.18.	Molienda y tamizado de AB.	55
2.19.	Medio AB suplementado con dextrosa.	56
2.20.	Medio AB.	57
2.21.	Agitador de orbital Heidolph modelo Unimax 1010 e Incubador modelo Inkubator 1000.	57
2.22.	Control de temperatura y resistencia en malla de silicón.	61
2.23.	Control de aire	61
3.1.	Muestras de efluentes de la industria cervecera: (izquierda) efluente de proceso de la industria cervecera sin tratar y (derecha) efluente tratado en una planta convencional de la industria cervecera.	65
3.2.	Esferas de alginato de sodio en concentraciones de 25, 30 y 35 g/L de izquierda a derecha respectivamente.	69
3.3.	Cultivo del hongo inmovilizado en esferas con diferente concentración de alginato de sodio en contacto con el medio AB adicionado con dextrosa, de izquierda a derecha 25, 30 y 35 g/L respectivamente.	70
3.4.	Inmovilización del micelio en esferas de alginato a concentraciones de 25, 30 y 35 % (de izquierda a derecha) de cloruro de calcio respectivamente.	71
3.5.	*Phanerochaete chrysosporium* inmovilizado en esferas de alginato con carbonato de calcio de 4 y 3 mm de diámetro.	73
3.6.	Imagen al microscopio con aumento de 2000 veces, para esferas de alginato de 4 mm de diámetro (imagen izquierda s/$CaCO_3$, imagen derecha c/$CaCO_3$).	75
3.7.	Imagen de esferas de alginato (imagen izquierda esfera de 3 mm con $CaCO_3$, imagen derecha esfera de 4 mm con $CaCO_3$)	76
3.8	Apariencia de las muestras del medio AB, (izquierda) modificación de	78

pH. (derecha) con pH modificado a 4.5 diariamente.

3.9. Apariencia del *P. chrysosporium* inmovilizado en esferas de alginato en un medio a base de melaza (izquierda), un efluente residual con adición de azúcares (centro) y un medio sin adición de azúcares (derecha). 80

3.10. Valores de DQO para el efluente (inicial), el efluente tratado con micelio libre e inmovilizado. 84

3.11. Valores de turbiedad para el efluente (inicial), el efluente tratado con micelio libre e inmovilizado. 85

3.12. Enzimas del efluente tratado con *P. chrysosporium* inmovilizado a nivel matraz. 86

3.13. Biorreactor airlift marca SEV, modelo FAR-4. 87

3.14. Comportamiento del DQO en reactor con micelio libre. 89

3.15. Proteínas del efluente del reactor con micelio libre. 90

3.16. Enzimas del efluente del reactor con micelio libre. 91

3.17. Biomasa obtenida al finalizar el tratamiento del efluente con el biorreactor airlift con *P. chrysosporium* libre. 92

3.18. Comportamiento del DQO en reactor con micelio inmovilizado. 94

3.19. Proteínas en el efluente del reactor con micelio inmovilizado. 94

3.20. Enzimas del efluente del reactor 95

3.21. Comparativa de enzimas en el efluente del reactor con micelio libre e inmovilizado. 96

INTRODUCCIÓN

El aprovechamiento de tecnologías sustentables y ecológicas es primordial para el avance de todo tipo de procesos e industrias, pero tomar medidas preventivas de contaminación, así como medidas correctivas sustentables en los efluentes ya contaminados, también es responsabilidad de los industriales y quienes hacemos uso del agua.

Dentro de los tratamientos de efluentes clasificados como limpios, se encuentra la depuración natural a través de microorganismos como los hongos de podredumbre blanca (HPB), los cuales pueden llegar a ser procesos eficientes, amigables y de bajo costo.

Los HPB, por su potente actividad degradadora de la lignina han sido estudiados en la remediación aerobia de contaminantes xenobióticos como colorantes, pesticidas, organoclorados, policíclicos aromáticos, hidrocarburos e incluso metales pesados, alcanzando niveles de degradación y/o remoción del 90% de los contaminantes.

Debido a su ya aplicabilidad para el tratamiento de efluentes a nivel industrial, se han encontrado algunas desventajas, entre ellas, el cizallamiento del hongo debido a la agitación en los biorreactores y el crecimiento ilimitado de biomasa, lo cual trae como consecuencia la obstrucción de las partes móviles en los sistemas de aireación. Bajo ese esquema, se han estudiado diferentes estrategias de inmovilización de células de microorganismos en diferentes soportes orgánicos y no orgánicos, y recientemente se busca el atrapamiento del micelio en matrices porosas de polímeros naturales a fin de superar las desventajas mencionadas y proteger al hongo de otros organismos y sustancias tóxicas presentes en las aguas residuales, entre otros beneficios.

En este trabajo se presenta un estudio de tratamiento de efluentes de una industria alimenticia con alto contenido de lignina debido al uso de materia prima de granos como trigo, arroz y cebada, mediante el uso de biomasa inmovilizada de *Phanerochaete chrysosporium*, el cual es considerado un modelo de HPB, por su capacidad de degradación ligninolítica y su adaptación al medio.

Como objetivo se planteó el tratamiento del efluente mediante una sola etapa de depuración en un biorreactor airlift con parámetros controlados de flujo de aire y temperatura, en sustitución del tratamiento de un proceso de depuración biológico aplicado en una planta convencional de tratamiento, el cual contempla un tratamiento anaerobio-aerobio.

La hipótesis que enmarca este trabajo fue establecida de la siguiente manera: El *P. chrysosporium* inmovilizado en un biorreactor airlift es eficiente para degradar los contaminantes del agua de la industria cervecera utilizando una sola etapa de tratamiento.

La distribución del trabajo se hizo en tres capítulos. El primer capítulo abarca la información de las características de los efluentes de industria alimenticia, el impacto en el ambiente y los procesos de solución actuales. Así como los procesos de biorremediación, la inmovilización de microorganismos y la tecnología de biorreactores. Referente al segundo capítulo se marca la metodología utilizada para la evaluación del tratamiento del agua residual de una industria alimenticia, técnicas y pruebas realizadas en las etapas de caracterización, adaptación, preparación y tratamientos a nivel laboratorio y piloto. Finalmente el tercer capítulo conjunta los resultados obtenidos en las pruebas experimentales, su discusión, las conclusiones obtenidas y recomendaciones generadas.

1. FUNDAMENTOS

Uno de los recursos más importantes para el ser humano y su supervivencia es el agua; fundamental para la vida y prácticamente de todas las actividades. Sin embargo el crecimiento de la población, el consumo, el cambio climático, entre otros factores antropogénicos, impactan de forma global en este recurso (Vörösmarty *et al.,* 2000). En los países en desarrollo este problema se agudiza por el incremento en actividades relacionadas con la agricultura, industria, manufactura, comercio y turismo; mismas que demandan más consumo de agua (Papadakis *et al.,* 2007) y por consecuencia la generación de mayor cantidad de efluentes contaminados. Hoekstra y Chapagain (2007), reportan a México en el lugar 10 de consumo de agua, utilizando el 2 % de la llamada huella de agua, con un valor per cápita de 1450 m^3. Mientras que la CONAGUA reportó en 2011 un valor per cápita semejante de 1440 m^3.

El agua residual posee características que varían de acuerdo a los usos y procedencia de este recurso, dividiéndose en cuatro grandes rubros; doméstico-municipal, industrial, del sector agrícola y pluvial (Ramalho, 1977). Particularmente, la contaminación del agua en la industria depende del uso de materias primas y elementos que convergen en el producto final.

La descarga de aguas industriales actualmente es uno de los grandes problemas de contaminación en México. Estos efluentes tienen grandes concentraciones de DQO, fenol y sus derivados, frecuentemente contiene metales, nutrientes inorgánicos, componentes orgánicos, proteínas, cianuros, pigmentos, lignina, etc. (Tripathi *et al.,* 2007).

Referente al tratamiento del agua residual SEMARNAT reportó que en 2009 fueron tratadas el 37.1 % de las aguas municipales y el 19.3 % de aguas no municipales

(incluye origen industrial); sin embargo no se reportan cifras de volúmenes reutilizados (CONAGUA, 2011).

1.1 Agua residual de la industria alimenticia

Especialmente las descargas de las industrias agro-alimenticia contienen sales, fibra, colorantes aditivos conservadores y en general material orgánico, los cuales afectan principalmente la vida acuática, el agua potable y la agricultura (Lefebvre y Moletta, 2006).

En las zonas urbanas del país se calcula que sólo un 37 % de las aguas residuales son tratadas y el resto se acumula en los cuerpos de agua donde desemboca el alcantarillado y efluentes domésticos e industriales. Las aguas que son dispuestas para ser tratadas, son canalizadas a plantas tratadoras, las cuales no siempre son las más adecuadas para el caudal a depurar.

En la Tabla 1.1, se muestran algunas de las tecnologías de tratamiento que utilizan las plantas tratadoras de aguas residuales en México y algunos datos de interés como el número de plantas que se ubican en México, capacidad y caudal. No obstante del número de plantas con las que ya se cuenta, aún hace falta mucho más, y otras de tipo industrial destinadas exclusivamente a la degradación o remoción de contaminantes específicos.

Recientemente, la conciencia ambiental de la población y la legislación que rige la emisión de contaminantes de origen industrial, además de la escases del agua, ha llevado a que este sector busque tecnologías que no solo le permitan disminuir la contaminación del agua, sino que le permitan reducir el consumo de ésta en los procesos y, tecnologías de tratamiento fino para el reciclaje de sus efluentes con fines de reuso dentro de sus actividades.

Tabla 1.1. Resumen tratamientos de aguas residuales en México (CONAGUA., 2009).

PROCESO	**PLANTAS**		**CAPACIDAD**		**CAUDAL**	
	No.	%	L/S	%	L/S	%
AEROBIO	7	0.34	311.5	0.26	134.6	0.15
ANAEROBIO	52	2.56	560	0.46	357.5	0.41
BIOLÓGICO	18	0.89	342	0.28	268.5	0.3
BIODISCOS	8	0.39	794.5	0.66	464.5	0.53
DUAL	10	0.49	4 676	3.87	4 175.6	4.74
FILTROS/PERCOLADORES	42	2.07	6 067	5.02	4 602.2	5.22
FOSA SÉPTICA	78	3.84	154.9	0.13	105.3	0.12
F. SÉPTICA+FILTRO B.	12	0.59	30.6	0.030	16.7	0.02
F. SÉPTICA+WETLAND	68	3.35	162.6	0.13	93.3	0.11
HUMEDALES	64	3.15	601.5	0.5	357.8	0.41
LAGUNAS AIREADAS	32	1.58	9 525.2	7.88	7 142.9	8.11
LAGUNAS ESTABILIZACIÓN	707	34.84	19 837.5	16.41	13 738.1	15.59
LODOS ACTIVADOS	546	26.91	57 958.8	47.95	40 919.7	46.43
PRIMARIO AVANZADO	16	0.79	11 240	9.3	9 814	11.14
PRIMARIO/SEDIMENTACIÓN	21	1.03	2 787.2	2.31	1 598.6	1.81
RAFA + FILTRO B.	24	1.18	135.3	0.11	79	0.09
RAFA	129	6.36	1 726.6	1.43	1 125.7	1.28
RAFA + HUMEDAL	9	0.44	60.7	0.05	41.6	0.05
REACTOR ENZIMATICO	61	3.01	143.5	0.12	109.6	0.12
SEDIMENTACIÓN+WETLAND	18	0.89	36.1	0.03	24.7	0.03
TANQUE IMHOFF	61	3.01	601.1	0.5	410.2	0.47
TANQUE IMHOFF + FILTRO	19	0.94	80.3	0.07	36.5	0.04
TANQUE IMHOFF +	1	0.05	80	0.07	80	0.09
TERCIARIO	2	0.1	75	0.06	66	0.07
ZANJAS DE OXIDACIÓN	24	1.18	2 872.9	2.38	2 364.7	2.68
TOTAL NACIONAL	2029	100	120 861	100	88 127.1	100

En el caso de la industria alimenticia, de acuerdo al Instituto Mexicano de Tecnología del agua (IMTA, 2010), en México se requieren anualmente un aproximado de 435 millones de metros cúbicos de agua para su operación, su uso, implica la utilización del agua en procesos de lavado de materia prima, generación de vapor para pre-cocción y cocción, lavado y llenado de envases, enfriamiento y lavado de equipos y materiales, lo que hace aumentar el interés en el reciclado del agua residual.

Para distinguir las características del agua residual provenientes del sector alimenticio, el procesamiento de alimentos es dividido en secciones: a) Cárnico (carnes, aves y productos del mar), b) Frutas, vegetales y cereales, c) Lácteos y d) Bebidas.

Los principales consumidores de agua son la industria de lácteos con un 33 %, las conservas alimenticias en un 29 %, panadería con un 18 %, molienda de cereales con 11 %, un 3 % para aceites y grasas comestibles, un 1 % para cárnicos y un 1 % para confitería y chocolate. Esta diferencia se observa claramente en la cantidad de agua consumida por unidad de producto reportada en Tabla 1.2.

Tabla 1.2. Contenido de agua virtual por unidad de producto (Hoekstra y Chapagain, 2007).

Producto	**Agua utilizada (L)**
Cerveza (250 mL)	75
Leche (200 mL)	200
Café (125 mL)	140
Té (250 mL).	35
Pan (30 g)	40
Pan (30 g) con queso (10 g)	90
Jugo de manzana (200 mL)	190
Jugo de naranja (200 mL)	170

En la Tabla 1.3, se muestran las cantidades de agua de consumo, la de descarga y la de reuso, la cual difiere de acuerdo al tipo de industria.

Según el sector que se trate, el consumo de agua es variado y también la cantidad y tipo de contaminantes que se encuentran en los efluentes, particularmente, se caracterizan por presentar alta conductividad, pH encima del neutro, alta DQO, DBO, sólidos suspendidos totales, grasas, aceites y algunas veces coloración.

Tabla 1.3. Abastecimiento y descarga de agua de acuerdo al tipo de industria alimenticia (IMTA, 2010).

Tipo de industria alimenticia	**Abastecimiento (m^3/día)**	**Recirculación reúso (m^3/día)**	**Demanda (m^3/día)**	**Consumo (m^3/día)**	**Descarga (m^3/día)**
Productos cárnicos.	87	25	113	6	81
Productos lácteos.	776	621	1,397	57	718
Conservas alimenticias.	3,233	2,265	6,498	372	2,861
Molienda de cereales.	439	373	812	29	410
Beneficio del café.	808	687	1,495	53	755
Panadería industrial.	215	328	543	72	143
Aceites y grasas comestibles.	546	1,108	1,654	83	463
Confitería y chocolate.	278	308	586	57	220

En la Tabla 1.4, se muestra la cantidad de agua residual de ciertas industrias de alimentos, así como su valor de DQO y DBO (Muro *et al.,* 2012)

Tabla 1.4. Volumen y carga contaminante de los efluentes de diferentes etapas de proceso de algunas industrias alimenticias (Muro *et al.,* 2012).

Proceso alimenticio	**Agua residual (m^3ton^{-1}) del producto**	**DQO ($mgO_2.L^{-1}$)**	**DBO_5 ($mgO_2.L^{-1}$)**
Cárnico			
- Cámaras calientes	0.3	1,800	1,400
-Baños de agua fría	1.7	150	140
- Tanques de congelación	0.7	550	500
Jugos de fruta			
-Naranja	5.0	11,200	8,100
-Manzana	1.2	2,000	1,400
-Lavado de tomate		1,200	
-Jugo de fruta (general)		2,500-7,000	
Vegetales y cereales			
-Todo tipo de vegetales congeladas y/o empacados y cereales procesados	30	5,000	4,500
-molido de olivo		100,000-200,000	
Almidón de papa			
-Lavado	0.7	3,000	2,500
-Enjuague de almidón	1.5	7,800	6,500
Producción de cerveza	4.2	2,500	1,800
Planta de Alcohol		900-1,200	
Industria del pescado			
-Descarga de pescado		5,000-7,000	
-Salmuera		4,000-14,000	
-Pescado cocinado		4,000-20,000	
Industria Láctea			
-Suero	90	65,000	42,000
-Agua residual de final de línea de proceso	1.5	1,800	860
-Agua de condensados		100-570	
-Agua de enjuague de botellas		50-1,000	
-Agua de soluciones caustica		8,000-10,000	

En la industria alimenticia se han reportado valores generados en plantas Hindúes productoras de café de 22,000 mg/L de DQO (Devi *et al.,* 2007), en la industria del

proceso de manzanas y papas se registran valores de 9,000 y 21,000 mg/L de DQO respectivamente (Van Ginkel *et al.,* 2005), la industria alimenticia en Shangai reportada por He *et al.* (2005) marca valores de DQO entre 2,000 y 15,000 mg/L, para la industria azucarera Turca los efluentes del proceso se reportan superiores a 10,000 mg/L de DQO (Güven *et al.,* 2009), la molienda de arroz en India genera de 2200 a 2500 mg/L de DQO (Behera *et al.,* 2010); mientras para la industria cervecera en Harbin China se encuentran de 1832 a 2668 mg/L de DQO (Feng *et al.,* 2008) y recientemente en una recopilación se considera que el producto cervecero genera de 2,000 a 6,000 mg/L de DQO en sus aguas residuales (Simate *et al.,* 2011).

1.1.1 Agua residual de la Industria Cervecera

La industria cervecera corresponde al sector de la industria de bebidas. En México abarca una demarcada importancia en la industria alimenticia, ocupando un importante lugar a nivel mundial. De acuerdo al INEGI (2012), en su estudio del sector alimentario en México 2012, el gasto en consumo de bebidas es del 9.4 %. Las cifras del reporte anual 2013 de la cervecera número 1 del mundo AB-InBev, el año pasado se produjeron 446 millones de hectolitros de cerveza, de los cuales Grupo Modelo de México produjó el 14.5 % con 6,667 millones de litros.

De acuerdo a la Tabla 1.4, el proceso de elaboración de cerveza genera aproximadamente 4.2 m^3 de agua residual por tonelada de producto, el valor de DQO se encuentra entre los rangos marcados por Feng *et al.,* (2008) y Simate *et al.,* (2011) y es considerable, así como la carga orgánica que contiene.

La calidad de estos efluentes varía pero generalmente contiene residuos de fibra de cereales y almidones, debido a los aportes de los granos. La cebada mexicana cultivada en los estados de Hidalgo y Tlaxcala llega a tener hasta 12.4 % de humedad, 2.2 % de cenizas, 3 % de grasas, 12.2 % de proteínas, 8.2 % de fibra y un

81 % de hidratos de carbono, estos últimos indispensables y deseables para la industria cervecera, donde a mayor cantidad de hidratos de carbono, mayor cantidad de almidón, que por hidrólisis genera mayor cantidad de maltosa (López *et al.,* 2007).

Los efluentes residuales provienen de las etapas que se siguen en la elaboración del producto (He *et al.,* 2005), sin embargo destacan aquellos que provienen de la etapa de remojo de grano, filtrados, del lavado de botellas y maquinaria, del pasteurizado y finalmente de la utilizada en las diferentes operaciones del proceso.

El proceso de elaboración de la cerveza inicia con la llegada del grano y su limpiado de basuras y cascarillas, pasa a cribado para selección del mejor grano y terminar la limpieza. Posteriormente inicia la etapa de remojo que genera un aumento de humedad en el grano entre un 14 y 40 %, desarrollando la actividad enzimática, esta etapa requiere de 18 horas.

La etapa de germinación utiliza cinco días a temperatura entre 18 y 20 ºC y humedad relativa de 95 a 98 %. El grano pasa un día en secado paulatino de 50 a 80 ºC, se reposa por dos horas y se eliminan las raíces del germinado, por último la malta reposa de 4 a 6 semanas, que se considera el proceso de maduración (Hernández y Hernández, 1996). La malta es triturada y macerada con los adjuntos y al agua, para transformar los almidones en azúcares; obteniendo el mosto rico en azúcares, proteínas, vitaminas y minerales.

El mosto es filtrado e inicia el proceso de ebullición a base de vapor y se adiciona el lúpulo; en esta etapa también se separan las proteínas coaguladas. El mosto se enfría, la levadura se inyecta y se lleva a los tanques de fermentación donde los azucares, aminoácidos y minerales son convertidos en alcohol y CO_2. La levadura es separada y la cerveza se madura a temperaturas cercanas a los 0 ºC. Finalmente la cerveza es filtrada, envasada y pasteurizada (Grupo Modelo, 2014).

En la Figura 1.1, se muestra el remojo del grano que tiene lugar y donde se observa el gran volumen de agua utilizado. En la Figura 1.2, se muestra un esquema general del proceso que conlleva la elaboración de la cerveza.

Figura 1.1. Proceso de remojo de grano (izquierda Maltería Tibito Bavaria, derecha Grupo Modelo).

Figura 1.2. Proceso de elaboración de la cerveza (Grupo Modelo, 2014).

Considerando las etapas del proceso, el agua residual puede contener grandes residuos de materia orgánica de semilla y cascarilla de cebada, así como agregados de arroz y/o trigo, en sólidos suspendidos y disueltos, ambos generan una carga orgánica elevada de posible biodegradación. También es necesario considerar las etapas de lavado de botellas y pasteurización, que integran parte de esta.
El agua residual la constituye del 65 al 80 % del agua utilizada en el proceso de la elaboración de cerveza.

Bajo estas características, la mayoría de las empresas cerveceras tienden a instalar plantas de tratamiento convencionales, cuyo proceso consiste en un pretratamiento, en la sedimentación, el tratamiento en reactores aerobios y anaerobios y la cloración; considerado este proceso como un tratamiento multietapas (Yabroudi *et al*., 2009) para obtener agua que puede ser vertida al drenaje.

1.2 Procesos de tratamiento de efluentes provenientes del sector alimenticio

En plantas procesadoras de alimentos se encuentran dos vertientes en el uso y consumo de agua: 1) reducción de agua en las operaciones de proceso y 2) tratamientos de los efluentes contaminados. Los primeros están enfocados a un uso más racional del agua para los procesos involucrados en limpieza, cocción, enfriamiento, etc; a través de transporte neumático, operaciones controladas con sensores por modelado de optimización del agua, cocción y procesado sin agua o la mínima requerida. El área de tratamientos también se orienta a partir del uso de procesos como retención/redirección (reuso), separación/concentración, centrifugación, evaporación, filtración, flotación y sistemas de membranas, para continuar con tratamientos fisicoquímicos y biotratamientos que ayuden a disminuir las partículas contaminantes en el efluente, de tal suerte, que los efluentes deben

contener un mínimo de contaminantes para que a través de métodos convencionales se alcance una mayor depuración con posibilidades de vertido o reuso.

Simate *et al.* (2011), enmarca que las operaciones y procesos unitarios para el tratamiento de aguas residuales a ser utilizados en un efluente alimenticio, dependen de las características de este, así como de su objetivo final, en el reuso o su descarga al alcantarillado. En la Tabla 1.5 se presentan las operaciones unitarias que forman parte de los procesos de tratamiento, están divididos en físicos, químicos y biológicos. Pueden formar parte de un pretratamiento como es el caso de la filtración, pueden combinarse para un tratamiento multietapas como en una planta convencional o bien ser utilizados como tratamientos terciarios como es el caso de la coagulación o cloración.

Por su parte los biológicos anaerobios-aerobios, son aplicables cuando el objetivo es reducir la DBO mediante la degradación de los componentes orgánicos presentes y la reducción de las concentraciones de contaminantes no específicos (Levin y Gealt, 1997). Estos procesos están basados en la actividad de los diferentes microorganismos encargados de la biodegradación de los contaminantes orgánicos, con porcentajes de eficiencia que van del 80 al 90 % (Simate *et al.,* 2011). Sin embargo, debido a la complejidad de los procesos para elaborar los productos y al uso de sustancias sintéticas como materia prima; estos tratamientos de depuración son cada vez menos eficientes, por lo que es necesario introducir tratamientos terciarios o específicos que ayudan a mejorar la calidad del agua tratada y plantear su reuso (Muro *et al.,* 2009).

En la literatura se encuentran diferentes procesos de este nivel, los cuales se encaminan generalmente a eliminar contaminantes específicos recalcitrantes o depurar el agua a un grado que pueda darse su reuso. Entre los más utilizados se encuentran el filtrado con membranas, biorreactores con membranas, el uso de

nanotecnología como nanosorbentes y nanofiltros, ozonización y métodos electroquímicos.

Tabla 1.5. Operaciones y procesos unitarios de tratamiento de aguas residuales. (Simate *et al.,* 2011).

Operaciones y procesos unitarios	
Físico	Filtración
	Triturado
	Sedimentación
	Flotación
Químico	Precipitación
	Adsorción
	Desinfección
	Cloración
	Otros
Biológico	Lodos activados
	Lagunas aireadas
	Contactores biológicos
	Tanques de estabilización
	Digestión anaerobia

El filtrado con membranas es de los procesos más utilizados a nivel industrial para obtener agua con características útiles para su reuso (Muro *et al.,* 2009), lo cuales se pueden utilizar para eliminar microorganismos hasta eliminar impurezas que generalmente se encuentran disueltas y son de pequeño peso molecular (Chmiel *et al.,* 2002), obteniendo agua que puede ser utilizada en el mismo proceso. Actualmente la nanotecnología se encuentra desarrollando nanomateriales con zeolita, plata, carbón y TiO_2 entre otros, para mejorar las membranas y su proceso de filtración para remoción de metales y contaminantes orgánicos (Qu *et al.,* 2013).

El tratamiento de ozonización también es un proceso terciario que ha sido utilizado en los países Europeos por largo tiempo para tratar efluentes del sector alimenticio en varias aplicaciones como higiene y sanitización de equipo. Este tratamiento se utiliza específicamente para la eliminación de sabor y olor, reducción de DQO y DBO (Guzel-Seydim *et al.,* 2004).

Recientemente los tratamientos basados en la electrocoagulación, electroflotación y electrooxidación, se han probado con efectividad en la remoción de diferentes sustancias con partículas coloidales, aceites, grasas y contaminantes orgánicos, a través de electrodos de aluminio, acero o híbridos Al/Fe (Chen, 2004). En Tejocote-Pérez *et al.* (2010) el estudio fue dirigido al uso de la electrocoagulación en aguas recolectadas de 144 industrias. En este caso, el agua residual presentó alta turbiedad para una DQO de 2100 mg/L, los cuales tuvieron una reducción significativa después del tratamiento; en porcentajes de 92 y 80 % para turbiedad y DQO respectivamente. Los procesos de coagulación también han sido reportados para este propósito, reduciendo considerablemente la turbidez (Pérez Sicarios *et al*., 2011).

Otro de los sistemas de tratamiento terciario son los biológicos, llamados de biorremediación. El proceso consiste en la degradación de contaminantes mediante el uso de microorganismos en consorcio o individuales, entre los que destacan los hongos, ya que se alimentan de materia muerta (saprofitos) y utilizan compuestos orgánicos como fuente de carbono (heterótrofos) y son absortivos, es decir, que toman los nutrientes del medio en que viven, manteniendo ciclos de materia importantes (Ingraham *et al.,* 1998). Para aplicar este tipo de tratamientos se utilizan biorreactores que operan en forma aerobia o anaerobia, dependiendo del microorganismo. Entre los reactores aerobios se encuentran los de agitación mecánica, magnética y los de aire ascendente (airlift) (Levin y Gealt, 1997).

1.2.1 Biorremediación

En la biorremediación o micorremediación, se utilizan diferentes tipos de microorganismos para llevar a cabo la remoción o degradación de contaminantes. De los más utilizados se encuentran las bacterias encargadas en su mayoría en degradar la materia orgánica durante un tratamiento secundario, y los hongos que se utilizan generalmente en tratamientos terciarios para degradar contaminantes específicos que no fueron degradados durante el tratamiento secundario.
Entre las áreas del biotratamiento donde es utilizado el reino fungi se encuentran:

- Las aguas residuales domésticas por sus contenidos de carbón y nutrientes, removiendo entre otros, fosfatos, amonio, nitrógeno total y DQO.
- Efluentes de la agroindustria por sus contenidos de DQO, fenol y sus derivados, proteínas, compuestos de lignina y colorantes.
- Efluentes con color, provenientes de las industrias farmacéuticas, de pinturas, de fotografía, textiles y cosméticos.
- Efluentes con metales, de la industria minera y metalúrgica principalmente.

Los hongos sobreviven y se desarrollan en casi todos los ambientes, acuáticos o terrestres, no poseen hojas tallos o raíces, abundan en el suelo, en la vegetación y en el agua; normalmente viven en hojas y madera, toleran grados elevados de acidez, elevadas concentraciones de sales, azucares y otros nutrientes y soportan diferentes niveles de temperatura.

Los hongos son organismos absorbentes, eucariotas y heterótrofos que tienen forma multicelular filamentosa, estructura vegetativa llamada micelio y se reproducen a través de la esporulación (Harms *et al.,* 2011).

Actualmente estos microorganismos han cobrado una gran importancia como generadores de enzimas para diferentes mercados como el alimenticio, farmacéutico, de investigación y en la biorremediación (Ghorai *et al.,* 2009).

Los hongos degradadores pertenecen a los llamados hongos superiores *Ascomicetos* y *Basidiomicetos* principalmente (Harms *et al.,* 2011), de estos últimos existen 3 tipos capaces de degradar la estructura rígida de la materia orgánica formada por lignina: los pardos, los blancos y los suaves (Seshikala y Charya, 2012).

Los hongos de pudrición suave son responsables de la degradación de carbohidratos de la madera y modifican muy poco la lignina. Referido a los hongos de pudrición parda, estos trabajan sobre las estructuras de celulosa, hemicelulosa y parcialmente en la lignina. Particularmente, los hongos de podredumbre blanca son los degradadores primarios de materiales orgánicos, tales como tejidos, papel, cuero, pintura entre otros (Tuor *et al.,* 1995; Seshikala y Charya, 2012). Su gran potencial para degradar moléculas complejas, los ha llevado a su aplicación en diferentes sistemas contaminados.

1.3 Hongos de podredumbre blanca

Los hongos de la podredumbre blanca (HPB) se desarrollan principalmente en los bosques de pino y encino. Están compuestos por hifas, las cuales se pueden extender a grandes distancias, abarcando amplias áreas en la corteza de los árboles. La mayoría de los HPB conocidos, son mesófilos, ya que se desarrollan a temperatura entre 10-35°C, sin embargo su temperatura óptima se encuentra entre 20- 30º C. Los hongos que crecen a temperaturas superiores a 50°C son llamados termófilos y la máxima que alcanzan es de 65°C.

Los HPB son basidiomicetos, capaces de fragmentar y metabolizar los polímeros estructurales de la lignina. La mineralización del polímero aromático más abundante y conocido como recalcitrante se efectúa a través de un grupo de enzimas peroxidasas y feniloxidasas; que producen radicales altamente reactivos que oxidan componentes fenólicos y no fenólicos (Seshikala y Charya, 2012).

Debido a su batería enzimática para degradar lignina, los HPB son los principales actores en la biorremediación, por lo que son llamados también hongos ligninolíticos. Entre esta clase de hongos destacan las especies *Pleurotus ostreatus, Lentinus hirtus, Bjerkandera adusta, Trametes versicolor, P. tigrinus y Phanerochaete chrysosporium* (Coulibaly *et al.,* 2003; Rodríguez y Sanromán, 2004; García Torres y Torres Sáe, 2003; Quintero *et al.,* 2006).

La capacidad de degradación de la lignina por los HPB, ha sido utilizada en diferentes procesos de remediación de contaminantes, tal es el caso de su aplicación en el tratamiento de aguas residuales de la industria del papel y pulpa, alimentos para ganado e industrias del ramo textil; además la biomasa fúngica, ha demostrado ser un excelente material sorbente ya que posee un bajo costo, abundante suministro, alta velocidad y capacidad de sorción, así como efectiva aplicación a efluentes con una gran variedad de colorantes y la habilidad de tolerar la presencia de co-contaminantes como las sales, metales pesados, entre otros (Martín Moreno *et al.,* 2004; Patel y Suresh, 2008; Xiong *et al.,* 2010).

1.3.1 Enzimas ligninolíticas de los hongos de podredumbre blanca

La lignina es una cadena de compuestos fenólicos (Badui, 2006), es considerada un biopolímero hidrofóbico de varias unidades de fenil-propanol enlazados entre sí para formar la macromolécula carente de forma definida e insoluble (Gil *et al.,* 2012), por lo que constituye una de las estructuras más complejas. Contiene por lo menos 12

enlaces químicos aril-éter y carbono-carbono conectando al núcleo, donde radica lo difícil de su degradación (Magan *et al.,* 2010).

La degradación selectiva que poseen los HPB, les permite tener acceso a la celulosa hemicelulosa y lignina que son su fuente de carbono y energía (Dávila y Vázquez-Duhalt, 2006). En la Tabla 1.6 se aprecian algunos HPB capaces de secretar enzimas ligninolíticas.

Tabla 1.6. Hongos productores de enzimas ligninolíticas (Dávila y Vázquez-Duhalt, 2006).

Organismo	Enzimas ligninolíticas
Phanerochaete chrysosporium	MnP, LiP, Lacasa
Trametes versicolor	MnP, Lacasa
Ceriporiopsis subvermispora	MnP, Lacasa
Cyanthus stercoreus	MnP, Lacasa
Phlebia radiate	MnP, LiP, Lacasa
Nematoloma frowardii	MnP, LiP, Lacasa
Pleurotus eryngii, Pleurotus ostreatus, Pleurotus pulmonaris	MnP, VP (MnP versátil), Lacasa
Bjerkandera sp.	VP
Bjerkandera adjusta	VP

La degradación de la lignina por HPB se inicia por reacciones de despolimerización (extracelular) y por la metabolización de fragmentos liberados del polímero (intracelular), por lo tanto, la degradación de la lignina es considerada como una deslignificación selectiva o bien como deslignificación simultánea (Magan *et al.,* 2010).

La despolimerización de lignina es catalizada por enzimas extracelulares entre las que destacan la lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y Lacasa; estas enzimas intervienen principalmente en las reacciones de deslignificación y varían dependiendo de la especie que las genera (Susla *et al.,* 2008).

En general, los HPB realizan la síntesis de la LiP y la MnP bajo condiciones oxidantes. Estas enzimas son producidas en presencia de un sustrato adecuado y un cofactor, llevándose a cabo reacciones de oxidación. En la Tabla 1.7, se presentan la relación de la enzima con el cofactor, sustrato y la reacción de oxidación.

Tabla 1.7. Enzimas ligninolíticas y sus reacciones (Rodríguez, 2009).

Enzima	Cofactor	Sustrato, mediador	Reacción
LiP	H_2O_2	Alcohol veratrílico	Oxidación del radical aromático a radical catiónico
MnP	H_2O_2	Mn, ácidos orgánicos como quelantes, tioles, ácidos grasos insaturados	Mn^{2+} oxidado a Mn^{3+}, Mn^{3+} quelado oxida compuestos fenólicos a radicales fenólicos y otras reacciones en presencia de compuestos adicionales
VP	H_2O_2	Mn, alcohol veratrílico, compuestos similares a los de la LiP y MnP	Mn^{2+} oxidado a Mn^{+3}, oxidación de compuestos fenólicos y no fenólicos y colorantes
Lacasa	O_2	Fenoles, mediadores como hidroxibenzotriazol y ABTS	Los fenoles son oxidados a radicales fenólicos, otras reacciones en presencia de mediadores
Glioxal oxidasa, GLOX	No especificado	Glioxal, metil glioxal	Glioxal se oxida a ácido glioxalico con la producción de H_2O_2
Aril alcohol oxidasa, AAO	No especificado	Alcoholes aromáticos (anisil, alcohol veratrílico)	Alcoholes aromáticos oxidados a aldehídos, producción de H_2O_2

La LiP y MnP son dependientes de la fuente de nutrientes, principalmente el carbono y nitrógeno (Harms *et al.,* 2011).

La LiP cataliza la oxidación de compuestos fenólicos y no fenólicos, mientras la MnP es una enzima hemoperoxidasas que cataliza la oxidación de Mn^{2+} y Mn^{3+} presentes. Este binomio puede actuar en conjunto dependiendo del microorganismo secretador.

Debido a la semejanza de estructuras químicas muy parecidas a la lignina tales como aromáticos, nitroaromáticos, aromáticos policíclicos, herbicidas, pesticidas, detergentes clorofenoles y colorantes, estas también son atacadas y degradadas por estas especies fúngicas HPB (Gold y Alic, 1993).

1.3.2 *Phanerochaete chrysosporium*

Uno de los hongos más estudiado es el *Phanerochaete chrysosporium;* es considerado un hongo modelo de los HPB. Se le puede encontrar en la corteza de los árboles formando grandes masas blancas. Su alto potencial de degradación de lignina por mecanismos de oxidación y la descomposición de contaminantes en dióxido de carbono, lo han hecho merecedor de varios estudios de biodegradación.

En la Figura 1.3, se muestra una imagen de hongo *Phanerochaete chrysosporium*, desarrollado sobre la corteza de un árbol, donde se puede distinguir su expansión y forma de cobertura.

Morfológicamente el *P. chrysosporium* puede reconocerse a través de sus hifas, las cuales le permiten expandir su área de desarrollo, haciendo más fácil el contacto con el sustrato. En la Figura 1.4, se muestra una imagen al microscopio de las hifas características de este hongo.

Figura 1.3. *Phanerochaete chrysosporium* (Universidad de Wisconsin, 2014)

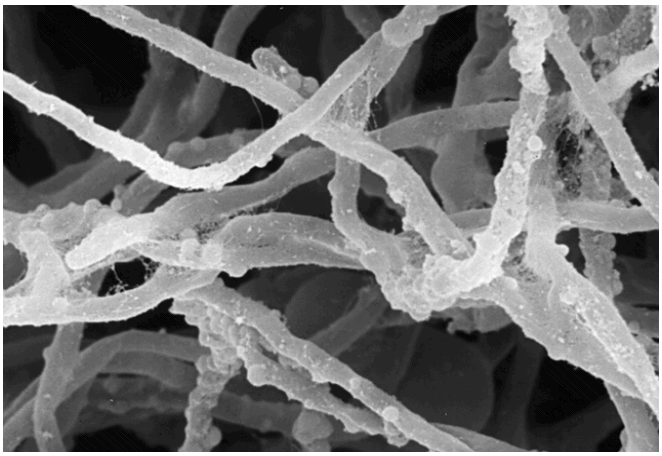


Figura 1.4. Hifas al microscopio del *P. chrysosporium* (Ingraham, 1998).

El *P. chrysosporium* es capaz de degradar la mayor cantidad de polímeros de la madera: celulosa, hemicelulosa y lignina, esta última es degradada solo durante la segunda etapa de su metabolismo (idiofase), donde las condiciones que lo provocan son cultivos bajos de nitrógeno, carbono o sulfuros (Gold y Alic, 1993), es decir bajo una limitación de nutrientes (Orth *et al.,* 1991; Jiménez-Tobon *et al.,* 1997).

El género *Phanerochaete* es muy amplio, su clasificación ha sido establecida de acuerdo a la Tabla 1.8.

Tabla 1.8. Clasificación del *P. chrysosporium.*

División	*Basidiometos*
Clase	*Agaricomicetos*
Orden	*Poliporales*
Familia	*Phanerochaetaceae*
Género	*Phanerochaete*

Las características degradadoras del *P. chrysosporium* han sido atractivas para el estudio y aplicación en biotratamientos de aguas residuales con diversos contaminantes, tales como; metales, colorantes, nutrientes inorgánicos y componentes orgánicos (Coulibaly *et al.,* 2003; Dávila y Vázquez-Duhalt, 2006).

Trabajos desarrollados para la biosorción de Hg y Cd (Kaçar *et al.,* 2001), degradación de clorofenol (Zouari *et al.,* 2002), biodegradación de colorantes grupo Azo (Ollikka *et al.,* 1993) y biodegradación de petróleo crudo en agua salina (Behnood *et al.,* 2013), también se encuentran reportados.

Otro aspecto a resaltar, es el incremento de la producción de enzimas ligninolíticas utilizando un soporte o fijador del hongo e incluso mediante la inmovilización del micelio por atrapamiento.

1.4 Inmovilización de microorganismos

A la utilización de microorganismos para degradar sustancias orgánicas e inorgánicas en los procesos de biorremediación, se suma la aplicación de técnicas que mejoran las capacidades fúngicas; la inmovilización microbiana (Garzón-Jiménez y Barragán-Huerta, 2008). Actualmente la inmovilización celular puede ser definida como la ubicación física de células en un espacio o región especifica, de forma

natural o inducida, en la cual son capaces de mantener una actividad catalítica deseada.

Las células inmovilizadas tienen ciertas ventajas en comparación con las libres, entre las que destacan (Garzón-Jiménez y Barragán-Huerta, 2008):

- Operación de biorreactores a velocidades de flujo independientes del crecimiento.
- Estabilidad catalítica mayor.
- Concentración de biomasa.
- Actividad metabólica.
- Resistencia a la toxicidad.

Sin embargo es necesario considerar ciertas características para una adecuada inmovilización, tipo de soporte, porosidad, estabilidad química, biológica, mecánica y térmica; así como el tipo de microorganismo a inmovilizar (Garzón-Jiménez y Barragán Huerta, 2008) y posible reuso (Arroyo, 1998).

La inmovilización puede clasificarse por el tipo de método a utilizar como lo muestra la Tabla 1.9.

También de manera importante, de acuerdo a la forma que se induce la inmovilización esta de clasifica en: pasiva y activa (De Bashan y Bashan, 2010; Garzón-Jiménez y Barragán-Huerta 2008).

La inmovilización pasiva se da de forma natural por microorganismos cuando se adhieren o unen a alguna superficie y crecen sobre éstas.

La inmovilización activa se da de manera artificial o manipulada químicamente, con geles polímeros (naturales o sintéticos) y agentes floculantes.

El metabolismo de las células inmovilizadas suele ser mayor que en células libres.

Tabla1.9. Clasificación de métodos y técnicas de inmovilización (Fajardo-Ochoa *et al.,* 2011).

Método	Técnica
Irreversible	Enlace covalente Enlace cruzado Atrapamiento o encapsulado Microencapsulado
Reversible	Por adsorción (no especifica, hidrofóbica) Quelación o enlace metálico Formación de enlaces disulfuro

1.4.1 Inmovilización pasiva

La inmovilización pasiva se puede presentar de manera natural en un soporte, el cual es un material natural o sintético capaz de retener o fijar un microorganismo.
En este sentido los HPB utilizan de manera natural a la madera como su soporte primario y residuos ligninolíticos y celulosos de forma secundaria. Debido a la estabilidad que un soporte provee al microorganismo, teóricamente, éste aumenta su capacidad de producción de enzimas. Sin embargo entran en juego varios factores para conseguirlo.

La Tabla 1.10, muestra algunos de los residuos reportados que han servido de soporte para el *P. chrysosporium* en la producción de enzimas.
Entre las investigaciones que han estudiado el uso de soportes se encuentra el de Shim y Kawamoto (2002). En este caso se obtuvo una degradación del 80 % de pentaclorofenol con la inmovilización del *P. chrysosporium* en materiales como madera, polipropileno, poliuretano, cerámica y vinilclorido, empacando un biorreactor en modo lote.

Tabla 1.10. Producción de enzimas ligninolíticas en algunos compuestos comúnmente utilizados como soporte para el *Phanerochaete chrysosporium* (Rodríguez y Sanromán, 2004).

Residuo (soporte)	Enzima producida
Bagazo de caña	Lacasa, MnP, LiP
Algodón	Lacasa, Peroxidasa, Celulasa
Uva	Ligninasa
Salvado de trigo	Lacasa, MnP, LiP
Cascarilla de trigo	MnP, LiP
Madera	Lacasa, MnP, LiP

Existen materiales sintéticos que también brindan un modo de soporte a la biorremediación. Guimarães *et al.* (2003) utilizaron espuma de poliuretano y fibra de limpieza como soportes sintéticos de inmovilización para el *P. chrysosporium*, obteniendo reducción de color, fenoles y DQO de un efluente azucarero con porcentajes de 55, 63 y 48 respectivamente.

En otro trabajo de Morales y Ruíz (2008), se menciona que hongos de podredumbre blanca (HPB) inmovilizados en mallas poliméricas fueron utilizados para la remoción de metales pesados Cd, Pb y Ni en aguas residuales.

Recientemente Sharari *et al.* (2013), utilizaron espuma de poliuretano para soportar el *P. chrysosporium* y evaluar su capacidad de remoción de DQO y color en una preparación de gabazo, logrando una degradación de 97 y 83 % respectivamente.

1.4.2. Inmovilización activa

La inmovilización del tipo encapsulado corresponde a una inmovilización activa, la cual puede ser considerada como una forma especial de empacar o cubrir al microorganismo, brindándole protección contra factores como calor, humedad,

toxicidad y temperatura; propios del ambiente o de influencias externas (Rathore *et al.,* 2013).

La técnica de atrapamiento o encapsulado utiliza materiales entre los que destacan los polímeros, estos son macromoléculas formadas por monómeros. Los polímeros se clasifican en naturales, semisintéticos y sintéticos (Gentry *et al.,* 2004). Algunos de ellos son el agar, gel de poliacramida, alginato de calcio, carragenina, quitosano y alcohol polivinílico (Martínez-Trujillo y García–Rivero, 2012).

Los polímeros se pueden utilizar en forma individual o formando compositos e hidrogeles. En ambos casos, la función de las redes poliméricas es atrapar al microorganismo. Actualmente el de este tipo de materiales ha destacado en la inmovilización de enzimas (Kulkarni y Vijayan, 2011).

En relación a los compositos, el alginato ha sido mezclado con materiales magnéticos para atraer compuestos metálicos presentes en el agua. Tapia *et al.* (2009) utilizarón un composito esférico de esta naturaleza para la remoción de cobre mediante adsorción del metal en el composito, obteniéndose una capacidad máxima de adsorción de 57.47 g de Cu (II) por cada gramo de esferas.

La Tabla 1.11, muestra la función de algunos polímeros naturales (carragenano y alginato) y sintéticos polivinil alcohol (PVA), policarbomil sulfato (PCS) y polietilen glicol (PEG), utilizados para la inmovilización de microorganismos de acuerdo a las características del polímero.

Para el caso de HPB la elección del material adecuado debe proporcionar las condiciones apropiadas para la supervivencia del organismo y su funcionamiento como inóculo, se requiere que no sea tóxico, ni contaminante, que tenga una calidad constante y a través de la porosidad se permita una liberación precisa de las enzimas que secretan los microorganismos (Gentry *et al.,* 2004).

Tabla1.11. Comparación entre polímeros naturales y sintéticos usados en la inmovilización y aplicado a aguas residuales (Garzón-Jiménez y Barragán-Huerta, 2008).

Características	**Polímeros naturales**		**Polímeros sintéticos**		
	Carragenano	**Ca-alginato**	**PVA**	**PCS**	**PEG**
Solubilidad	Alto	Alto	Bajo/nulo	Bajo/nulo	Bajo/nulo
Biodegradabilidad	Posible	Posible	Bajo	Bajo	Bajo
Estabilidad	Bajo	Bajo	Alto	Alto	Medio
Difusibilidad	Muy bueno	Muy bueno	Bueno	Moderado	----
Crecimiento	Bueno	Bueno	Moderado	Moderado	Bueno
Proceso de inmovilización	Simple	Simple	Laborioso	Laborioso	Laborioso

El alginato es uno de los materiales más utilizados, por su capacidad de actuar como agentes estabilizantes, gelificantes, esperadores y formadores de películas. El alginato se obtiene de las algas marinas, siendo el polisacárido más abundante de estas hasta en un 40 %, está constituido por cantidades variables de acido b-D-manurónico y acido a-L-gulurónico, lo que permite al alginato formar geles de fuerza y porosidad alta o bien de fuerza media y poros pequeños (Avendaño-Romero *et al.,* 2013; Martínez-Trujillo y García-Rivero, 2012).

Cuando el alginato de sodio es expuesto a iones calcio se forma una red de entrecruzamiento, que permite la inmovilización de células. La inmovilización de microorganismos en alginato de calcio es el método más usado, debido a que en su preparación no se requieren condiciones de reacción extremas, es de bajo costo y de baja toxicidad, sin embargo, presenta incompatibilidad con ciertos iones y es susceptible a la biodegradación (De-Bashan y Bashan, 2010).

En la Tabla 1.12, se resumen algunos resultados de trabajos realizados con *P. chrysosporium* inmovilizado en diferentes materiales. La inmovilización referida es a través del uso de un soporte o por atrapamiento.

Los resultados obtenidos en la inmovilización de *P. chrysosporium* es variado. Las eficiencias se encuentran entre un 40-90%; de acuerdo a los reportes de estos trabajos la eficiencia depende de las condiciones del tratamiento, el reactor, el material de inmovilización, la toxicidad del contaminante y la concentración en la que se encuentra presente.

En camas de gel de alginato se ha utilizado para la biosorción de Pb^{2+} y Zn^{2+} (Arıca *et al.,* 2003); biosorción de metales pesados Cd(II), Pb(II) y Cu(II) en aguas residuales (Say *et al.,* 2001) y biodegradación de colorantes azo, antraquinona, tiazina (Radha *et al.,* 2005).

Recientes estudios hechos por Gomathi *et al.* (2012), muestran la decoloración de un efluente papelero por medio de la inmovilización del *P. chrysosporium* en alginato dando un resultado aceptable del 83 % de decoloración utilizando esta técnica.

Zhang *et al.* (2008), utilizaron la inmovilización del *P. chrysosporium* en esferas de alginato de calcio con adición de lignina, para la degradación de fenantreno. En estas pruebas se ensayaron tres diámetros diferentes de esfera para llevar a cabo la degradación. El resultado fue que las esferas con lignina y de tamaño más pequeño (diámetro de 3.8 $\pm$ 0.2 mm), se obtuvo un incremento del 15 % en la remoción.

El P. chrysosporium inmovilizado también ha sido estudiado en la biorremediación de suelos para degradar hidrocarburos poliaromáticos (antraceno) y bifenilos policlorados, encontrando su factibilidad de uso (Premjet *et al.*, 2009).

Tabla 1.12. Resumen de algunas aplicaciones del *Phanerochaete chrysosporium* inmovilizado.

Inmovilizado (en material)	Aplicación	Resultados	Autor
Poliuretano y polietileno	Degradación de 4-clorofenol	Degradación efectiva Resultados óptimos	Zouari *et al.,* 2002
Alginato de calcio	Biosorción de Hg(II) y Cd(II) en medio líquido	Resultados óptimos, dependientes de pH y temperatura	Kacar *et al.,* 2002
Alginato de Calcio	Biosorción de Pb^{2+} y Zn^{2+}	Adsorción de Pb^{2+} hasta 59 % y Zn^{2+} solo 8 %	Arica *et al.,* 2003
Alginato de Calcio	Biodegradación de penicilina en agua residual	Remoción de DQO en un 60 %	Mullai y Vishali, 2007
Alginato de calcio Alginato de calcio-lignina (esferas)	Degradación de fenantreno	Obtuvo 28% y 42% en la degradación de fenantreno con esferas de alginato-Ca y alginato-Ca-Lignina respectivamente.	Zhang *et al.,* 2008
Espuma de poliuretano	Tratamiento de agua residual del curtido de pieles	Remoción de: colorante 67 %, cromo total 97 % y DQO 12 %	Gómez-Bertel *et al.,* 2008
Estropajo y espuma de poliuretano	Decoloración de negro reactivo 5 en medio solido y líquido	Remoción de colorante menor de 44 %	Fernández *et al.,* 2009
Mallas de polietileno	Remoción de metales Cd, Ni y Pb con bioadsorbentes en aguas	Remoción DQO 69 %, Pb 57 %, Cd 74 % y Ni 98 %	Morales-Fonseca *et al.,* 2010
Alginato de Calcio	Decoloración del efluente de una industria papelera	Decoloración hasta un 83 %	Gomathi *et al.,* 2012
Alginato de Calcio	Degradación de colorantes de la industria textil	Decoloración hasta un 90 %	González, 2012

La inmovilización del *P. chrysosporium* en esferas de alginato también ha sido utilizada para la biocatálisis de enzimas, a manera de obtenerse elementos puros en comparación de aquellas que se obtienen cuando el hongo es utilizado en forma libre (Peart *et al.,* 2012).

Otros autores marcan el tamaño de poro de la esfera como un aspecto importante en la inmovilización; denotándolo como el responsable de la interacción entre los componentes inmovilizados y el paso de bio-macromoléculas, principalmente proteínas (Sukhorukov *et al.,* 2004; Peng *et al.,* 2010).

1.5 Biorreactores

La utilización de elementos fúngicos va ligada al uso de biorreactores, que sin duda alguna son esenciales en los tratamientos microbiológicos de aguas residuales. Un biorreactor es un recipiente, fermentador o sistema que mantiene un ambiente biológicamente activo.

En éste se lleva a cabo un proceso químico que involucra organismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas del cultivo de dichos organismos. En el caso de los procesos aerobios se tienen objetivos definidos para mantener la fermentación:

a) Mantener las células uniformemente distribuidas en todo el volumen de cultivo a fin de prevenir la sedimentación o la flotación.
b) Mantener constante y homogénea la temperatura.
c) Minimizar los gradientes de concentración de nutrientes.
d) Suministrar oxígeno a una velocidad tal que satisfaga el consumo del microorganismo.
e) El diseño debe ser tal que permita mantener el cultivo puro; una vez que todo el sistema ha sido esterilizado y posteriormente sembrado con el microorganismo deseado.

Físicamente la forma común de un biorreactor es cilíndrica y el tamaño varía desde mililitros hasta metros cúbicos y son usualmente fabricados en acero inoxidable o vidrio. Para sistemas aerobios incluyen un mecanismo o dispositivo para el suministro de aire.

Los biorreactores se dividen en 2 categorías de acuerdo a la forma en que se utiliza la biomasa del microorganismo (Levin y Gealt, 1997):

- Biorreactores con biomasa en suspensión; implica recuperación y recirculación de biomasa para un proceso autosostenible.
- Biorreactores con biomasa inmovilizada; la biomasa se inmoviliza en algún soporte y no se pierde con el efluente.

Dentro de estas clasificaciones se encuentran los biorreactores con agitación mecánica, con aireador de superficie, de biodiscos, de lecho fijo con flujo ascendente, de lecho fluidizado, con flujo de aire ascendente (airlift) y de chorro.

La utilización de biorreactores va en crecimiento, por lo que múltiples tratamientos de agua son procesados a nivel laboratorio e industrial. A nivel piloto e industrial, se ha tenido éxito con los biorreactores de membrana sumergida, donde ésta es utilizada como soporte de los microorganismos en forma de consorcio para el tratamiento de agua, generalmente de tipo municipal. Su aplicación ha dado como resultado diferentes datos dependiendo de la carga del agua residual; entre los datos representativos de este sistema se ha encontrado un tiempo de retención hidráulica de 0.5 h y una remoción de amonio del 89.4 %, sin embargo la remoción de materia orgánica ha demostrado un desempeño bajo (Tian *et al.,* 2009).

A nivel laboratorio, el *P. chrysosporium* ha sido de los más estudiados para remoción de color. En estos estudios se ha analizado el efecto del biorreactor y el uso de biomasa inmovilizada (Mielgo *et al.,* 2002). Ejemplo de estos trabajos, se pueden ver en Pakshirajan y Kheria (2012), donde se utilizó un biorreactor de contacto rotativo

para el tratamiento de aguas residuales de la industria textil, logrando una remoción de hasta el 83 % cuando el medio fue adicionado con glucosa.

En Çeribasi y Yetis (2001), se utilizó un reactor de lecho con *P. chrysosporium* y con agitación mecánica de 200 rpm, logrando una máxima biosorción de Ni(II) y Pb(II) en un periodo de 3 horas.

Cerrone *et al.* (2011), utilizaron un biorreactor de columna de aire para remover los contaminantes del agua residual de la industria del olivo, obteniendo una remoción de color, DQO y fenoles del 65, 73 y 89 % respectivamente.

En Rodarte-Morales *et al.* (2012), se encuentra reportado el uso del *P. chrysosporium* inmovilizado en espuma de poliuretano, inoculado en biorreactores de tanque agitado y de lecho fijo con el fin de eliminar de las aguas residuales de la industria farmacéutica, residuos de diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno, carbamazepina y diazepan, obteniendo mejores resultados de biodegradación en un biorreactor de lecho fijo.

1.5.1 Biorreactor airlift

En términos generales, un biorreactor busca mantener ciertas condiciones ambientales propicias (pH, temperatura, concentración de oxígeno, etc.) para el organismo que se cultiva o la sustancia química utilizada. El uso del reactor airlift se basa en el principio de agitación neumática donde la inyección de gas (aire) permite una eficiente oxigenación para el proceso o cultivo. Su utilización es bastante rentable en aplicaciones donde el costo-eficiencia es un parámetro importante y el manejo delicado de microorganismos. Sin embargo es necesario tomar en consideración que esta oxigenación depende en gran medida de las características de la bomba de aire, el flujo, presión, diámetro de tubería, distancia de inyección y el difusor de aire (Kassab *et al.,* 2009).

Un biorreactor airlift está compuesto por una jarra externa de vidrio o acero inoxidable con capacidades diferentes en litros, puede utilizar un baño recirculador con chaqueta, una malla térmica o bien sin el uso de estas para su manejo en cuartos con temperatura controlada; algunos cuentan con un tubo interno que distribuye el flujo de gas para que éste agite la muestra en forma delicada y uniforme. Tiene una tapa en acero inoxidable o material vinil acrílico con puertos en los que se colocan sensores o controladores tales como electrodos de pH, de oxígeno disuelto, burbujeador, entradas y salidas para dosificación de base y ácido, gases, antiespuma y termopozo.

En algunos casos los instrumentos de sensado y control son conectados a un controlador que permite automatizar el proceso por medio de lenguaje propio de programación.

La Figura 1.5 muestra el esquema básico de un birreactor airlift y la identificación de sus partes. El biorreactor está compuesto por: un fermentador que constituye la parte central del cuerpo del biorreactor y su objetivo principal es proveer un espacio adecuado y óptimo para el desarrollo de la biorremediación. Un dispositivo para suministro de aire, está constituido por una bomba y un regulador de flujo, cuya función es administrar la cantidad adecuada e indispensable de aire para el proceso y es evaluada a través del sensor de oxígeno. El control de pH, es otro factor influyente en el tanque, es monitoreado por un sensor de pH y regulado por dosificadores con buffer básico o ácido, manteniendo un valor constante determinado de pH. El sensor de temperatura, controlador y dispositivo de calentamiento mantienen la temperatura constante en el tanque continuamente o bien por periodos de tiempo. El último elemento es el control central, el cual puede operar por un mecanismo automático programable o de manera manual.

Un factor importante en el uso del airlift, es la velocidad del aire, que se debe controlar para mantener la homogenización del medio y proporcionar al

microorganismo la aireación adecuada. El efecto de este parámetro sobre el desarrollo del microorganismo ha sido estudiado a través de modelos matemáticos que consideran el flujo, y la velocidad de aireación (Milivojevic *et al.,* 2007; Wang *et al.,* 2011).

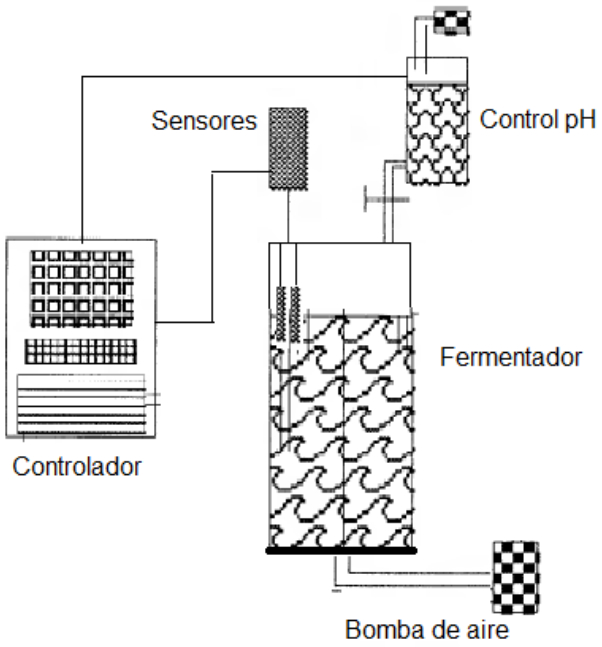


Figura 1.5. Esquema de un biorreactor airlift.

Los biorreactores airlift son utilizados en numerosas aplicaciones de la industria y del medioambiente referidas al tratamiento de aguas (Merchuk, 1990; Chisti y Moo-Young 1993). El uso de este tipo de reactores con biomasa libre de diferentes microorganismos para el tratamiento terciario de efluentes se encuentra en algunos reportes, sin embargo se han encontrado pocos trabajos acerca del tema, por lo que su aplicación aún continua en estudio; y aún más el análisis de su efecto en microorganismos inmovilizados. Ejemplos de estas investigaciones son las siguientes, Bo Jin *et al.* (2001) probó un airlift con biomasa fúngica, donde obtuvo el 95 % de disminución de la DQO. Fenice *et al.* (2003), trabajaron con *Panus tigrinus* un HPB para la producción de enzimas extracelulares Lacasa y MnP en un

biorreactor airlift, aprovechando las aguas residuales de olivo como medio, el cual fue suplementado con 0.5 % de sacarosa y extracto de levadura en 0.1 % como fuente de carbono-nitrógeno; sin embargo los resultados obtenidos fueron bajos. Fang y Zhou (2007) utilizaron *Brettanomyces* para remover Cr (III) de aguas residuales de curtidurías, observando que la materia orgánica disuelta se redujo en un 83 %, sin embargo el microorganismo se vio afectado por los componentes ácidos del influente. Sepehr *et al.* (2012), estudiaron la remoción también de Cr (III) de un efluente del mismo origen, utilizando *Aspergillus niger*, adicionando nutrientes como fosforo y nitrógeno. En este caso se logró el 86 a 96 % de remoción.

Otro estudio de degradación de acetona en un biorreactor airlift con capacidad de 39 L, utilizando 2 L de *Thiosphaera pantotropha* en estado inmovilizado en poliacrilamida, mostró el 100 % de remoción en un periodo de 5 meses (Hwang *et al.,* 2012).

En un trabajo reciente realizado por Nitayavardhana *et al.* (2013), se reportó la producción abundante de biomasa fúngica de *Rhizopus oligosporus* a partir de residuos de vinaza en el que se adicionó nitrógeno y fosforo, obteniendo la reducción del contenido orgánico en un 80 %.

Con respecto al uso de *P. chrysosporium* inmovilizado y operando en airlift, en el trabajo de González (2012) se expone la decoloración del azul de remazol (colorante utilizado en la industria textil) utilizando un medio de cultivo a base de cereal integral de trigo, encontrando que el diseño del airlift promueve la secreción de enzimas del hongo, potenciando específicamente la producción de lacasa, por lo que las eficiencias con micelio libre alcanzaron una total decoloración en pocas horas, mientras que micelio inmovilizado alcanzó el 90% en un tiempo más prolongado. Esta diferencia fue atribuida a la limitación del encapsulamiento del hongo, referente a la restricción en la transferencia de masa de los nutrientes y las enzimas.

2. MÉTODO

En el esquema de la Figura 2.1, se presentan las etapas de investigación que integran el proyecto de estudio en el tratamiento del agua residual de una industria alimenticia utilizando la biomasa inmovilizada *P. chrysosporium e*n un reactor airlift, posteriormente se describen cada una de esas etapas.

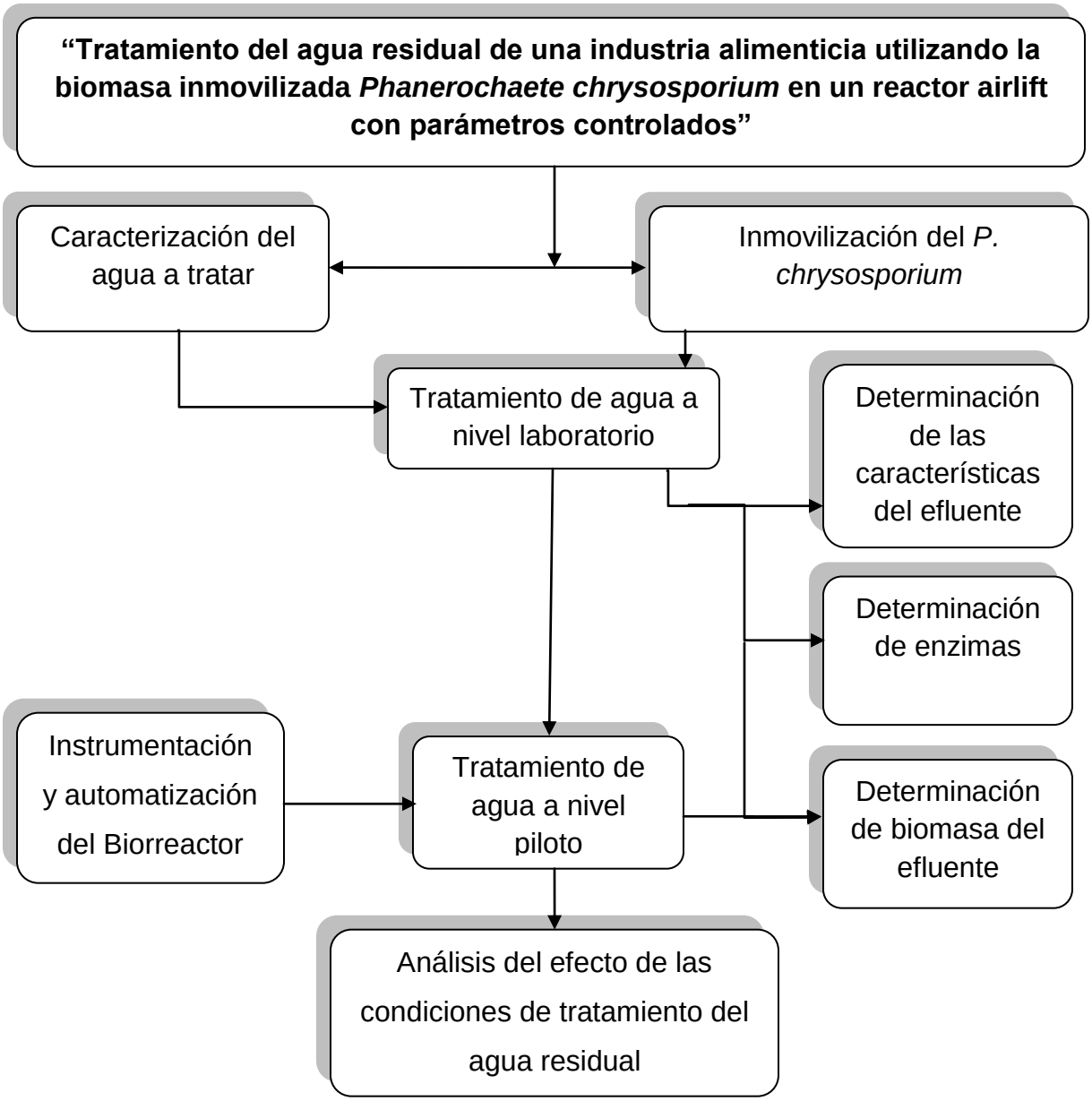


Figura 2.1. Bosquejo del método.

2.1 Caracterización del efluente

Se procesaron dos muestras de agua residual de una industria cervecera ubicada en el estado de México. Una muestra corresponde al efluente que proviene de la de la etapa del proceso posterior a la fermentación del producto para la elaboración de cerveza. La otra muestra corresponde a un volumen de agua tratada del efluente, mediante un proceso convencional en una planta tratadora de agua residual (PTAR) que consta de filtrado de sólidos grandes y pequeños, un tratamiento biológico dual (aerobio y anaerobio), una etapa de sedimentación y una etapa final de desinfección con hipoclorito de sodio. De acuerdo a información de la planta, el efluente tratado es vertido al sistema de alcantarillado municipal cumpliendo con los parámetros establecidos en la NOM-002-SEMARNAT-1996.

Los dos efluentes fueron analizados para determinar su composición y verificar que el efluente cumpliera con las necesidades nutrimentales para el desarrollo y actuación del *P. chrysosporium* seleccionando en esta etapa el tipo de efluente a utilizar durante la investigación. Los parámetros y métodos utilizados para la caracterización de las aguas se presentan a continuación.

pH. La determinación de pH se realizó de acuerdo a la NMX-AA-008-SCFI-2011, utilizando un electrodo combinado en un equipo HANNA modelo HI 9126 (Figura 2.2). Cabe señalar que antes de la determinación, el dispositivo fue calibrado para su uso.

Figura 2.2. pH-metro HANNA modelo HI 9126.

Temperatura. La temperatura del agua se determinó de acuerdo a la NMX-AA-007-SCFI-2000 utilizando un termómetro de vidrio con columna de mercurio con graduación en grados Celsius.

Turbiedad. La turbiedad se determinó de acuerdo a la NMX-AA-038-SCFI-2001 con un turbidímetro marca Cole Parmer modelo Vernon Hills, Illinois 60061 a un rango de lectura de 0-200 UNT. El equipo utilizado se muestra en la Figura 2.3.

Figura 2.3. Turbidímetro Cole Parmer.

La medición se realizó con el dispositivo encendido, previa calibración, siguiendo los siguientes pasos:

1. Se vertió la muestra en la celda de uso general hasta cubrir ¾ partes del llenado, se tapó y se colocó en el orificio de lectura; tapándola con el capuchón para evitar falsas lecturas.
2. Se verificó la estabilidad de la lectura y se registró el dato.

Conductividad. El análisis de conductividad siguió los lineamientos de la NMX-AA-093-SCFI-2000. Se utilizó un equipo Denver Instrument modelo 250, el cual se muestra en la Figura 2.4. El equipo se encendió minutos antes de las lecturas y posteriormente se realizó su calibración, para la toma adecuada de lecturas. Para la calibración se llevaron a cabo los siguientes pasos:

Figura 2.4. Conductímetro Denver-Instrument.

1. Se vertió una alícuota aproximada de 20 mL en una probeta con capacidad de 25 mL.
2. Se introdujo el electrodo verificando que el orificio sensor quede dentro de la muestra y se agitó para librar alguna posible burbuja de aire.
3. Se verificó la estabilidad de la lectura y se registró el dato.

DQO. Este análisis se determinó de acuerdo a la NMX-AA-030-SCFI-2001 y las disposiciones que marca para muestras con alta carga orgánica, debido a que una agua residual de la industria cervecera esta por arriba de los 2250 mg/L (Feng *et al*., 2008). Para la determinación se utilizaron las siguientes disoluciones:

a) Solución digestora para altas concentraciones a base de dicromato de potasio al 0.25 M y 0.025 M.
b) Solución de sulfato ferroso amoniacal hexahidratado al 0.25 M y 025 M (SAF).
c) Solución de ácido sulfúrico-sulfato de plata con una relación 5.5 Ag_2SO_4 / kg H_2SO_4.
d) Solución de la muestra control, preparada con biftalato de potasio 0.17 g/L en H_2O, equivalente a 200 mg/L de DQO.
e) Solución de indicador 1,10 fenantrolina.
f) Blanco, H_2O destilada y estéril.

El procedimiento para la determinación de la DQO, se llevó a cabo de la siguiente manera

1. Dilución de la muestra. Se corrió una prueba presuntiva que permite conocer el porcentaje de disolución de la muestra que debe aplicarse para poder leer los valores de DQO, por lo que la muestra se diluyó al 2 y 5 %.

2. Preparación de las muestras para su digestión. Para cada dilución se siguió el mismo procedimiento. Se colocaron en cada uno de los tubos 1.5 mL de solución digestora, se tomó una alícuota de 2 mL de la muestra a analizar (diluida) y se añadió cuidadosamente 3.5 mL de ácido sulfúrico-sulfato de plata, tomando las precauciones necesarias debido a la reacción de calentamiento que sufre. Se cerró cada tubo y se homogenizó la mezcla con una leve agitación, se liberaron los vapores y se volvió a cerrar el tubo perfectamente, limpiando la parte exterior. En cada caso se utilizó un control de 200 mg/L DQO y un blanco con agua estéril, como referentes.

3. Digestión de las muestras. Los tubos se colocaron en un digestor marca HACH, modelo DBR 200 con capacidad para 30 muestras (Figura 2.5), el cual fue previamente encendido y precalentado hasta alcanzar la temperatura de 150°C. Una vez colocadas las muestras en el digestor, se seleccionó en el equipo el modo COD (DQO) con un tiempo de 120 minutos, indicando la digestión de las muestras durante ese tiempo.

Figura 2.5. Digestor modelo DBR 200 marca HACH, encendido a 150 ºC en modo COD.

4. Titulación de las muestras digeridas. Terminado el proceso de digestión (120 minutos), las muestras se retiraron del digestor y se enfriaron por un lapso de 30 minutos (Figura 2.6).

Para realizar la titulación Se llenó una bureta con capacidad de 25 mL de solución SAF 0.025 M. Se vació la muestra digerida en un vaso de precipitado y se le colocó una gota de indicador 1,10 fenantrolina. Esta mezcla se tituló con la solución SAF al vire de azul verdoso a café rojizo y se registró el dato de los mililitros gastados de SAF.

5. Obtención de la molaridad real de la solución SAF. Se colocó en un vaso de precipitado una solución compuesta por 1 mL de dicromato de potasio 0.025 M, 9 mL de H_2O estéril, 3 mL de acido sulfúrico concentrado y 1 gota de fenantrolina. Fue titulada con solución SAF 0.025 M al vire de azul verdoso a café rojizo, se registró el valor de los mL gastados y se calculó el valor real de molaridad de acuerdo a la ecuación 1.

$$C_{SAF} = \frac{C_1 \cdot V_1}{V_{SAF}} \qquad (1)$$

Donde:

C_{SAF} es la moralidad real de la solución SAF.

C_1 es la concentración del dicromato de potasio.

V_1 es la alícuota del dicromato de potasio.

V_{SAF} es el volumen gastado de SAF.

6. Cálculo de la DQO. Con los valores obtenidos en la titulación de la muestra y la valoración de molaridad de la solución SAF se realizaron los cálculos de DQO con la ecuación 2. Los valores son expresados en mg/L.

$$DQO = \frac{(V_a - V_b) \cdot M \cdot 8000}{V_c} \qquad (2)$$

Donde:

V_a es el valor de mililitros de SAF gastados en el blanco.

V_b es el valor de mililitros de SAF gastados en la muestra.

M es la molaridad valorada del SAF.

V_c es el volumen de la muestra.

Figura 2.6. Enfriamiento de muestras posteriores a la digestión.

Oxigeno disuelto (OD). Se determinó con un medidor de OD marca HANNA modelo HI4195 en un rango de lectura de 0-100 % que se define como el porcentaje de oxigeno disuelto en 1 litro de agua. El equipo utilizado se muestra en la Figura 2.7.

Figura 2.7. Medidor de oxigeno HANNA modelo HI4195.

La medición se realizó con el dispositivo encendido, previa calibración, siguiendo los siguientes pasos:

1. Se colocó el electrodo sensor dentro de la muestra de agua residual por un periodo aproximado de 5 minutos.
2. Se verificó la estabilidad de la lectura y se registró el dato.

Azúcares reductores. Con base en el procedimiento “Determinación de azúcares reductores por licor de Fehling” de la Universidad del trabajo de Uruguay, se utilizaron las siguientes disoluciones:

a) Solución cúprica, 70 g de sulfato de cobre en agua caliente; se enfrió y con agua se completó el volumen hasta un litro. También llamada Fehling I.
b) Solución sódica, 350 g de sal de tartrato de sodio y potasio, más 100 g de hidróxido de sodio en agua en un litro de agua destilada. Conocida como Fehling II.
c) Solución de dextrosa, 2 g de dextrosa por litro de H_2O.
d) Indicador azul de metileno.

Se determinó este parámetro para cada una de las muestras siguiendo los siguientes pasos:

1. Se mezcló solución sódica y cúprica en 1mL cada una, para desarrollar el licor Fehling, se adicionó H_2O destilada en cantidad de 10 mL.
2. Se utilizó una parrilla de calentamiento marca Thermo Scientific hasta llevar la mezcla a ebullición, se colocó una gota de indicador azul de metileno.
3. El licor de Fehling en ebullición se mantuvo en agitación, se tituló con una solución de dextrosa de 2 g/L, hasta el vire de color azul a café rojizo, se registraron los mL gastados (T) en la valoración.
4. Se tituló el licor de Fehling en agitación, con cada una de las muestras del efluente hasta el vire de color azul a café rojizo y se anotó los mL gastados (G) en la titulación.
5. Se determinó la cantidad de azúcares de acuerdo a la siguiente ecuación:

Azúcares reductores $$\text{mg/L} = \frac{1000 \cdot \text{T}}{\text{G}} \quad (3)$$

Proteínas. Para la determinación de proteínas se utilizó un espectrofotómetro UV/VIS marca PerkinElmer modelo Lambda 35 (Figura 2.8) con los siguientes pasos:

Figura 2.8. Espectrofotómetro marca PerkinElmer modelo Lambda 35.

1. Las proteínas se leyeron a 280 nm de acuerdo a una curva de calibración de Albumina Bovina a concentraciones de 0 hasta 1000 μg/mL (Figura 2.9), la cual puede ser utilizada hasta lecturas de 1000 μg/mL.

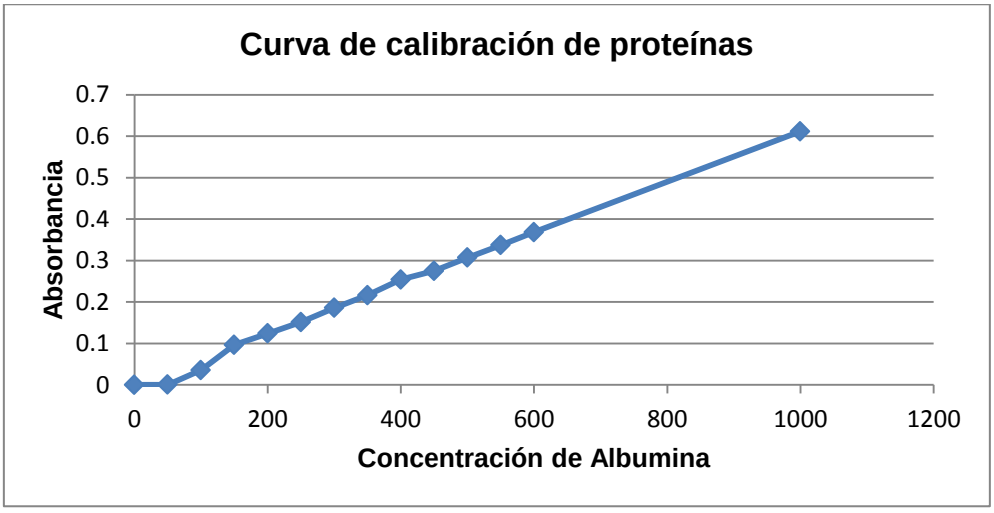


Figura 2.9. Curva de calibración para determinación de proteínas (r^2=0.9980).

2. Se preparó la muestra centrifugando a 5000 rpm por espacio de 15 minutos, utilizando el sobrenadante y se tomó lectura.
3. Las muestras con lecturas que salieron del rango se diluyeron y se realizó nuevamente su lectura.

2.2 Inmovilización de *P. chrysosporium*

La cepa *P. chrysosporium* identificada como HEMIM-5 fue resembrada cada mes en el medio de cultivo sólido agar papa dextrosa (PDA), utilizando cajas de Petri y tubos de ensayo e incubando a 28 ºC, durante 7 días, para preservar la cepa. El medio fue preparado pesando 39 g de PDA marca Bioxón, disolviendo en un litro de agua. Ambos componentes fueron previamente esterilizados. Esta actividad continuó realizándose el tiempo que duró la investigación para preservar la cepa.
Una vez que se aseguró la preservación de la cepa, se procedió a inmovilizar la biomasa del hongo, llevando a cabo las actividades que a continuación se describen.

2.2.1 Adaptación del hongo en medios de cultivo sólido

Para estas pruebas se utilizó medio sólido preparado suplementado con: 1) extracto de levadura (PDY) con una relación de 0.5 g/L de papa dextrosa, 0.4 g/L de extracto de levadura y 17 g/L de agar bacteriológico. 2) Cereal de trigo y cebada (AB) con una relación de 20 g/L, 10 g/L de dextrosa y 17 g/L de agar bacteriológico. Utilizando cada formulación por separado para seleccionar el medio adecuado que proporcione los elementos nutritivos al hongo en la inmovilización.
Como blanco se utilizó el medio comercial agar dextrosa de papa (PDA) con una relación de 39 g/L.
El hongo se sembró en condiciones estériles y fue incubado a 28 ºC por 7 días.

2.2.2 Inmovilización del *P. chrysosporium* en esferas de alginato de sodio-calcio

Para inmovilizar el micelio del hongo en esferas de alginato, se preparó micelio suspendido de *P. chrysosporium*, utilizando micelio crecido en medio sólido de cultivo reciente (15 días como máximo), bajo el procedimiento siguiente:

1. Homogenización del micelio. Se atempera una caja de Petri de micelio de *P. chrysosporium* contenido en agar. En medio estéril, se hacen cortes o secciones de 1 cm^2 aproximadamente sobre el micelio.

El micelio seccionado contenido en la caja se coloca en un matraz con 100 mL de agua destilada y esterilizada (Figura 2.10) y se pone en agitación (200 rpm) por 24 h para garantizar que el hongo se encuentre en forma homogénea. Una vez obtenido, éste se almacena a 4 °C para su uso posterior. El micelio homogeneizado fue renovado mensualmente de manera continua, y se conserva en refrigeración durante ese tiempo a 4 ºC con la finalidad de disminuir la actividad metabólica del microorganismo.

Figura 2.10. Contenido de una caja de Petri de *P. chrysosporium cultivado* en PDA y seccionado para obtener micelio suspendido en forma homogénea.

2. Inmovilización del micelio. Para la inmovilización del *P. chrysosporium*, se siguió el método indicado por Zahmatkesh *et al.* (2010), el cual consistió en inmovilizar el

micelio suspendido y homogeneizado de *P. chrysosporium* en esferas de alginato sodio-calcio.

Para formar las esferas, se realizaron las pruebas descritas a continuación en los siguientes 4 puntos.

2.2.2.1. Variación de la concentración de alginato

Se prepararon soluciones acuosas de alginato de sodio en concentraciones de 25, 30 y 35 g/L (Sigma Aldrich), con previa esterilización del alginato y del agua. Las soluciones se colocaron en un agitador electromagnético a altas revoluciones, de modo que fuera posible apreciar el vórtice. Posteriormente a esta mezcla se le agregó una alícuota de solución del micelio suspendido en relación de 80 mL/L, y se mezcló nuevamente para homogenizar (Figura 2.11).

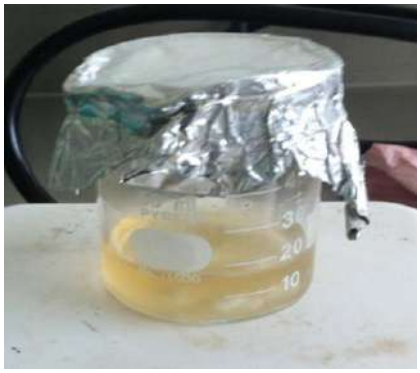


Figura 2.11. Mezcla de alginato de sodio y micelio suspendido.

2.2.2.2. Variación de la concentración de la solución de cloruro de calcio

Alternativamente se prepararon soluciones de cloruro de calcio marca Meyer a concentraciones de 25, 30 y 35 % (p/v) en agua destilada, agitando en un agitador

magnético. Previamente se esterilizaron por 15 minutos el cloruro de calcio y el agua de preparación.

La mezcla de alginato de sodio y micelio fue vertida por goteo con jeringas de 5 mL en las soluciones de cloruro de calcio correspondiente (25, 30 y 35 % (p/v), para formar esferas de alginato de sodio-calcio. Las esferas obtenidas con el micelio atrapado, se mantuvieron a 4 °C durante 24 h en cloruro de calcio, para endurecer la esfera y proporcionar porosidad a la misma.

Transcurrido el tiempo de contacto de las esferas con el cloruro de calcio, fueron filtradas, lavadas con agua estéril de 4 a 5 veces para eliminar el cloruro de calcio residual, fueron almacenadas en agua estéril y preservadas a 4 ºC para su posterior uso. En la Figura 2.12, se aprecian las esferas formadas por el goteo de la mezcla de alginato de sodio con el micelio suspendido, y su vertimiento en cloruro de calcio.

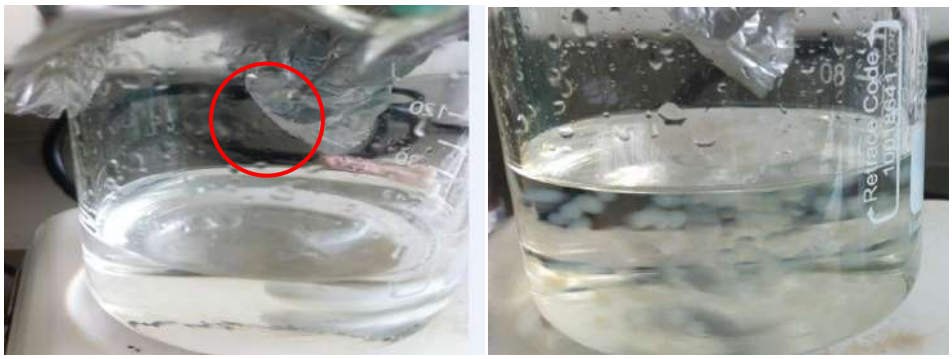


Figura 2.12. Vertido por goteo de la mezcla de alginato de sodio y micelio suspendido de *P. chrysosporium* en cloruro de calcio (izquierda) y formación de esferas con micelio inmovilizado (derecha).

2.2.2.3. Adición de carbonato de calcio a la solución de alginato

A la solución de alginato de sodio se le adicionó el 5 % de volumen de $CaCO_3$ con la finalidad de aumentar la porosidad en la esfera (Zhang *et al.,* 2008).
La mezcla final fue vertida por goteo en la solución de cloruro de calcio siguiendo el mismo método marcado en el punto anterior.

Adicionalmente se varió el tamaño de la esfera de 3 y 4 mm, la cual se logró utilizando jeringas de 5 mL equipadas con aguja y sin aguja, dando lugar a dos tamaños de esferas de diámetro 3 mm con aguja y diámetro 4 mm sin aguja. El procedimiento de lavado y conservación de las esferas fue el mismo que el establecido en los puntos anteriores.

2.2.3. Caracterización de la esfera de alginato

Del resultado de las variaciones realizadas en las etapas anteriores, se seleccionaron las esferas que cumplieran con las condiciones adecuadas para su uso en el tratamiento del agua residual de la industria cervecera (estabilidad, firmeza, no tendencia a la aglomeración y permanencia en el agua). A las esferas seleccionadas se les realizó un estudio de caracterización superficial para complementar su identificación.

El primer estudio consistió en la determinación de las características morfológicas de la esfera a través de micrografías obtenidas mediante la técnica MEB (microscopía electrónica de barrido) utilizando un equipo marca JEOL modelo JSM-6610LV (Figura 2.13), de acuerdo a la siguiente descripción.
1. Se prepararon las esferas muestra sobre el porta muestras circular propio del equipo, adheridas con cinta de cobre doble cara.
2. Se colocó el porta muestras dentro de la cámara del equipo.

3. Se despresurizó el equipo para su trabajo en vacío.
4. Se prendió la cámara infrarroja para fijar la distancia de imagen y se enfocaron los lentes.
5. Se ajustaron los controles de distancia, luz e imagen, se tomaron las micrografías de las muestras.

Figura 2.13. Microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM-6610LV.

El segundo estudio consistió en la determinación de las características superficiales de la esfera, mediante la adsorción de N_2, con el método BET (Brunnauer, Emmett y Teller), relativas al área superficial, así como volumen, área y diámetro de poro, utilizando para ello un sortómetro BELSORP-aqua^3 de BEL Japan, Inc. (Figura 2.14).

Figura 2.14. Sortómetro BELSORP-aqua^3 (izquierda), introducción de muestras al equipo (derecha).

La determinación en este equipo se realizó de la siguiente manera:

1. Las esferas de alginato se pretratarón a 85°C durante 1 h.
2. Las esferas pretratadas se colocaron en las celdas tubulares propias del equipo y fueron pesadas analíticamente.
3. Las celdas fueron ubicadas en la parte superior del sortómetro, en su respectiva posición.
4. La cámara de inundación fue provista de nitrógeno líquido y posteriormente se colocó bajo las celdas.
5. Se inició el equipo, la cámara de inundación cubrió las celdas y las perlas se sometieron al N_2, por un periodo de 5 horas.
6. La interfase gráfica del equipo mostró los resultados del análisis.

2.3 Evaluación del efecto de la inmovilización del *P. chrysosporium* en diferentes medios de cultivo

Con el propósito de evaluar el efecto de la inmovilización del hongo, se llevó a cabo un seguimiento del desarrollo de la biomasa en diferentes medios de cultivo, así como el registro del cambio en la calidad de dichos medios para verificar la adaptación del hongo inmovilizado al medio y su adecuado desarrollo. En esta etapa fue elegido el medio de cultivo favorable para el desarrollo de la biomasa.

Al medio de cultivo elegido se le determinó la cantidad de carbono y nitrógeno a fin de establecer la relación Carbono-Nitrógeno (C/N) favorable para el desarrollo de la biomasa del *P. chrysosporium* en condiciones de inmovilización en esferas de alginato.

La determinación de la relación C y N se realizó de acuerdo al método de análisis elemental por combustión, utilizando un analizador orgánico CHNS-O marca Thermo Scientific modelo Flash 2000 mostrado en la Figura 2.15.

Figura 2.15. Analizador orgánico CHNS-O vista exterior e interior.

El procedimiento consistió en colocar una muestra de 0.3 g del medio de cultivo elegido en una cámara sobre cápsulas de estaño, programando al equipo para el análisis C-N. La cámara se inundó de Helio a una presión de 1350 psi como gas de referencia y con oxígeno a una presión de 2500 psi como gas de acarreo. Al finalizar el análisis, se tomó el dato proporcionado por el equipo.

2.3.1 Preparación de los medios de cultivo

Se trabajó con medios de cultivo preparados considerando principalmente la presencia de materia orgánica para simular las características que pudieran presentar las aguas residuales de la industria alimenticia y determinar la efectividad de la inmovilización.

En una primera etapa, los medios de cultivo utilizados fueron los provenientes del agua de remojo de granos de cebada y los compuestos a base de cereal de trigo (AB) sin adición de dextrosa y suplementado con dextrosa, esta última para determinar la suficiencia de fuente de carbono para el desarrollo del hongo.

Los medios de cultivo utilizados en esta segunda etapa fueron medios líquidos:

1. Preparación solo con AB en relación 10 g/L y 2. AB en la misma relación más un suplemento de dextrosa en 50 % volumen.

2.3.1.1 Medio compuesto por el remojo de cebada

La cebada en grano fue adquirida (Figura 2.16) en San Antonio Calpulalpan en el estado de Tlaxcala, debido a que es reconocido como un lugar dedicado a la producción de grano para la malta y de proveer el tipo de grano de cebada apropiado para el proceso cervecero en el país (López *et al.,* 2007). También es importante señalar que la cascarilla de la cebada tiene una composición de celulosa en un 30-35 %, lignina 14-15 % y hemicelulosa de un 24-29 % (Abdolali *et al.,* 2014).

Para el remojo de la cebada se utilizó 30 % más de cantidad de agua con respecto a la cantidad de grano, debido a que éste absorbe de un 30-40 % de agua durante este lapso (Hernández y Hernández, 1996). La mezcla se mantuvo en agitación durante 8 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de remojo de la cebada, el sobrenadante fue filtrado.

Figura 2.16 Cebada utilizada en el remojo.

La Figura 2.17, muestra los remojos de cebada, los cuales fueron realizados a 8 horas en una proporción grano-agua de 100 g/130 mL y a una hora con una proporción grano-agua de 17.5 g/100 mL.

También se siguió el trabajo de Morales y Ruiz (2008), preparando un medio con el remojo de 175 g de grano en 1000 mL de agua destilada a temperatura ambiente, la

mezcla fue mantenida en agitación por una hora. Posterior a la obtención de cada medio de cultivo, éstos fueron esterilizados.

Figura 2.17. Remojo de agua de cebada, izquierda proporción de 100/130, derecha proporción de 17.5/100.

2.3.1.2 Medio AB suplementado con dextrosa

La preparación del medio inicia con la molienda de un cereal a base de trigo y cebada, en un mortero de porcelana y tamizado en mallas de 30 y 40, como se muestra en la Figura 2.18.

Figura 2.18. Molienda y tamizado de AB.

De acuerdo a la información comercial del cereal, contiene trigo entero, azúcar, salvado de trigo, harina de trigo, extracto de malta, sal yodada, maltodextrina, ácido

ascórbico (vitamina C), hierro reducido, óxido de zinc, alfa-tocoferol acetato (vitamina E), niacinamida (niacina), palmito de retinol (vitamina A), cobalamina (vitamina B12), clorhidrato de piridoxina (vitamina B6), mononitrato de tiamina (vitamina B1), rivoflamina (vitamina B2) y ácido fólico. Al tener como base el cereal de trigo se busca proporcionar una fuente de alimento al HPB y promover la secreción de enzimas (Arora *et al.,* 2002; Songulashvili *et al.,* 2007; Morales y Ruíz, 2008; Taccari *et al.,* 2009).

El medio se preparó con esta harina en relación de 10 g/L y se le adicionó dextrosa en relación de 5 g/L, resultando en un medio como el mostrado en la Figura 2.19. También es utilizado en una relación de 20 g/L y adición de 10 g/L de dextrosa. La adición de dextrosa es una fuente adicional de carbono, la cual es utilizada para complementar la fuente de carbono en un medio de cultivo (Fenice *et al.,* 2003; Gómez-Bertel, 2008; Cerrone *et al.,* 2011; Pakshirajan y Kheria, 2012).

Otro medio utilizado fue preparado con almidón, en las mismas proporciones que AB, para determinar el efecto del uso de micelio libre e inmóvil y micelio de anterior y reciente cultivo.

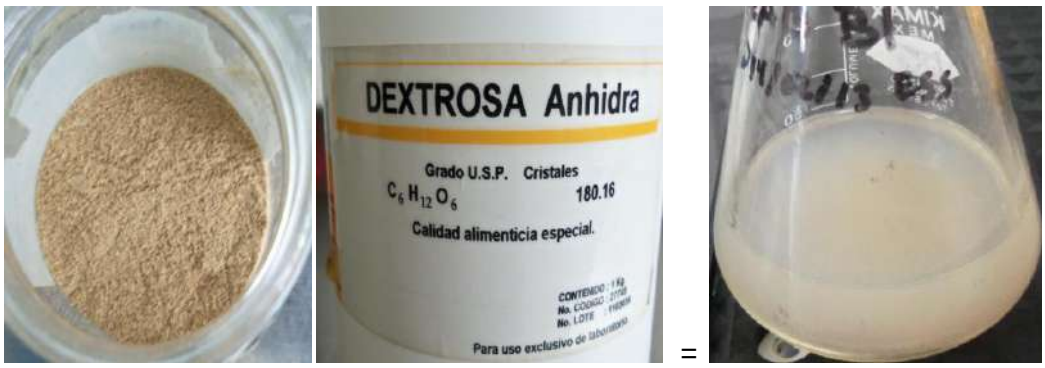


Figura 2.19. Medio AB suplementado con dextrosa.

2.3.1.3 Medio AB sin dextrosa

La preparación del medio AB contiene molienda de cereal, en proporción 1/10 y es mostrado en la Figura 2.20. En este caso no se adicionó dextrosa.

Figura 2.20. Medio AB.

2.4 Tratamiento de agua a nivel laboratorio

Se desarrollaron pruebas a nivel matraz, del agua residual en estudio considerando el medio elegido en la inmovilización del *P. chrysosporium*. Como blanco se utilizó el micelio libre del hongo, permitiendo en ambos casos, la oxigenación por agitación mecánica en un agitador de orbital marca Heildoph modelo Unimax 1010, con temperatura constante de 28 ºC (Figura 2.21).

Figura 2.21. Agitador de orbital Heidolph modelo Unimax 1010 e Incubador modelo Inkubator 1000.

En la prueba se utilizaron matraces Erlenmeyer de 125 y 250 mL con alícuotas de 100 y 200 mL respectivamente, con el *P. chrysosporium* en preparación de micelio libre y en esferas de alginato de modo inmovilizado en cantidad de 10 mL/L y de 5 a 40 g/L respectivamente, los tiempos de prueba utilizados fueron de 7 a 12 días, con toma de muestras en tubo, continuas de 10 mL. Las pruebas se realizarón con materiales y agua residual esterilizados, en áreas sanitizadas y con dos repeticiones.

2.4.1 Determinación de la relación biomasa sustrato del efluente

En esta prueba se determinó la cantidad de biomasa o en su caso la cantidad de esferas necesarias en el tratamiento. Para la prueba se utilizaron 6 matraces de 125 mL con alícuotas de 100 mL del efluente e inoculados con 0.5, 1, 2, 3 y 4 g de esferas de alginato. La cantidad de esferas o biomasa se determinó de acuerdo a la biomasa obtenida, así como de la estabilidad de las esferas y la capacidad de remoción de DQO y turbiedad del efluente final.

2.4.2 Determinación de las características del efluente tratado

De acuerdo a las normas mexicanas y los métodos mencionados en el punto 2.1, se determinaron parámetros de calidad del efluente tratado a nivel laboratorio, considerando las mismas mediciones realizadas en el agua residual.
Las determinaciones se hicieron para el efluente tratado con micelio libre e inmovilizado.

2.4.3 Determinación de la biomasa de *P. chrysosporium*

La determinación de biomasa se obtuvo en base a la diferencia de pesos del *P. chrysosporium* libre e inmovilizado antes de inocular y al final de la etapa de tratamiento del efluente. Para llevar a cabo la cuantificación de la biomasa, se filtró el contenido de los matraces utilizando papel filtro, y colocándolo en cajas de Petri para su secado a 103 ºC por una hora, para después enfriar en desecador, la biomasa se obtuvo por diferencia de pesos y la ganancia de biomasa resultó de la comparativa de biomasa inicial y final.

2.4.4 Determinación de enzimas secretadas por el *P. chrysosporium*

En todos los casos, la actividad enzimática fue expresada como el número de unidades de enzima por litro de disolución (U/L), donde U representa la cantidad de enzima que cataliza 1 μmol de sustrato por minuto (González, 2012).

La evaluación de la actividad enzimática se orientó a 2 de las enzimas representativas del *P. chrysosporium;* Manganeso peroxidasa (MnP) y Lignina peroxidasa (LiP). Ambas enzimas fueron determinadas por métodos colorimétricos utilizando un espectrofotómetro con un equipo Lambda 35 marca PerkinElmer en celdas de cuarzo con un volumen de 3 mL y de acuerdo a los siguientes procedimientos (Gil *et al.,* 2012):

Enzima MnP (ε=4460 M^{-1} cm^{-1}). Se determinó con base en la oxidación del rojo de fenol a una longitud de onda de 610 nm. La mezcla utilizada contenía; 0.3 mL de rojo de fenol al 1 % p/v en Hidróxido de Sodio, 0.3 mL de Lactato de Sodio 250 mM en buffer pH 4.5, 0.6 mL de Albumina Bovina al 0.5 % p/v, 0.15 mL de Sulfato de Manganeso 2 mM, Peróxido 2 mM en buffer de Fosfato de Sodio pH 8 y una muestra

del sobrenadante de 1.5 mL; esta mezcla se homogeneizó y se calentó utilizando un baño de agua a temperatura constante de 30 ºC por un tiempo de 5 minutos.

Enzima LiP (ε=9300 M^{-1} cm^{-1}). El sustrato para esta enzima fue el Alcohol Veratrílico a una longitud de onda de 310 nm. La mezcla se preparó con 1 mL de Citrato de Sodio en buffer pH 3, 0.5 mL de Alcohol Veratrílico 10 mM, 0.5 mL de Peróxido 2 mM y una muestra de 0.5 mL del sobrenadante, se homogeneizó y dejo actuar por 2 minutos.

En ambos casos la determinación final de las unidades enzimáticas (U/L) se calculó de acuerdo a la ecuación 4:

$$(U/L) = (\mu mol\ /min\ x\ L) = \frac{\Delta ABS\ x\ mol\ x\ m\ x\ Vr}{\varepsilon\ x\ Vm\ x\ t} \qquad (4)$$

Siendo:

ΔABS. Es la absorbancia de lectura.

mol. Constante (1000).

m. Distancia de paso de luz incidente en la muestra.

Vr. Volumen total de la reacción.

ε. Coeficiente de extinción.

Vm. Volumen utilizado de la muestra.

t. Tiempo de reacción.

2.5 Instrumentación y automatización del Biorreactor

Se incorporaron al biorreactor airlift elementos sensores de temperatura, pH y OD, controlador de temperatura y suministro regulado de aire.

Para el caso del control de temperatura, se incorporó un controlador electrónico de temperatura marca Pixsys modelo ATR111 con un rango de operación de 0 a 40 ºC y humedad relativa de 35-95 %, con capacidad de monitoreo analógico de entrada con sensibilidad de 0.5 % y salida digital controlada tipo relevador. La entrada fue conectada a un sensor de temperatura tipo electrodo marca JUMO y la salida a una resistencia en malla de silicón con capacidad de fijación alrededor del reactor (Figura 2.22).

Figura 2.22. Control de temperatura y resistencia en malla de silicón.

Para el control de aire se utilizó una bomba de aire marca SEV con capacidad de 100 PSI, regulada con un flujometro marca Key Instruments en un rango de 1 a 5 litros por minuto (L/min) (Figura 2.23), el flujo de trabajo utilizado fue de 1.5 L/min.

Figura 2.23. Control de aire.

El pH fue monitoreado con un pH metro marca HANNA modelo HI 9126.
El OD fue monitoreado con un detector HANNA modelo HI9145.

2.6 Tratamiento del agua residual a nivel piloto

Para el tratamiento a nivel piloto del efluente residual, se utilizó un biorreactor airlift marca SEV, modelo FAR-4 con capacidad de 4 litros. El biorreactor fue colocado en un área sanitizada, fue previamente esterilizado por separado y armado en su área para cada uno de los experimentos.

Para llevar a cabo el tratamiento, se utilizaron 3 L del efluente industrial el cual fue incorporado al biorreactor, programándose una temperatura de 30°C, y alimentación de aire en una razón de 1.5 L/min; una vez alcanzadas estas condiciones, se inoculó una cantidad de biomasa en g/L de *P. chrysosporium* para el caso de micelio libre y una cantidad específica de esferas/L en el caso de *P. chrysosporium* inmovilizado de acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio planteado en el punto 2.4.2 del método página 58 para ambos casos.

El biorreactor fue operado durante 8 días, extrayendo muestras diarias de 25 mL del efluente para determinar sus características. El pH y OD fueron determinados con los electros inmersos en el efluente dentro del reactor.

2.6.1 Evaluación de las características del efluente residual con micelio libre.

Se determinó la calidad del agua obtenida en el tratamiento del efluente a nivel piloto con micelio libre. Los parámetros evaluados fueron los que se determinaron para el

agua residual, considerando los métodos mencionados en el apartado 2.1 de este trabajo.

La determinación de biomasa producida se obtuvo en base a la diferencia de pesos del *P. chrysosporium* libre antes de inocular y al final de la etapa de tratamiento del efluente a nivel piloto, de acuerdo a lo marcado en el punto 2.4.3 de este método en la página 59.

Finalmente la determinación de enzimas se realizó con las lecturas en las muestras obtenidas durante el desarrollo del tratamientos a nivel piloto con el *P. chrysosporium* libre de acuerdo a los métodos para MnP y LiP referidos en el punto 2.4.4 mostrado en la página 59.

2.6.2 Evaluación de las características del efluente residual con micelio inmovilizado

Se determinaron los parámetros de calidad del efluente, biomasa producida y la capacidad enzimática obtenidos en el tratamiento del efluente a nivel piloto con micelio inmovilizado, de acuerdo al punto anterior.

3. RESULTADOS

En este apartado se presentan de manera desglosada los resultados obtenidos de una primera etapa de la investigación, referidos a la caracterización del efluente de la industria cervecera, así como los datos obtenidos de la inmovilización del HPB utilizado en el proceso; iniciando con la afinidad y adaptación del *P. chrysosporium* por un medio de cultivo, a través de su crecimiento en incubación. También se presenta el método y cantidades óptimas de materiales, para el manejo de esferas de alginato, en forma, estabilidad, diámetro y volumen de poro; con la evaluación del efecto obtenido en diferentes medios de cultivo.

En segundo lugar se presentan los resultados de las pruebas del tratamiento del efluente en matraces Erlenmeyer con el hongo libre e inmovilizado, estos resultados son referidos a la evaluación de las características después tratamiento, principalmente a la reducción de DQO, determinación de biomasa y producción de enzimas.

Finalmente se presentan los resultados del tratamiento de agua a nivel piloto en un biorreactor airlift, de la misma manera, con el uso de *P. chrysosporium* en estado libre e inmovilizado. Los datos mostrados corresponden a la evaluación de las características del efluente tratado, actividad enzimática y producción de biomasa.

3.1 Caracterización del agua residual de la industria cervecera

El efluente de la industria cervecera presentó una coloración café, olor desagradable, y turbiedad visible.

El efluente correspondiente al agua tratada en la planta de la industria (PTAR) no presentó olor, y mostró un aspecto de menor turbiedad y sólidos suspendidos.
En la Figura 3.1 se presenta muestras de ambos efluentes, donde se aprecian algunas de las características ya descritas.

Figura 3.1. Muestras de efluentes de la industria cervecera: (izquierda) efluente de proceso de la industria cervecera sin tratar y (derecha) efluente tratado en una planta convencional de la industria cervecera.

Con respecto a los parámetros de calidad, los efluentes presentaron las características dadas en la Tabla 3.1. Donde se muestra que el proceso convencional reduce en un 61 % la DQO, la turbiedad en un 30 % y la conductividad permanece sin cambio.

Los datos relevantes de la caracterización del efluente, muestran que la cantidad de azúcares en el efluente tratado en la PTAR es mucho menor que en los contenidos en el efluente industrial, lo cual se consideró una limitante para tratar esta agua residual con *P. chrysosporium* ya que carece de los azúcares necesarios para el crecimiento y desarrollo del microorganismo (González, 2012). Por otro lado, en el efluente industrial también se detectó una DQO y conductividad alta para el crecimiento del microorganismo, sin embargo la carga y turbiedad del efluente contiene lignina de acuerdo al proceso industrial de donde proviene. Valorando los datos anteriores, se optó por utilizar el efluente industrial para su tratamiento con el *P. chrysosporium,* descartando el efluente tratado en la PTAR.

Tabla 3.1. Parámetros de calidad de los efluentes de la industria cervecera sin tratar y tratado en una planta convencional.

Muestra	Efluente proveniente del proceso	Efluente proveniente de la PTAR
pH	7	8.7
Temperatura ºC	26	26
Conductividad μS/cm	2280	2166
Turbiedad UNT	32	22.1
Azúcares reductores mg/L	12.5	1.5
Proteínas μg/L	5200	2100
DQO mg/L	4400	1687

Con respecto a otros parámetros del efluente industrial, los resultados de calidad del efluente sin tratar coinciden con lo reportado por Simate *et al.* (2011), para un efluente cervecero se marcaron valores de pH de 3-12, temperatura de 18-40 ºC y un DQO entre 2000 y 6000 mg/L.

Sin embargo, los resultados obtenidos se encuentran por encima de los reportados, por Feng *et al.* (2008), que consideran un pH de 6.5 y un DQO entre 1800-2600 mg/L y Yabroudi *et al.* (2009), que reportó una DQO en efluentes de la industria cervecera de 2000 a 2900 mg/L, la diferencia puede deberse al tipo de producto elaborado y al sistema de limpieza de utilizado para el equipo.

El pH básico del efluente tratado en PTAR se debe posiblemente al uso de sustancias alcalinas utilizadas para la limpieza de equipos, y además a la adición de sustancias alcalinas al efluente para su tratamiento.

3.2 Inmovilización del *P. chrysosporium*

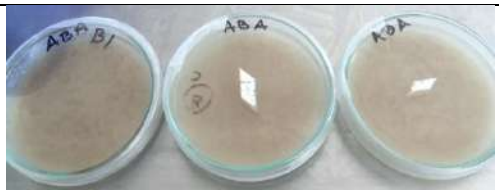
En este apartado se presentan los resultados provenientes de la adaptación del hongo en los medios sólidos PDY, AB y PDA; la inmovilización del hongo utilizando micelio proveniente de reciente y anterior cultivo y el seguimiento en el desarrollo del hongo en diferentes medios de cultivo en forma líquida a través del cambio en la biomasa y el cambio en la calidad del medio de cultivo. Así como la evaluación de las características de esferas de alginato utilizadas como medio de inmovilización del *P. chrysosporium.*

3.2.1 Adaptación del hongo en medios de cultivo sólido

La afinidad del *P. chrysosporium* por el medio en estado sólido al finalizar los 7 siete días de incubación, se muestra en la Tabla 3.2. Donde se observa que el contenido nutrimental del medio PDY a pesar de contener fuente de nitrógeno no fue suficiente para el crecimiento del micelio, mientras que en el medio PDA y AB el desarrollo fue notable, sobre todo en éste último, donde el llenado de la caja de Petri se apreció de manera abundante desde el 4º día, superando el cultivo del hongo en el medio utilizado como blanco (PDA). En la imagen de ambos lados, se aprecia un blanco para cada medio y dos pruebas, considerando una repetición en cada caso.

En otros trabajos se reportan similares resultados sobre el crecimiento y adaptación del *P. chrysosporium* en medios de cultivo sintéticos enriquecidos con carbono, glucosa y nitrógeno (Zhang *et al.,* 2008; Chen *et al.,* 2011; Xiong *et al.,* 2008; Yu *et al.,* 2011; Liang *et al.,* 2012; Ürek y Pazarlioğlu, 2005; Rodarte-Morales *et al.,* 2012; Songulashvili *et al.*, 2007; Taccari *et al.*, 2009). En estos trabajos, se ha encontrado que el llenado de la placa se presenta entre el 4 y 7 día de incubación.

Tabla 3.2. Micelio *P. chrysosporium* desarrollado en PDY, PDA y AB.

Medio	Inicio del cultivo. Día 0	Finalización de la prueba. Día 7
PDY		
PDA		
AB		

De acuerdo a lo anterior y los resultados de crecimiento, se tiene que el medio adecuado para la adaptación del hongo corresponden a cultivos en AB en concordancia con los resultados de González, (2012), por tanto el *P. chrysosporium* cultivado en medios PDA (blanco) y AB, fueron utilizados para la preparación del micelio suspendido, asegurando los nutrientes requeridos para la inmovilización.

3.2.2 Inmovilización del *P. chrysosporium* en esferas de alginato de sodio-calcio

En este apartado se presentan los resultados de la inmovilización con diferentes concentraciones de alginato y de cloruro de calcio. Por otra parte se presentan los resultados y diferencias del tamaño de perla de 3 y 4 mm de diámetro y la adición de $CaCO_3$.

3.2.2.1 Variación de la concentración de alginato

El efecto del uso de diferentes concentraciones de alginato de sodio no fue significativo visiblemente; tanto en la formación como en la textura de la perla no hubo cambios, tal y como se aprecia en la Figura 3.2, donde la apariencia de las esferas es similar en las tres diferentes concentraciones de alginato.

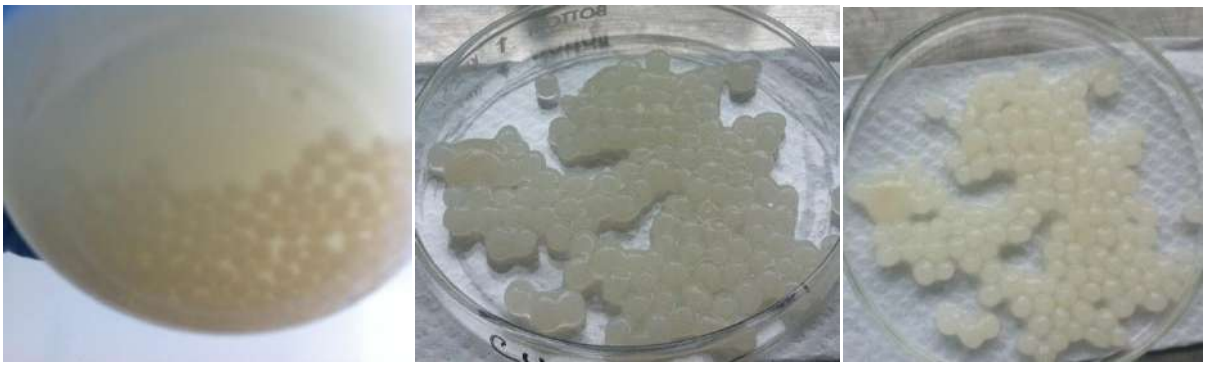


Figura 3.2. Esferas de alginato de sodio en concentraciones de 25, 30 y 35 g/L de izquierda a derecha respectivamente.

Sin embargo en el medio líquido a base de cereal de trigo, fue observable el cambio en la apariencia del medio, después de 8 días de cultivo, como se muestra en la Figura 3.3, donde la solución del matraz número 3 (derecha) perteneciente a la máxima concentración de alginato utilizada (35 g/L), es la de mayor transparencia, mientras en los matraces de las concentraciones de 25 y 30 g/L presentan turbiedad en el medio, que es atribuible a él medio mismo y posiblemente a la inestabilidad de la esfera. De lo anterior se establece que la inmovilización del hongo en las esferas obtenidas a concentración de 3.5 % de alginato resultó más efectiva, verificándose por la apariencia cristalina del medio al disminuir probablemente los nutrientes presentes en éste.

Autores como Zhang *et al.* (2008), utilizaron solo el 2 % de alginato para inmovilizar el *P. chrysosporium* en la degradación de fenantreno, logrando como resultado un 42

% de degradación; por su parte Zahmatkesh *et al.* (2010), inmovilizaron al *P. chrysosporium* con un 3 % de alginato de calcio para la degradación del colorante naranja 16, obteniendo una degradación hasta del 70 %; mientras Wang *et al.* (2011), lograron la degradación de Tolueno, utilizando un 4 % de alginato para la inmovilización de *Pseudomonas putida,* lo que indica que el uso de una concentración de alginato está en función del efluente a tratar y posiblemente del microorganismo.

Figura 3.3 Cultivo del hongo inmovilizado en esferas con diferente concentración de alginato de sodio en contacto con el medio AB adicionado con dextrosa, de izquierda a derecha 25, 30 y 35 g/L, respectivamente.

3.2.2.2 Variación de la concentración de la solución de cloruro de calcio

En lo que respecta al experimento de preparación de esferas mediante la variación de la concentración de cloruro de calcio, se encontró que las esferas obtenidas con concentraciones de 25 y 35 % fueron poco estables. En el caso de la concentración del 25 %, las esferas fueron aparentemente débiles y de formación ovalada; mientras que las esferas preparadas con el 35 % tendieron a unirse y formar estructuras largas indefinidas. En el caso de las esferas preparadas con el 30 %, se encontró una mayor estabilidad, obteniéndose esferas perfectamente formadas y permanentes. Debido a este resultado las esferas que se inocularon al medio para analizar su estabilidad y permanencia fueron únicamente las de 30 %. De este

experimento se encontró que al inocularse en el medio, después de 7 días, tubo disminución aparente de la turbiedad, indicando que hubo transferencia de nutrientes a la esfera. En la Figura 3.4, se muestran los resultados mencionados.

Bajo los datos expuestos, se establece que la concentración de cloruro de calcio adecuada para la inmovilización del hongo en esferas de alginato, fue de 30 %. Este resultado coincidió con lo reportado por Zamatkesh *et al.* (2010).

Otros investigadores utilizaron concentraciones menores de cloruro de calcio en la preparación de perlas de alginato, como son 0.1 M o del 20 % p/v para la inmovilización del mismo microorganismo, encontrando estabilidad en las perlas bajo esa concentración (Gomathi *et al.,* 2012; Rhada *et al.,* 2005). Esta diferencia en concentraciones se atribuye a los reactivos utilizados o al tiempo en que la esfera permanece en la solución de cloruro de calcio, el cual es mayor en lo reportado por los autores mencionados (más de 24 h).

Figura 3.4. Inmovilización del micelio en esferas de alginato a concentraciones de 25, 30 y 35 % (de izquierda a derecha) de cloruro de calcio, respectivamente.

3.2.2.3 Adición de carbonato de calcio a la solución de alginato

Los resultados correspondientes a las esferas preparadas con alginato y $CaCO_3$, en dos tamaños de diámetro de 3 y 4 mm, comparadas con esferas con carbonato de 4

mm, son mostrados en la Tabla 3.3. En estas imágenes se observa que las esferas de 4 mm presentan una apariencia similar, sin embargo es observable que las esferas con carbonato presentaron mayor tamaño después de 7 días de estar en contacto con el medio de cultivo, lo cual fue verificado a través de la determinación de biomasa, descartando que el tamaño se atribuyera a la absorción de agua. De esta manera se encontró que esferas de 4 mm preparadas con carbonato, generaron una mayor biomasa las cuales obtuvieron una ganancia de 30% con respecto a la biomasa inicial en la esfera, mientras que las esferas del mismo tamaño sin carbonato, alcanzaron el 19%.

Tabla 3.3. Prueba de esferas de alginato con $CaCO_3$ de 3 y 4 mm de diámetro.

Tipo de esfera	Después de 4 días	Después de 7 días	Biomasa generada g/esfera
4 mm sin carbonato			$6.2x10^{-3}$
4 mm con carbonato			$7.17x10^{-3}$
3 mm con $CaCO_3$			$5.6X10^{-4}$

Con respecto a la esfera de 3 mm con carbonato, se puede observar que la adición de carbonato afectó a la esfera en ese tamaño, tendiendo a aglomerarse para formar una sola masa al estar en contacto con el medio de cultivo, ya que originalmente la esfera no presentó este problema. En relación a la biomasa producida en una esfera de 3 mm, ésta fue mucho menor, comparada con las esferas de 4 mm.

En la Figura 3.5, se presentan esferas preparadas con carbonato de calcio de 3 y 4 mm sobre papel milimétrico, antes de inocularse al matraz con el medio de cultivo, donde se aprecia que su apariencia es la misma y, confirmando que el efecto de aglomeración en una esfera de 3 mm, se presenta al contacto con el medio de cultivo, probablemente debido a la alta porosidad producida con el carbonato pero no adecuada al tamaño de la esfera.

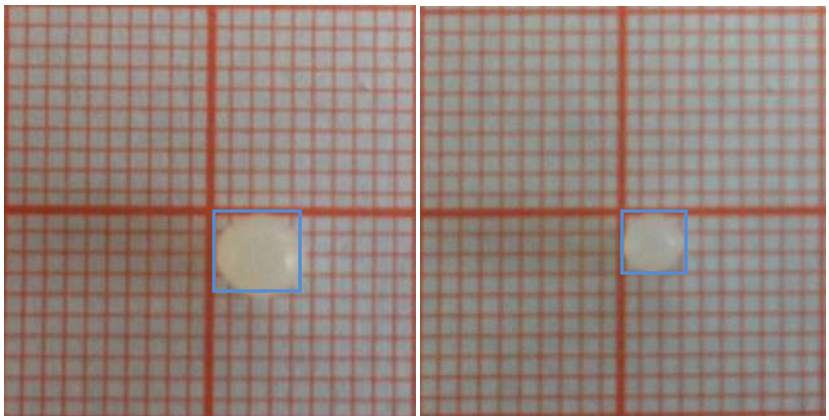


Figura 3.5. *Phanerochaete chrysosporium* inmovilizado en esferas de alginato con carbonato de calcio de 4 (izquierda) y 3 mm (derecha) de diámetro.

De estos resultados de variación en la preparación de la esfera, se rescata que el tipo de esfera con la que se obtuvieron mejores resultados fue la siguiente:
Diámetro de esfera, 4 mm; composición del material de la esfera, 35 g/L de alginato de sodio, 5 % p/v de carbonato de calcio; solución entrecruzante, cloruro de calcio; concentración de la solución entrecruzante 30 % p/v.

Los resultados anteriores son atribuidos a la porosidad obtenida en el material y al aumento en el tamaño del poro, debido a la adición de carbonato, lo cual mejoró la transferencia de oxígeno y nutrientes a la esfera.

Resultados sobre la mejora en porosidad de una esfera de alginato, debido a la adición de carbonato fueron expuestos en el trabajo de Zhang *et al.* (2008). Sin embargo los autores no realizaron el estudio del tamaño de esfera, por lo que ellos encontraron que esferas de 3.8 $\pm$ 0.2 mm con carbonato, incrementaron la degradación de fenantreno con *P. chrysosporium*, donde el hongo en condición libre degradó el 11.1 %, inmovilizado en esferas de alginato de calcio removió el 14.8 % y encapsulado en alginato de calcio con adición de $CaCO_3$ degradó un 28.2 %, atribuido al aumento del tamaño de poro en la esfera.

En contraste trabajos como el de Xu *et al.* (2006) encontraron que la adición de sílica al alginato reduce el tamaño de poro y da firmeza a la esfera, evitando la aglomeración en sistemas de agitación, sin embargo este composito fue preparado para inmovilizar una enzima, requiriendo un tamaño de poro menor.

En lo que respecta al tamaño de la esfera, Radha *et al.* (2005), inocularon el *P. chrysosporium* en esferas de alginato de diferentes tamaños (2-6 mm), para el tratamiento de aguas coloreadas con 7 tintes sintéticos, obteniendo la mejor decoloración en la esfera de 2 mm de diámetro, utilizando una relación no mayor del 10 %. El hecho de que la esfera más chica fuera la mejor opción para decoloración se atribuyó a que ésta representó una mayor área superficial al contacto con las aguas con colorantes.

3.2.3. Caracterización de la esfera de alginato

En la Figura 3.6, se observa una comparativa de las imágenes obtenidas por el microscopio electrónico, donde la apariencia y textura de la esfera de 4 mm con adición de $CaCO_3$ es más clara y definida con respecto a la esfera con ausencia del carbonato. Por otra parte en la Figura 3.7, la imagen obtenida de las esferas de alginato de 3 mm y 4 mm de diámetro, ambas con carbonato de calcio, muestra la forma, textura y consistencia completa de la esfera, encontrando diferencias que pueden representar deficiencias en la esfera de 3 mm, como cierta deformidad o ruptura que puede permitir que el microorganismo o el alginato sean liberados al efluente en el proceso de tratamiento.

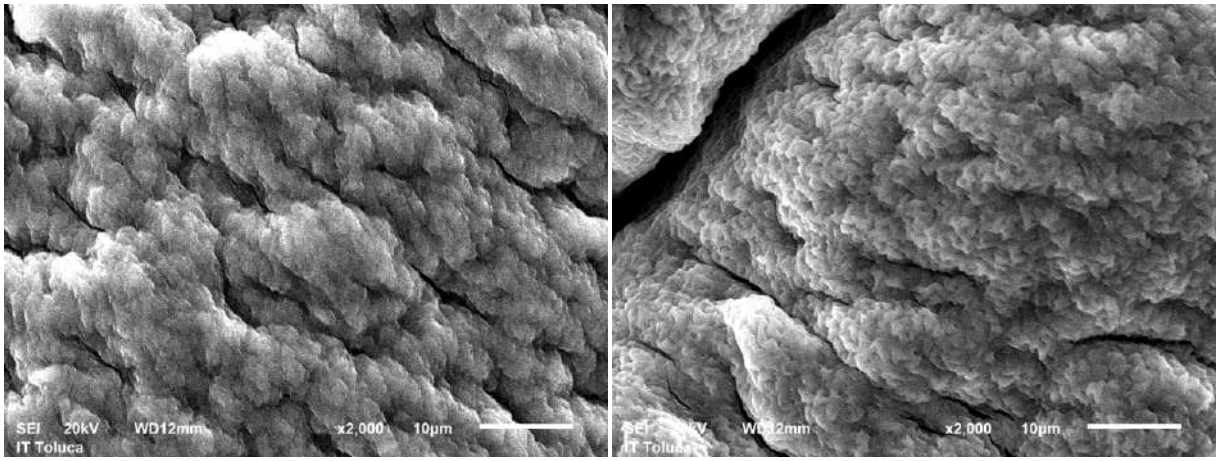


Figura 3.6. Imagen al microscopio con aumento de 2000 veces, para esferas de alginato de 4 mm de diámetro (imagen izquierda s/$CaCO_3$, imagen derecha c/$CaCO_3$).

Adicional a los resultados obtenidos por MEB, en el análisis de las características superficiales de las esferas de alginato de 4 mm, se obtuvo un volumen de poro, con resultados para esferas sin $CaCO_3$ de $5.2328X10^{-4}$ cm^3 en comparación con esferas adicionadas con $CaCO_3$ de $5.7344X10^{-4}$ cm^3; lo que implica un aumento del volumen del poro cercano al 10 %, y por consecuencia el incremento de la capacidad de la

esfera para permitir el paso de nutrientes al interior. Por lo anterior la esfera seleccionada para llevar a cabo los estudios del tratamiento del efluente es de tamaño 4 mm adicionada con $CaCO_3$.

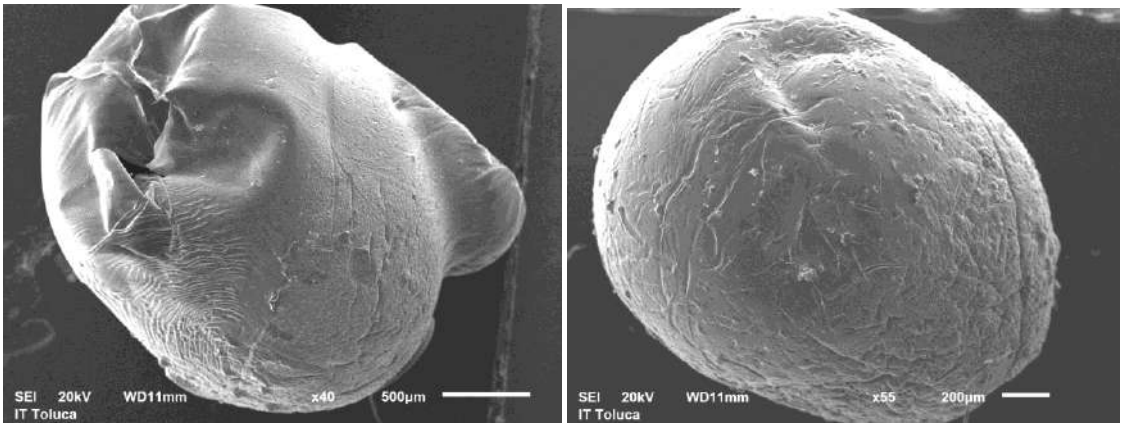


Figura 3.7. Imagen de esferas de alginato (imagen izquierda esfera de 3 mm con $CaCO_3$, imagen derecha esfera de 4 mm con $CaCO_3$)

3.3 Evaluación del efecto de la inmovilización del *P. chrysosporium* en diferentes medios de cultivo

El contacto del *P. chrysosporium* en diferentes medios de cultivó arrojó datos que se recabaron en la Tabla 3.4, para determinar la efectividad de la inmovilización del hongo, al mostrar la biomasa generada y su efecto en la modificación de algunos de los parámetros del medio comparados antes de ser inoculado y después de finalizar la prueba en 8 días de tratamiento.

De los datos mostrados en la Tabla 3.4, se observa que los valores de biomasa comparados por tipo de medio, indican que el medio KIRK no es suficiente para que el hongo aporte biomasa; mientras los medios AB adicionados con dextrosa aportan la mayor cantidad.

Tabla 3.4. Datos de la modificación de algunos parámetros del medio de cultivo en contacto con micelio inmovilizado de *P. chrysosporium* durante 8 días.

Día	Medio de cultivo	Biomasa	pH/ pH*	Conductividad μS/cm	Turbiedad NTU	DQO mg/L	Azúcares g/L
INICIO	Cebada	0	5.93	730.2	3.7	2562	-
	KIRK	0	5.1/ 4.3	90.93	0.7	2125	-
	C/AB	0	6.05/4.54	472.4	63.2	3000	-
	AB+D (20/10)*	0	5.41/4.54	957.5	108.5	10400	12.45
	AB+D (10/5)*	0	5.88/4.55	451	21.6	6200	5.48
	AB	0	5.6	410	32	4400	0.8506
FINAL	Cebada	0.0144	8.15	964.3	40.1	2125	-
	KIRK	0.010	5.75	291.2	2.5	2125	-
	KIRK modificado*	0.012	5.52	435.5	1.4	2562	-
	C/AB	0.0315	6.46	806.3	271.5	2125	-
	C/AB modificado*	0.0208	6.07	869.4	563	2125	-
	AB+D (20/10)	0.08928	4.22	1584	445	8800	4.98
	AB+D (20/10) modificado*	0.3377	4.02	1532	465	9200	5.7
	AB+D (10/5)	0.1395	2.67	23.5	1900	12400	3.46
	AB+D (10/5) modificado*	0.2091	3.9	101	1220	6600	3.22
	AB	0.0778	4.12	944	25.6	2100	0.201

pH*, modificado*: pH modificado

(20/10)*, (10/5)*: Concentración en gramos por litro del medio AB/dextrosa

Para el medio AB mezclado con cebada (C/AB) se observa que el hongo actuó para modificar los parámetros del medio, a niveles ácidos de pH, sin embargo el crecimiento de la esfera no muestra un aporte significativo de biomasa.

Es notable que el cambio de pH en los medios no tuvo un aporte positivo a la degradación, como ejemplo se muestra la Figura 3.8 donde se observa el incremento de turbiedad y DQO en la muestra con modificación de pH diario. Por lo que se considera que el pH no es un parámetro que tenga que modificarse para mantenerlo a 4.5.

Figura 3.8. Apariencia de las muestras del medio AB, (izquierda) modificación de pH. (derecha) con pH modificado a 4.5 diariamente.

Algunos autores consideran el pH de 4.5 para el cultivo del *P. chrysosporium* como condición inicial para favorecer el desarrollo del crecimiento y adaptación del microorganismo, principalmente cuando el medio presenta valores de pH básicos (Michael *et al.,* 1991; Ürek y Pazarlioğlu*,* 2005; Karimi *et al.,* 2009; Pakshirajan y Kheria, 2012). A diferencia del estudio de Sharari *et al.* (2013) donde el pH no fue modificado, y conservó su valor inicial de 6 para el tratamiento de un efluente de bagazo de caña de azúcar.

De acuerdo a lo anterior y los valores iniciales de los medios evaluados, que presentan un pH entre 5 y 6, se consideró para este estudio, que no se requiere modificar el valor de pH.

En lo que respecta al análisis de azúcares, los medios AB mostraron una reducción de estos, que indica que el hongo consumió el contenido en el medio. La concentración de 20 AB/10 dextrosa g/L tuvo un consumo de azucares del 60 %, mientras que para la concentración 10 AB/5 dextrosa g/L el consumo fue de 41 % y para el medio no adicionado con dextrosa los azucares degradados corresponden al 76 %. Estos resultados confirman que el encapsulamiento del hongo no es una limitante para el consumo de azúcar, verificándose una adecuada transferencia de masa de los nutrientes hacia la esfera. En la Tabla 3.5 se presenta un comparativo de consumo de azúcar según el medio utilizado.

Tabla 3.5. Comparativa de azúcares reductores de 3 diferentes medios de cultivo en contacto con micelio inmovilizado de *P. chrysosporium* durante 8 días.

Medio	Azúcares (inicial) g/L	Azúcares (final) g/L	% de azúcares degradados	Consumo de azúcares por esfera g	% de azúcares por esfera
AB+D (20/10)	12.45	4.98	60	0.498	4
AB+D (10/5)	5.48	3.22	41	0.150	2.73
AB	0.8506	0.201	76.36	0.043	5.09

Autores como Peart *et al.* (2012), han observado que para favorecer el desarrollo del microorganismo es necesario contar con una fuente de carbono adicional, por lo que al utilizar 6 diferentes basidiomicetos, entre ellos el *P. chrysosporium*, agregan al medio sintético desde 0.5 hasta 40 g/L de glucosa.

Otro estudio realizado en aguas con color el mismo año por Pakshirajan y Kheria, obtuvo un mayor porcentaje de remoción de color (84 %) al agregar glucosa al medio en una relación de 10 g/L a diferencia del 64 % removido en el medio no adicionado de glucosa, también sugieren que puede ser utilizada la melaza en lugar de la glucosa con resultados similares.

Sin embargo es importante considerar que en la presente investigación la adición de dextrosa al medio, provoca que la inmovilización en esferas de alginato pueda sufrir de aglomeraciones, como lo muestra la Figura 3.9, donde un medio a base de melaza provoca que las esferas se aglomeren y formen aglomeraciones irregulares, en un medio adicionado con dextrosa las esferas se unen para formar aglomeraciones esféricas más grandes y un medio sin adición de dextrosa mantiene la forma de la esfera.

Figura 3.9. Apariencia del *P. chrysosporium* inmovilizado en esferas de alginato en un medio a base de melaza (izquierda), un efluente residual con adición de azúcares (centro) y un medio sin adición de azúcares (derecha).

El análisis de los diferentes medios también muestra que a pesar de que los medios AB tienen una mayor DQO y los valores más altos en los parámetros determinados, éstos son notablemente disminuidos por el contacto del hongo inmovilizado, indicando la afinidad del hongo por el medio y que los nutrientes contenidos en dicho medio son asimilables por éste. Observación que es respaldada por el análisis Carbono-Nitrógeno, que tienen una relación para el cereal a base de trigo utilizado, de 17.8 y 3.91 % respectivamente; indicando que hay alimento en el medio para el *P. chrysosporium.*

La relación carbono-nitrógeno a nivel laboratorio es considerada por la mayoría de los autores en el cultivo de los basidiomicetos (Gettemy *et al.,* 1997; Xiong *et al.,* 2008; Liang *et al.,* 2012; Sánchez-López *et al.,* 2010), sin embargo autores como Gómez-Bertel *et al.* (2008) trabajando con 3 HPB, consideraron necesario una fuente adicional de carbono y nitrógeno para el tratamiento del agua residual de la industria procesadora del cuero, al que agregaron una fuente de nitrógeno con extracto de levadura en una relación de 1 g/L y fuente de carbono en la adición de glucosa en relación de 2.5 g/L, con el fin de proporcionar un medio asimilable a los microorganismos. Además la adición nitrógeno también es considerada como una influencia en la producción de enzimas relacionadas a la lignina (Gil *et al.,* 2012). Sin embargo es importante considerar que los medios adicionados con azúcar y modificación de pH presentan mayor turbiedad, aglomeración de esferas, viscosidad del medio y al ser puestos bajo el microscopio es posible observar hifas del hongo.

Bajo estos resultados se considera que la inmovilización del *P. chrysosporium* en esferas de alginato podría resultar efectiva para tratar efluentes con características del medio AB, utilizando una sola etapa de tratamiento.

En comparación con los parámetros de DQO del efluente cervecero sin tratar, la DQO del medio AB es similar, por tanto se puede predecir que es posible el tratamiento de este efluente con *P. chrysosporium* inmovilizado. Confirmando que el medio AB sin dextrosa es adecuado para el desarrollo del hongo, y la inmovilización del mismo, no se ve afectada por el contacto con éste medio en las condiciones de prueba.

3.4 Tratamiento de agua residual a nivel laboratorio

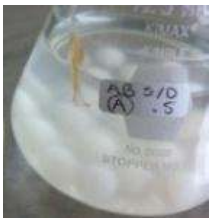
El agua residual utilizada para llevar a cabo el tratamiento a nivel laboratorio y piloto es referida al efluente sin tratar de la industria cervecera, cuyas características fueron marcadas anteriormente.

3.4.1 Determinación de la relación biomasa sustrato del efluente

En la Tabla 3.6 se presentan los resultados del tratamiento del efluente industrial utilizando diferentes cantidades de esferas con biomasa inmovilizada y su efecto sobre el aumento de biomasa producida por el hongo en la esfera en un periodo de 8 días. Se observa la estabilidad de la esfera al finalizar el tratamiento, misma que se mantiene utilizando de 10 a 20 g de esferas/L de efluente, sin embargo la biomasa producida tiende a aumentar con la cantidad de esferas.

En base a lo anterior, se concluyó que la cantidad de esferas que se puede utilizar para llevar a cabo el tratamiento del efluente, está entre 10 y 20 g/L. La clarificación del efluente también es notoria con esta cantidad de esferas, por lo que los resultados subsecuentes son referidos al uso de 10 g/L de esferas.

Tabla 3.6 Apariencia y biomasa con diferentes cantidades de esferas.

Inoculado esferas g/L	Matraz	Apariencia y estabilidad de la esfera	Biomasa obtenida total g
5			$1.545x10^{-3}$
10			$1.5\ x10^{-3}$
20			$2.16\ x10^{-3}$
30			$2.07\ x10^{-3}$
40			$2.54\ x10^{-3}$
9.69 Blanco ML			0.3448

3.4.2 Determinación de las características del efluente tratado

Recopilando los datos de los ensayos de laboratorio se observan las gráficas de las Figuras 3.10 y 3.11, donde se muestran las principales diferencias del tratamiento del efluente de la industria cervecera con 10 mL/L de biomasa libre de *P. chrysosporium,* equiparable con 10 g/L de esferas conteniendo biomasa inmovilizada.

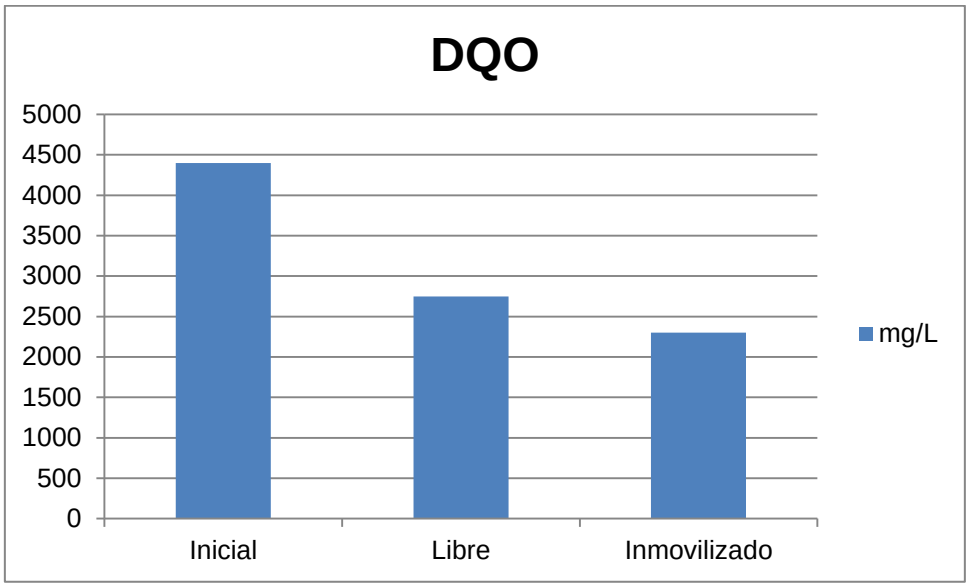


Figura 3.10. Valores de DQO para el efluente (inicial), el efluente tratado con micelio libre e inmovilizado.

Los valores de DQO se redujeron en 37 y 47 % para el hongo libre e inmovilizado respectivamente. Mientras los referidos a la turbiedad disminuyeron un 85 y 80 % en el mismo orden.

De acuerdo a la Figura 3.10, el comportamiento del DQO, indica que la inmovilización del *P. chrysosporium*, no limita su actividad para el tratamiento del efluente, donde el resultado cercano al 50% de degradación es obtenido en una sola etapa de tratamiento y es superior al obtenido por el hongo libre.

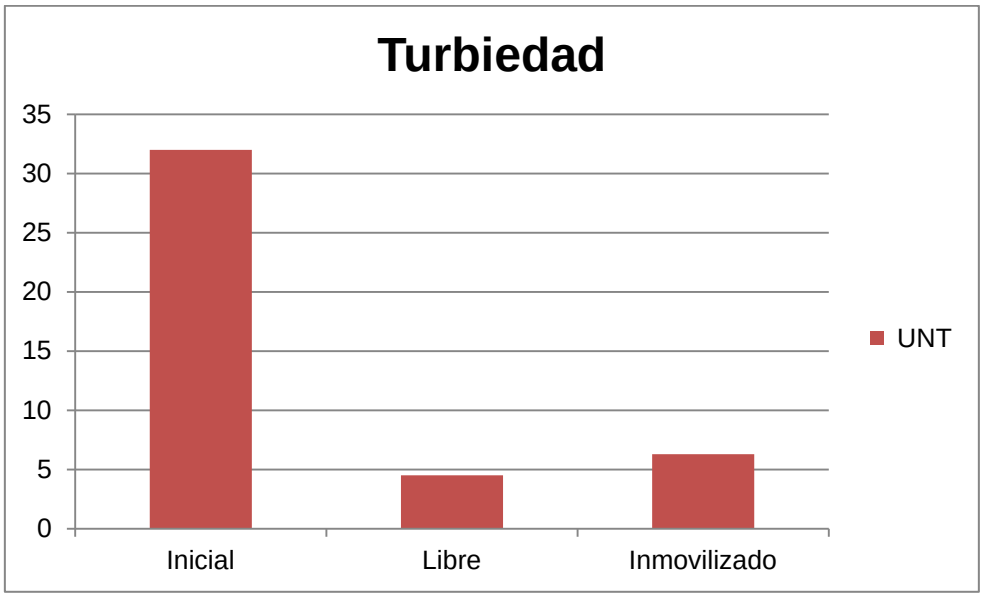


Figura 3.11. Valores de turbiedad para el efluente (inicial), el efluente tratado con micelio libre e inmovilizado.

3.4.3 Determinación de la biomasa de *P. chrysosporium*

La determinación de biomasa en el efluente con *P. chrysosporium* inoculado de forma libre obtuvo una ganancia de 12.45 veces la biomasa inicial; mientras inmovilizado solo un crecimiento del 55.42 %. Este factor de crecimiento y su capacidad de degradación observada en el apartado anterior, indica que la inmovilización permite el control del crecimiento del hongo, más no limita su capacidad de degradación y puede ser utilizado en biorreactores (Morales y Ruíz, 2008).

3.4.4 Determinación de enzimas secretadas por el *P. chrysosporium*

En la Figura 3.12 se presenta el comportamiento de producción de enzimas por un periodo de cultivo de 8 días. Donde se puede observar que la concentración

enzimática correspondiente a la MnP es mínima, y superada por la LiP mostrando valores superiores a una unidad por litro.

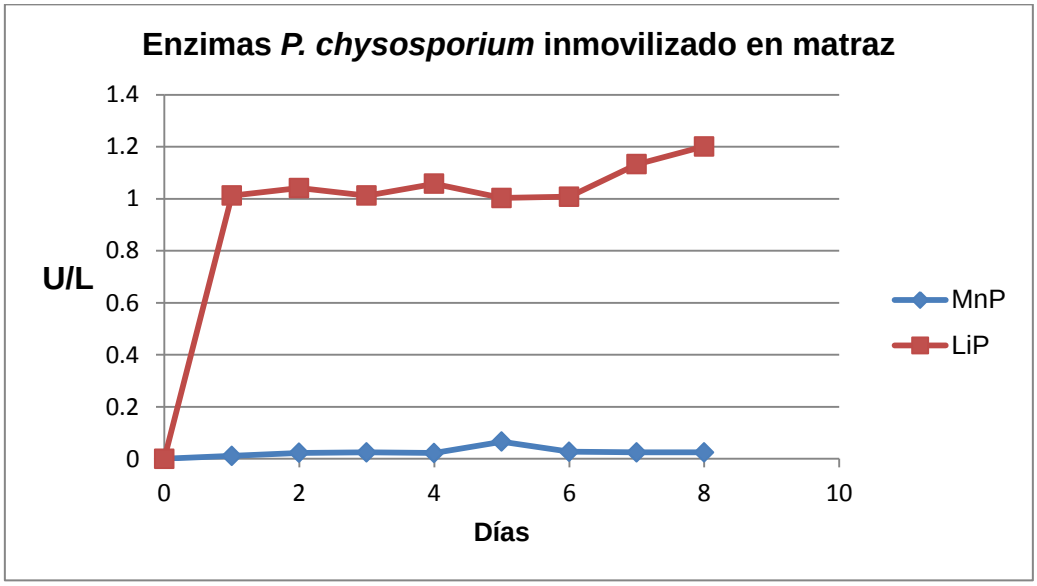


Figura 3.12. Enzimas del efluente tratado con *P. chrysosporium* inmovilizado a nivel matraz.

Los valores obtenidos se consideran congruentes con el tiempo de contacto entre el efluente y el microorganismo (Songulashvili *et al.,* 2007) y con la consideración de no tener fuentes adicionales de carbono o nitrógeno, como marcan algunos autores donde la actividad enzimática está ligada a la adición de elementos como glucosa y extracto de levadura (Gómez-Bertel *et al.,* 2008; *Gil et al.,* 2012).

3.5 Instrumentación y automatización del Biorreactor

Se logró instrumentar el biorreactor para su trabajo continuo de acuerdo a lo previsto en el punto 2.5, proporcionando un control de temperatura programable, y un flujo continuo de aire regulable, como se muestra en la Figura 3.13.

Figura 3.13. Biorreactor airlift marca SEV, modelo FAR-4.

En la Figura, se observa una jarra de vidrio con capacidad de 4 L en material templado, sobre un soporte de acero inoxidable y tapa del mismo material, alimentado con un flujo de aire de 1.5 L/min y con una camisa térmica de silicón que mantiene la temperatura a 30 ºC, misma que es sensada por un detector tipo electrodo sumergido en el efluente. En lo que respecta a los monitoreos de pH y O.D. se desarrollaron con sensores también sumergidos en el efluente.

Desde los años 90 empezó a considerarse el uso de biorreactores airlift destacando la ventaja de poder controlar la administración de oxígeno, pH y temperatura (Merchuk, 1990). Actualmente algunos de los tratamientos anaerobios-aerobios de aguas residuales utilizan en la segunda etapa los biorreactores aireados tipo airlift promoviendo arriba del 90 % la reducción de DQO y la producción de enzimas (Simate *et al.,* 2011).

3.6 Tratamiento de agua residual a nivel piloto

Los resultados presentados en este apartado son referidos a los datos obtenidos de la calidad del efluente en el tratamiento utilizando el biorreactor airlift con *P. chrysosporium* libre e inmovilizado, en experimentos individuales.

3.6.1 Evaluación de las características del efluente residual con micelio libre

En la Tabla 3.7, se presenta un seguimiento de los parámetros de calidad del efluente por efecto del tratamiento, se observa que la DQO se mantuvo, en los primeros días del tratamiento, presentándose una reducción para el octavo día de un 63 %. La disminución de azúcares reductores fue de 85 %, mientras la turbiedad disminuyó un 46 % y la conductividad solo un 10 %.

Entre los resultados que destacan del tratamiento del efluente con biomasa libre en el biorreactor se encuentra la cinética del comportamiento diario de la reducción de DQO (Figura 3.14). En este caso, es observable que los primeros tres días no hubo cambio, y en los subsecuentes, la reducción fue notoria, alcanzando una reducción del 63 %, que en comparación con el tratamiento en matraz fue mayor, por lo que se establece que el biorreactor mejora los resultados del efluente. A su vez este porcentaje de reducción de DQO fue mayor en un 2 % comparado con el que se obtiene en el tratamiento del efluente en la PTAR, utilizando en este trabajo una sola etapa de tratamiento, referida exclusivamente a un proceso aerobio con *P. chrysosporium*, con lo cual se cumple la hipótesis establecida.

Tabla 3.7. Calidad del efluente del reactor utilizando biomasa libre de *P. chrysosporium*.

Día	pH	Conductividad µS/cm	Turbiedad NTU	DQO mg/L	Azúcares g/L	OD %
0	5.2	404	32	4400	0.850	81
1	5.23	404	29.2	4400	0.754	80
2	5.62	404	26.8	4400	0.710	80
3	6.5	404	22	4000	0.625	65
4	6.25	362	22	3400	0.600	62.5
5	5.88	362	23.3	2200	0.480	64.5
6	6.38	362	19	2100	0.325	76
7	6.08	362	17	1900	0.190	72
8	5.8	362	17	1600	0.123	68

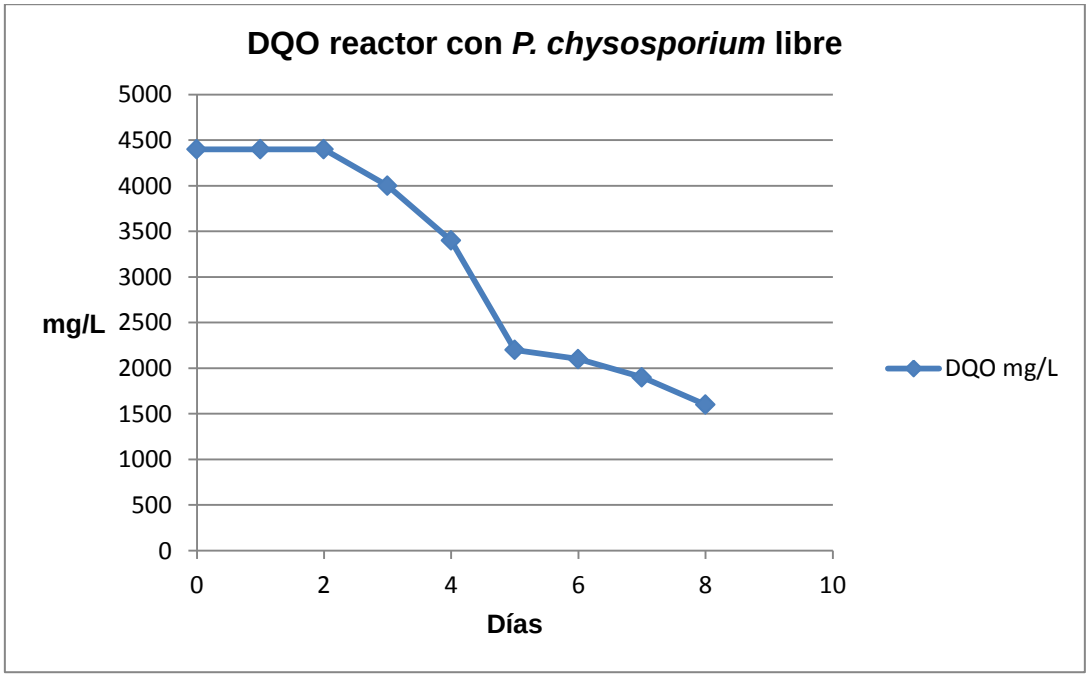


Figura 3.14. Comportamiento del DQO en reactor con micelio libre.

Respecto a los azúcares reductores y proteínas, sus concentraciones fueron disminuidas en gran cantidad. Con respecto a los azúcares, éstos reportaron una reducción del 85 % de azúcares reductores y las proteínas un 70 % al finalizar el periodo de tratamiento. En la Figura 3.15 se muestra la cinética de degradación de proteínas.

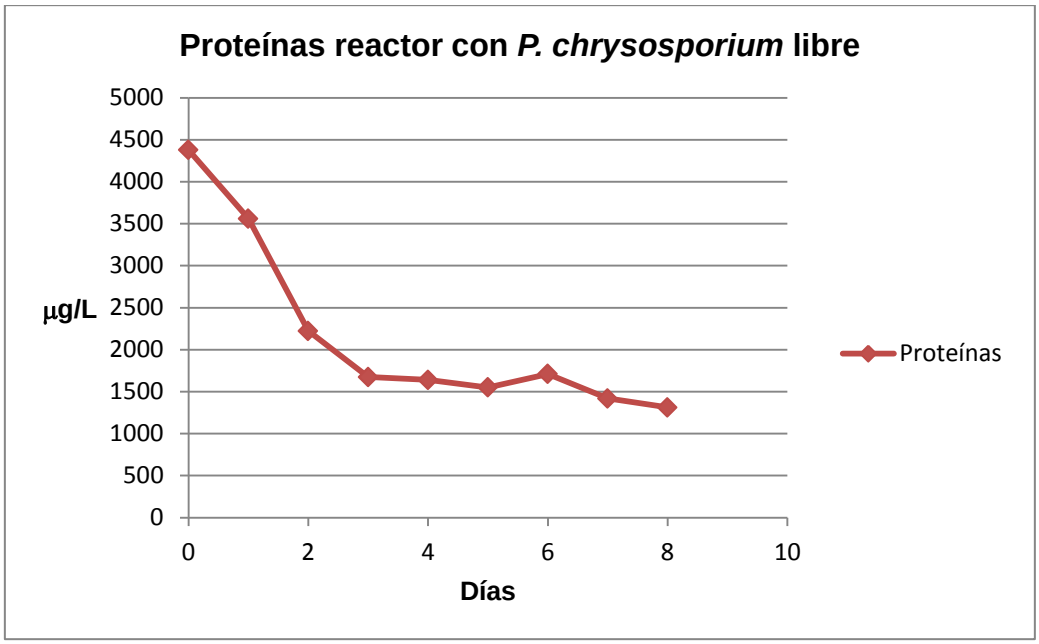


Figura 3.15. Proteínas del efluente del reactor con micelio libre.

En la Figura 3.16, se muestra la cinética de producción de enzimas, donde se distingue que la mayor producción se presentó aproximadamente al tercer día, lo cual coincide con el inicio de la reducción de la DQO y podría asociarse a este evento. En la cinética también se encontró que la LiP secretada fue mayor que la MnP. Este resultado se puede atribuir al cizallamiento del micelio que tiene lugar en el reactor debido a la agitación.

Sin embargo, otros estudios como los de Bonnarme *et al.* (1993); Zamatkesh *et al.* (2010); Sharari *et al,* (2013), también muestran un poco producción de enzimas,

indicando que el hongo secreta las enzimas suficientes para la degradación de los componentes del medio, siendo congruente con el comportamiento del *P. chrysosporium* en el efluente.

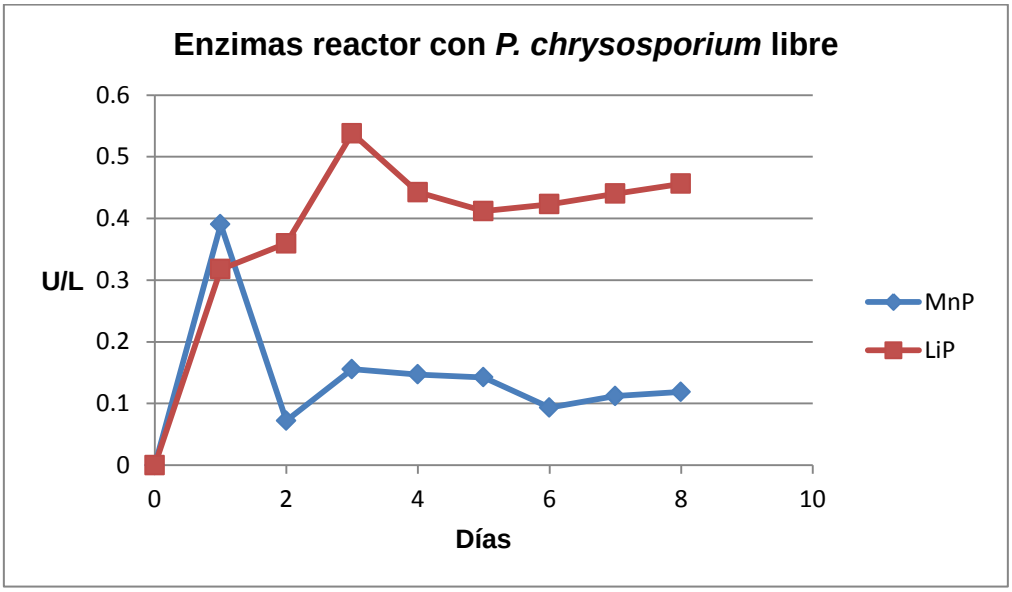


Figura 3.16. Enzimas del efluente del reactor con micelio libre.

En lo que respecta a la biomasa producida, el tratamiento en el biorreactor originó un aumento de biomasa en 12 veces más en comparación con el inicial, encontrando un valor de 120 mL/L, (equivalente a 1.74 g de biomasa seca), superando las expectativas de crecimiento, sin embargo se generaron aglomeraciones de micelio sobre las paredes y en el fondo del reactor, impidiendo el paso libre de aire en el difusor.

En la Figura 3.17 se presentan cuatro cajas de Petri donde se distingue la abundante biomasa recolectada del biorreactor una vez finalizados los 8 días de tratamiento del efluente.

Figura 3.17. Biomasa obtenida al finalizar el tratamiento del efluente con el biorreactor airlift con *P. chrysosporium* libre.

En los trabajos desarrollados con reactores airlift, Assadi *et al.* (2001) utilizaron el *P. chrysosporium* en estado libre logrando una remoción de color en aguas textiles del 98 %, controlando la temperatura a 35 ºC, mientras Wang *et al.* (2011) utilizaron *Pseudomonas putida* libre, consideraron el flujo de aire, pero sin controlar la temperatura, para la degradación de tolueno. En estos trabajos se concluyó que el tipo de movimiento de aire que posees estos biorreactores ayudan a eficientizar el proceso de tratamiento de contaminantes

3.6.2 Evaluación de las características del efluente residual con micelio inmovilizado

La Tabla 3.8, muestra los valores de los parámetros obtenidos por día de tratamiento del efluente del biorreactor. Se observa que la DQO tuvo, una degradación constante y finalizó al último día con un valor reducido en 70 %, se observa también un decremento de conductividad de 34 % y azúcares en un 71 %, mientras la turbiedad no presentó reducción, sino un ligero incremento del 6 %, esto último puede ser atribuible al cizallamiento de las esferas de alginato.

Particularmente la Figura 3.18 muestra, el comportamiento del DQO durante los 8 días de tratamiento del efluente, el cual fue degradado paulatinamente llegando al 70 % de degradación.

La Figura 3.19, considera los valores de proteínas, con un valor inicial de proteínas del efluente de 4378 μg/L, y muestra una reducción al finalizar el tratamiento del 50 %, observando la degradación en el efluente.

Al realizar una comparativa de estas 2 últimas figuras se observa que existe una congruencia en relación de degradación de DQO y disminución de proteínas, donde ambas bajan sus valores con respecto al tiempo de contacto con el hongo; esto resulta similar a la ocurrido en el estudio de Zahmatkesh *et al.* (2010), donde la disminución de la coloración corresponde de manera directa a la disminución de glucosa en el medio a tratar.

Tabla 3.8. Calidad del efluente del reactor utilizando *P. chrysosporium* inmovilizado.

Día	pH	Conductividad μS/cm	Turbiedad UNT	DQO mg/L	Azúcares g/L	OD %
0	5.5	1438	122.5	4400	0.9207	82
1	5.6	915	127	4300	0.890	82
2	6.2	929	135	3760	0.815	76
3	6.3	953	150	3100	0.633	76
4	6.0	951	138	2880	0.576	72
5	6.5	940	125	2560	0.490	70
6	6.2	936	130	2220	0.350	72
7	5.9	951	125	2220	0.306	75
8	6.1	952	130	1320	0.264	71

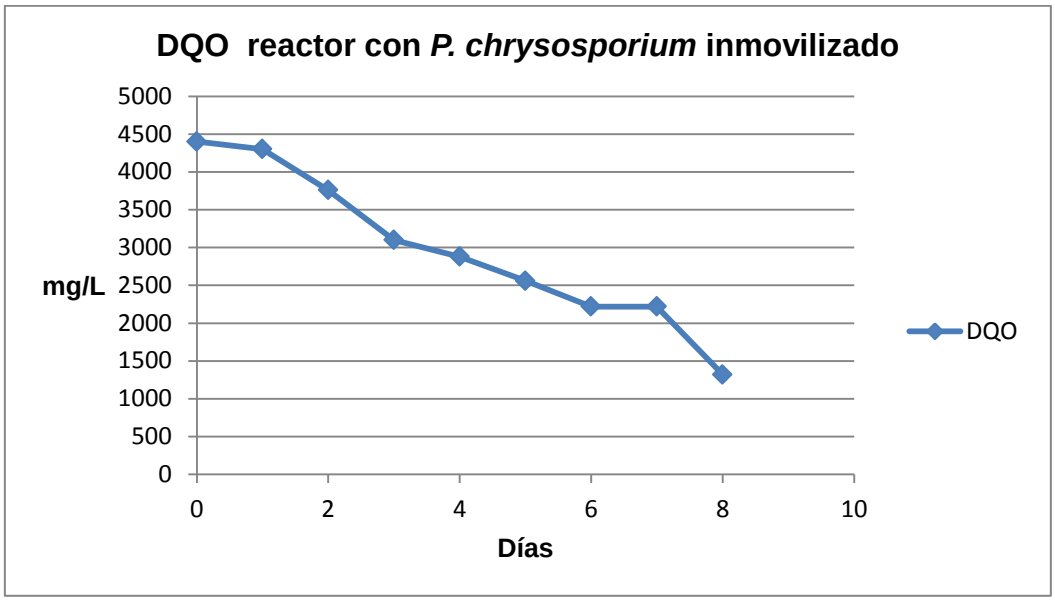


Figura 3.18. Comportamiento del DQO en reactor con micelio inmovilizado.

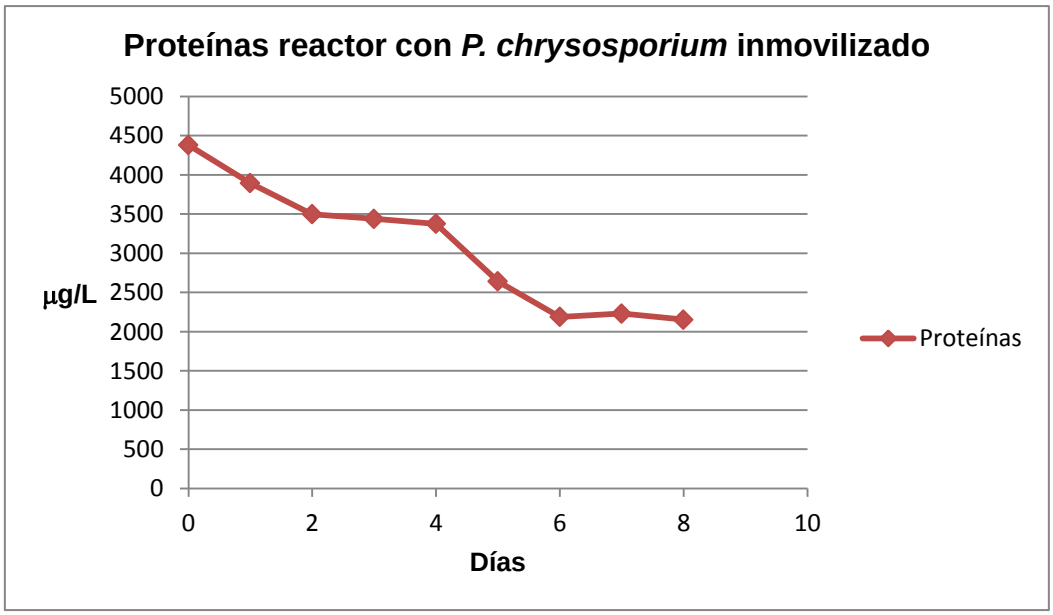


Figura 3.19 Proteínas en el efluente del reactor con micelio inmovilizado.

Haciendo una comparativa de los resultados obtenidos en el reactor con el micelio libre y el hongo inmovilizado, encontramos que la degradación de DQO es más consistente cuando el microorganismo se encuentra inmovilizado, sin embargo el consumo de proteínas es mayor en su estado libre.

La evaluación de enzimas del *P. chrysosporium* inmovilizado se muestran en la Figura 3.20.

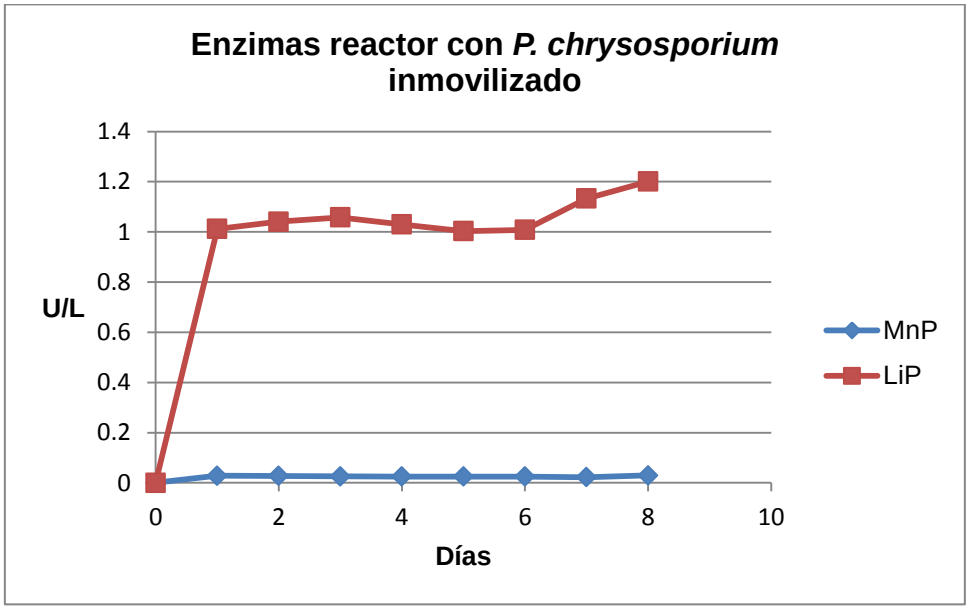


Figura 3.20. Enzimas del efluente del reactor

Los valores obtenidos en las enzimas indicó una presencia baja de las peroxidasas, lo que puede indicar que la fuente de nitrógeno requiere elevación, pues esta es la que promueve su producción (Ruiz Dueñas 1998; Gil *et al.,* 2012) También se destaca que en ambos casos de tratamiento con micelio libre e inmovilizado, la LiP es secretada en mayor cantidad en comparación con la MnP. Este comportamiento es similar a los resultados, de Gómez-Bertel *et al.* (2008), el cual atribuye al medio y al movimiento del micelio debido a la agitación, ya que en fermentaciones sólidas, se alcanzan mayores niveles de secreción de MnP (Quintero *et al.,* 2006; Fenice *et al.*, 2003; Sharari *et al.*, 2013). Es importante señalar que en la producción de enzimas es de considerase como factor la agitación que sufre el microorganismo, pues tiende a afectar su metabolismo, además otros factores como el medio de cultivo y las condiciones de crecimiento, también afectan dicha producción, por lo que es difícil asociar este resultado (Jímenez-Tobon *et al.,* 1997).

En el comparativo del análisis del comportamiento de la producción de enzimas en micelio inmovilizado y libre (Figura 3.21), se observa a la enzima LiP en concentración mayor en estado inmovilizado, a diferencia de la MnP cuya concentración fue mayor en estado libre.

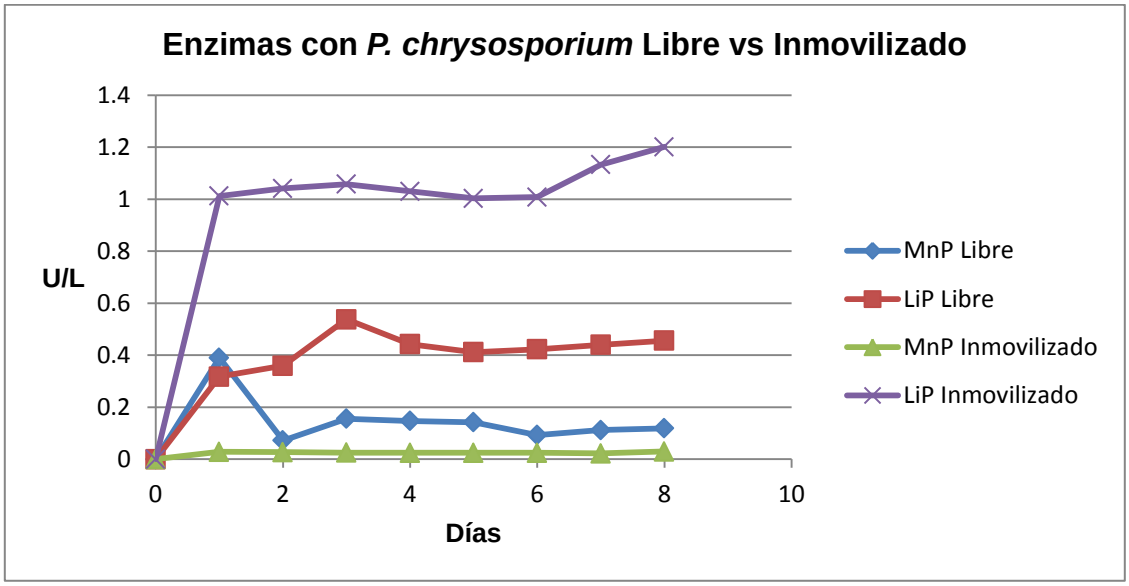


Figura 3.21. Comparativa de enzimas en el efluente del reactor con micelio libre e inmovilizado.

Los resultados anteriores pueden indicar que aún la transferencia de masa en la esfera es limitante. Las enzimas pueden haberse producido, sin embargo no secretadas de manera adecuada en el medio debido al encapsulado, por lo que es necesario continuar trabajando con la búsqueda de otros materiales para el encapsulado del micelio, que provean suficiente porosidad a la esfera.

Finalmente el parámetro evaluado de la biomasa obtenida del tratamiento del efluente con *P. chrysosporium* inmovilizado se muestra la Tabla 3.9 donde se observa que la biomasa solo se incrementó 4 veces de la inicial obteniendo 0.5728 g.

Este resultado también puede indicar una limitante en el desarrollo del micelio, por lo que se hace hincapié nuevamente en la necesidad de mejorar el material de encapsulamiento.

Por otro lado, esta necesidad se hace patente, debido a que en este trabajo fue imposible recuperar las esferas para utilizarlas en otros tratamientos, debido al reblandecimiento de la esfera por su permanencia en el agua por largos periodos de tiempo y en contacto con aguas residuales que contienen una alta DQO, como fue este el caso.

Tabla 3.9 Biomasa del *P. chrysosporium* inmovilizada obtenida al finalizar el tratamiento del efluente con el reactor airlift.

Inoculado	Biomasa	Biomasa obtenida total g
Esferas de alginato 10 g/L		0.5728

Los trabajos desarrollados con micelio inmovilizado y realizados en un biorreactor airlift están enfocados a la degradación de color en medios líquidos, por su parte Domínguez *et al.* (2005), lograron un promedio del 80 % de remoción de coloren aguas sintéticas inmovilizando en alginato *Trametes hirsuta* y controlando la temperatura a 30 ºC y el flujo de aire en 1 L/min, mientras González, (2012) removió en un 98% el azul de remazol en aguas sintéticas con *P. chrysosporium* inmovilizado en alginato, a una temperatura de 37 ºC y un flujo continuo de 2.5 L/s. Sin embargo en estos trabajos, no se hace referencia al reuso de la esfera.

En la búsqueda de compositos a base de nuevos materiales, en el trabajo de Xu *et al*. (2006), se preparó una esfera de alginato con sílica que pudo reutilizarse hasta 4 veces para el mismo fin, sin embargo, se trata del contacto de una esfera con una solución que no corresponde a el tratamiento de un efluente, por lo que su composición es más sencilla. Por otro lado, la adición de sílica al alginato, tuvo como objetivo la disminución del tamaño de poro, debido a que se inmovilizó una enzima, lo cual no es aplicable a esta investigación.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La esfera que proporcionó mayor estabilidad y características morfológicas fue una de 4 mm de diámetro, en la que se utilizó una concentración de 3.5 % de alginato de sodio y de 30 % de cloruro de calcio, y un 5 % p/v de $CaCO_3$, para su preparación, este último componente, causante del aumento el volumen de poro en la esfera, lo cual le brindó porosidad permitiendo el desarrollo del micelio del hongo y una mayor capacidad para el consumo de nutrientes del medio. Tanto el alginato como componente base y el entrecruzante (cloruro de calcio) promovieron la formación y estabilidad de la esfera.

Los ensayos previos realizados en diferentes medios de cultivo utilizando las esferas con micelio inmovilizado indicaron que las características de la esfera son propicias para la conducción de nutrientes y que un medio semejante al efluente no obstruye la porosidad de la esfera. Asegurando el crecimiento del micelio encapsulado en la esfera. Por otro lado, en estos ensayos también se mostró que no es posible adicionar al medio azúcares en forma de dextrosa, ya que se tiende a la unión y aglomeración de las esferas.

El efluente proveniente de la industria cervecera, presentó una carga orgánica elevada con valores de DQO alrededor de 4400 mg/L, así como contenido de azúcares y proteínas, fuentes de carbono y nitrógeno; estas características fueron suficientes para que el *P. chrysosporium* se desarrollara con gran afinidad por los sustratos.

En las pruebas referidas a la cantidad de esferas por litro capaces de llevar a cabo un tratamiento efectivo del efluente, se encontró que la adición de esferas en un intervalo de 10 a 20 g/L, obtiene una remoción efectiva en una sola etapa de tratamiento.

El uso del biorreactor airlift en su primera etapa con contenido de micelio libre en relación 10 g/L, demostró que puede ser utilizado para el tratamiento del efluente con una remoción de hasta un 63 % de DQO en una sola etapa.

Mientras la segunda fase con el *P. chrysosporium* inmovilizado en esferas de alginato reflejó un rendimiento del 70 %, ambos resultados son muy cercanos a la remoción en una PTAR, por lo que se considera un resultado aceptable. Esta fase también mostró resultados que requieren de mejoras, tal es el caso del incremento de la turbiedad, que es atribuido a la resistencia del alginato y al cizallamiento que sufre en el biorreactor, y no permite su reuso para el tratamiento del efluente, por lo que se recomienda mejorar la inmovilización para su uso en medios líquidos por periodos de tiempo largos.

Actualmente los trabajos publicados para el biotratamiento de las aguas residuales de la industria cervecera utilizando microorganismos, son pocos y aún se tiene un campo de aplicación viable como muestran los resultados descritos anteriormente; se requiere continuar evaluando materiales de inmovilización, así como las condiciones de alimentación de aire en relación flujo y capacidad enzimática del hongo.

REFERENCIAS

Abdolali A., Guo W. S., Ngo H. H., Chen S. S., Nguyen N. C., Tung K. L. 2014. Typical lignocellulosic wastes and by-products for biosorption process in water and wastewater treatment: A critical review. Bioresource technology 160, 57-66.

AB-InBev, 2013. 2013 Annual Report. 4. Último acceso: 15 junio de 2014. Disponible en http://www.ab-inbev.com/go/media/annual_report_2013

Arıca M.Y., Arpa C., Ergene A., Bayramoglu G., Genc Ö. 2003. Ca-alginate as a support for Pb(II) and Zn(II) biosorption with immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. Carbohydrate Polymers 52 (2), 167–174

Arora D. S., Chander M., Gill P. K. 2002. Involvement of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase in degradation and selective ligninolysis of wheat straw. International Biodeterioration & Biodegradation 50 (2), 115-120

Arroyo M. 1998. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. Ars. Pharmaceutica 39 (2), 23-39

Assadi M. M., Rostami K., Shahvali, M., Azin M. 2001. Decolorization of textile wastewater by *Phanerochaete chrysosporium*. Desalination 141 (3), 331-336

Avendaño-Romero G.C., López A., Palou E. 2013. Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. Temas selectos de ingeniería de alimentos 7 (1), 87-96

Badui D. S. 2006. Química de los alimentos. Editor Pearson Addison Wesley.79, 107

Behera M., Jana P.S., More T.T., Ghangrekar M.M. 2010. Rice mill wastewater treatment in microbial fuel cells fabricated using proton exchange membrane and earthen pot at different pH. Bioelectrochemestry 79, 228-233

Behnood M., Nasernejad B., Nikazar M. 2013. Biodegradation of crude oil from saline wastewater using white rot fungus *Phanerochaete chrysosoporium*. Journal of Industrial and Engineering Chemestry, 7pages

Bonnarme P., Jeffries T.W. 1990. Selective production of extracellular peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium* in an Airlift bioreactor. Journal of Fermentation and Bioengineering 70 (3), 158-163.

Bo Jin, Qyu., Van Leeuwen J. 2001 Fungal biomass protein production and wastewater treatment using an external air-lift bioreactor Journal of Chemical Technology and Biotechnology 76 (10) 1041-1048

Çeribasi I. H., Yetis U. 2001. Biosorption of Ni (II) and Pb (II) by *Phanerochaete chrysosporium* from a binary metal system–kinetics. Water SA 27 (1), 15-20

Cerrone F., Barghini P., Pesciaroli C., Fenice M. 2011 Efficient removal of pollutants from olive washing wastewater in bubble-column bioreactor by *Trametes versicolor.* Chemosphere 84, 254-259

Chen G. 2004. Electrochemical technologies in wastewater treatment. Separation and Purification Technology 38 (1), 11-41.

Chen G. Q., Zhang W. J., Zeng G. M., Huang J. H., Wang L., Shen G. L. 2011. Surface-modified *Phanerochaete chrysosporium* as a biosorbent for Cr (VI)-contaminated wastewater. Journal of hazardous materials 186 (2), 2138-2143.

Chisti Y., Moo-Young M. 1993. Improve the performance of airlift reactors. Reaction Engineering Progress 89 (6), 38-45.

Chmiel H., Kaschek M., Blöcher C., Noronha M., Mavrov V. 2002. Concepts for the treatment of spent process water in the food and beverage industries. Desalination 152, 307-314

Comisión Nacional del Agua. 2009. Inventario nacional de plantas municipales de potabilización y de tratamiento de aguas residuales en operación. 86. Último acceso: 15 junio de 2014. Disponible en http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Noticias/Inventario%20nacional%20de%20plantas%20municipales%202009.pdf

Comisión Nacional del Agua. 2011. Estadísticas del agua en México. 122. Último acceso: 15 junio de 2014. Disponible en http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Publicaciones/Publicaciones/SGP-1-11-EAM2011.PDF

Coulibaly L. Gourene G. Agathos N.S. 2003. Utilization of fungi for biotreatment of raw wastewaters. African Journal of Biotechnology 2 (12), 620-630

Dávila G., Vazquez-Duhalt. 2006. Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. Mensaje bioquímico XXX, 29-36

De-Bashan L.E., Bashan Y. 2010. Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. Bioresource Technology 10, 1611–1627

Devi R., Singh V., Kumar A. 2007. COD and BOD reduction from coffee processing wastewater using Avacado peel carbon. Bioresource Technology 99, 1853-1860

Domínguez A., Couto S. R., Sanromán M. Á. 2005. Dye decolorization by Trametes hirsuta immobilized into alginate beads. World Journal of Microbiology and Biotechnology 21 (4), 405-409

Fajardo-Ochoa R., Osuna-Castro J.A., Velázquez –Mendoza C.V., Escalante-Minakata P. Ibarra-Junquera V. 2011. Inmovilización de células y enzimas. Revista cientifica de la Universidad Autonoma de Coahuila 3 (6), 42-56

Fang D., Zhou L. 2007.Enhanced Cr bioleaching efficiency from tannery sludge with coinoculation of *Acidithiobacillus thiooxidans* TS6 and *Brettanomyces* B65 in an air-lift reactor. Chemosphere 69, 303-310

Fenice M., Giovannozzi S. G., Federici F., D'Annibale A. 2003. Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media. Journal of biotechnology 100 (1), 77-85

Feng Y., Wang X., Logan B.E., Lee H. 2008. Brewery wastewater treatment using air-cathode microbial fuel cells. Environmental Biotechnology 78, 873-880

Fernández J. A., Henao L. M., Pedroza-Rodríguez A. M., & Quevedo-Hidalgo B. 2009. Inmovilización de hongos ligninolíticos para la remoción del colorante negro reactivo 5. Revista Colombiana de Biotecnología 11 (1), 59-72

García Torres y Torres Sáe Y. 2003. Producción de enzimas lignolíticas por *Basidiomycetes* mediante la técnica de fermentación en sustrato sólido. Revista colombiana de biotecnología V (1), 56-64

Garzón-Jiménez C., Barragán-Huerta B.E. 2008. Inmovilización microbiana: Técnicas y usos en el tratamiento de residuos tóxicos. Sistemas Ambientales 2 (1), 23-34

Gentry T., Rensing C., Pepper I. 2004. New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. Critical Reviews in Environmental Science and Technology 34 (5), 447-494

Gettemy J. M., Li D., Alic M., Gold M. H. 1997. Truncated-gene reporter system for studying the regulation of manganese peroxidase expression. Current genetics 31 (6), 519-524

Ghorai S., Banik S.P., Verma D.,Chowdhury S., Mukherjee S., Khowala S. 2009. Fungal biotechnology in food and feed processing. Food Research International 42, 577-587

Gil l. M., Manjarres-Pinzon K., Piñeros-Castro Y., Rodríguez-Sandoval E. 2012. Influencia de la adición de una fuente de Nitrógeno en la producción de ligninasas. Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial 10 (1), 173-181

Gold M., Alic M. 1993. Molecular Biology of the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium.* Microbiological Reviews 57 (3), 605-622

Gomathi., Cibichakravarthy V., Ramanathan B., Sivaramaiah N. A., Ramanjaneya V., Mula R., Rayalu J. 2012. Decolourization of paper mill effluent by immobilized cells of *Phanerochaete chrysosporium.* International Journal of plant, animal and environmental sciencies 2 (1), 141-146

Gómez-Bertel S., Amaya-Bulla D., Maldonado-Saavedra C., Martínez-Salgado M., Quevedo-Hidalgo B., Soto-Guzmán A. B., Pedroza-Rodríguez A. M. 2008. Evaluación de tres hongos lignolíticos y de *Aspergillus niger* como alternativa para el tratamiento de aguas residuales del curtido de pieles. Revista internacional de contaminación ambiental 24 (3), 93-106

González D. 2012. Determinación de la capacidad de decoloración del azul índigo y azul ramazol brillante R por el hongo *Phanerochaete chrysosporium* en

diferentes condiciones de crecimiento. Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Ambiental. Instituto Tecnológico de Toluca

Grupo Modelo. 2014. Último acceso 15 de junio de 2014. Disponible en: www.gmodelo.mx/produccionelaboracion.jsp

Guimarães C., Porto P., Oliveira R., Mota M. 2003. Continuous decolourization of a sugar refinery wastewater in a modified rotating biological contactor with *Phanerochaete chrysosporium immobilized on polyurethane foam disks*. Procces Biochemistry 40, 535-540

Güven G., Perendeci A., Tanyolaç. 2009. Electrochemical Treatment of simulated beet sugar factory wastewater. Chemical Engineering Journal 151, 149-159

Guzel-Seydim Z.B., Greene A. K., Seydim A.C. 2004. Use of ozone in the food industry. Food Science and Technology 37 (4), 453–460

Harms H., Schlosser D., Wick L. Y. 2011. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. Microbiology 9, 177-192

He Y., Xu P., Li C., Zhang B. 2005. High-concentration food wastewater treatment by an anaerobic membrane bioreactor. Water Research 39, 4110-4118

Hernández F., Hernández B. 1996. Disposición final de los lodos de la planta de tratamiento de aguas residuales de la cervecería Cuauhtémoc Moctezuma. Tesis profesional para obtención de titulo Ingeniero Ecólogo Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla

Hoekstra A.Y., Chapagain A.K. 2007. Water footprints of nations: Water use by people as a function of their consumption pattern. Water Resour Manage 21, 35-48

Hwang S. C. J., Lin Y. H., Huang K. S., Lyuu J. Y., Hou C. T., Chen H. H., He S. Y. 2012. Treatment of acetone waste gases using slurry-phase airlift embedded with polyacrylamide-entrapped cell beads. Journal of the Air & Waste Management Association 59 (10), 1230-1238

INEGI. El sector alimentario en México 2012. 238. Último acceso: 15 de junio de 2014. Disponible en

http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/sociodemografico/SAM/2012/sam2012.pdf

IMTA. Agua para producción de alimentos 2010. Último acceso: 15 de junio de 2014. Disponible en http://www.imta.gob.mx/index.php?Itemid=106&catid=52:enciclopedia-del-agua&id=180:agua-para-produccion-de-alimentos&option=com_content&view=article

Ingraham J.L., Ingraham C.A., Prentiss H. 1998. Introducción a la microbiología Vol 1. Editor Reverte. 274-282.

Jiménez-Tobon G A., Penninckx M J., Lejeune R. 1997. The relationship between pellet size and production of Mn(II) peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium* in submerged culture. Enzyme and Microbial Technology 21, 537-542.

Kaçar Y., Arpa Ç., Tan S., Denizli A., Genç Ô. Arica M.Y. 2002. Biosorption of Hg(II) and Cd(II) from aqueous solutions: comparison of biosorptive capacity of alginate and immobilized live and heat inactive *Phanerochaete chrysosporium*. Process Biochemistry 37, 601-610

Karimi A., Vahabzadeh F., Mohseni M., Mehranian M. 2009. Decolorization of Maxilon-Red by Kissiris Immobilized *Phanerochaete Chrysosporium* in a Trickle-Bed Bioreactor-Involvement of Ligninolytic Enzymes. Iran. J. Chem. Chem. Eng 28 (2), 1-13

Kassab SZ., Kandil H A., Warda H A., Ahmed W H. 2009. Air-lift pups characteristics under two phases flow conditions. International Journal of Heat and Fluid Flow 30, 88-98.

Kulkarni GT., Vijayan P. 2011. Evaluation of selected natural hydrogels as entrapping materials for enzyme immobilization. Journal of Chronotherapy and Drug delivery 2 (3), 107-112.

Lefebvre O., Moletta R. 2006. Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: A literature review. Water Research 40, 3671-3682

Levin M., Gealt M. A. 1997. Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos. Editor Mc. Graw Hill. 21-33

Liang H., Gao D. W., Zeng Y. G. 2012. Effects of phosphorus concentration on the growth and enzyme production of *Phanerochaete chrysosporium*. Bioresource technology 107, 535-538

López P., Prieto F., Gaytán M., Román A.D. 2007. Chemical and physical characterization of different barley varieties produced in the center region of Mexico. Revista chilena de nutrición 32 (1)

Magan, N., Fragoeiro, S., Bastos, C., 2010. Environmental Factors and Bioremediation of Xenobiotics Using White Rot Fungi. Microbiology 38(4), 238-248

Martín Moreno C., González Becerra A., Blanco Santos M.J. 2004. Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. Revista Iberoamericana de Micología 21, 103-120

Martínez-Trujillo M.A., García-Rivero M., 2012. Revisión: Aplicaciones ambientales de microorganismos inmovilizados. Revista Mexicana de Ingeniería Química 11 (1), 55-73

Merchuk J.C. 1990. Why use air-lift bioreactors? Trends by technology 8 (3), 66-71

Michel F. C., Dass S. B., Grulke E. A., Reddy C. A. 1991. Role of manganese peroxidases and lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of kraft bleach plant effluent. Applied and environmental microbiology 57 (8), 2368-2375

Mielgo I., Moreira M.T.., Feijoo G., Lema J.M. 2002. Biodegradation of a polymeric dye in a pilsed bed bioreactor by immobilesed *Phanerochaete chrysosporium*. Water Research 36, 1896-1901.

Milivojevic M., Pavlou S., Pajic-Lijakovic I., Bugarski B. 2007. Dependence of slip velocity on operation parameters of air-lift bioreactors. Chemical Engineering Journal 132, 117-123

Morales D., Ruiz K. 2008. Determinación de la capacidad de remoción de Cadmio, Plomo y Níquel por Hongos de la podredumbre blanca inmovilizados. Tesis profesional para obtener el título de Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias, 139

Morales-Fonseca D., Ruiz-Tovar K., Martínez-Salgado M. M., Soto-Guzmán A. B., Falcony-Guajardo C., Rodríguez V. R., Pedroza-Rodríguez A. M. 2010. Desarrollo de un bioadsorbente laminar con *Phanerochaete chrysosporium* hipertolerante al cadmio, al níquel y al plomo para el tratamiento de aguas. Revista iberoamericana de Micología 27 (3), 111-118

Mullai P., Vishali S. 2007. Biodegradation of penicillin-G wastewater using *Phanerochate chrysosporium* – An equilibrium and kinetic modeling. African Journal of Biotechnology 6 (12), 1450-1454

Muro C., Escobar J., Zavala R.E., Esparza M., Castellanos J., Gómez R.M., García M. 2009. Evaluación del proceso de microfiltración en un efluente residual de una industria alimenticia para su reuso. Rev. Int. Contam. Ambient 25 (4), 229-238

Muro C., Riera F., Díaz M.C. 2012. Food Industrial Processes. Membrane separation process in wastewater treatment of food industry. Intech. 152

Nitayavardhana S., Issarapayup K., Pasavant P., Khanal S K. 2013. Production of protein-rich fungal biomass in an airlift bioreactor using vinasse as substrate. Bioresource Technology 133, 301-306

NMX-AA-007-SCFI-2000 ANÁLISIS DE AGUA - DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA EN AGUAS NATURALES, RESIDUALES Y RESIDUALES TRATADAS - MÉTODO DE PRUEBA. Secretaria de Comercio y Fomento Industrial. Último acceso: 15 de junio de 2014. Disponible en http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/agenda/DOFsr/NMX-AA-007-SCFI-2000.pdf Diario Oficial de la Federación 18 de diciembre de 2000

NMX-AA-008-SCFI-2011 ANÁLISIS DE AGUA.- DETERMINACIÓN DEL pH.- MÉTODO DE PRUEBA. Secretaria de Economía. Último acceso: 15 de junio

de 2014. Disponible en http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/agenda/PPD1/DO2650.pdf Diario Oficial de la Federación 5 de octubre de 2011

NMX-AA-030-SCFI-2001 ANÁLISIS DE AGUA – DETERMINACIÓN DE LA DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO EN AGUAS NATURALES, RESIDUALES Y RESIDUALES TRATADAS - MÉTODO DE PRUEBA. Secretaria Comercio y Fomento Industrial. Último acceso: 15 de junio de 2014. Disponible en http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/agenda/DOFsr/NMX-AA-030-SCFI-2001.pdf Diario Oficial de la Federación 17 de Abril de 2001

NMX-AA-038-SCFI-2001 ANÁLISIS DE AGUA - DETERMINACIÓN DE TURBIEDAD EN AGUAS NATURALES, RESIDUALES Y RESIDUALES TRATADAS - MÉTODO DE PRUEBA. Secretaria Comercio y Fomento Industrial. Último acceso: 15 de junio de 2014. Disponible en http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/agenda/DOFsr/NMX-AA-038-SCFI-2001.pdf Diario Oficial de la Federación 1 de Agosto de 2001

NMX-AA-093-SCFI-2000 ANÁLISIS DE AGUA - DETERMINACIÓN DE CONDUCTIVIDAD ELECTROLITICA - MÉTODO DE PRUEBA. Secretaria Comercio y Fomento Industrial. Último acceso: 15 de junio de 2014. Disponible en http://es.scribd.com/doc/73971629/NMX-AA-093-SCFI-2000 Diario Oficial de la Federación 2000

NOM-002-SEMARNAT-1996 LIMITES MAXIMOS PERMISIBLES DE CONTAMINANTES EN LAS DESARGAS DE AGUAS RESIDUALES A LOS SISTEMAS DE ALCANTARILLADO URBANO O MUNICIPAL. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Último acceso: 15 de junio de 2014. Disponible en http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-426-1982.PDF

Ollikka P., Alhonmäki K., Leppänen V., Glumoff T., Raijola T., Suominen I. 1993. Decolorization of Azo, Tripphenyl Methane, Heterocyclic, and Polymeric Dyes by Lignin Peroxidase Isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and environmental microbiology 59 (12), 4010-4016

Orth A., Denny M., Tien M. 1991. Overproduction of Lignin-Degrading Enzymes by an Isolate of *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and environmental microbiology 57 (9), 2591-2596

Pakshirajan K., Kheria S. 2012. Continuous treatment of coloured industry wastewater using immobilized *Phanerochaete chrysosporium* in a rotating biological contactor reactor. Journal of environmental management 101, 118-123

Papadakis N.G., Georgianos P.I., Tsoumbaris P.D. 2007. Quality of potable water and management strategies in Thessaloniki, Serres and Chalkidiki prefectures. Desalination 213, 205–208

Patel, R., Suresh, S. 2008. Kinetic and equilibrium studies on the biosorption of reactive black 5 dye by *Aspergillus foetidus*. Biosource Technology 99 (1), 51-58

Peart P. C., Chen A. R., Reynolds W. F., Reese P. B. 2012. Entrapment of mycelial fragments in calcium alginate: A general technique for the use of immobilized filamentous fungi in biocatalysis. Steroids *77* (1), 85-90

Pérez-Sicarios S., Morales-Cuevas J.B., Félix-Navarro R.M., Hernández-Calderón O.M. 2011. Evaluation of the electro-coagulation process for the removal of turbidity of river water, wastewater and pond water. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 3 (1), 79-91

Peng C., Zhao Q., Gao C. 2010. Susutained delivery of doxorubicin by porous CaCO3 and chitosan/alginate multilayers-coated CaCO3 microparticules. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 353, 132-139

Premjet S., Bunthong O., Premjet D. 2009. The Ability of Five Fungal from Nature to Degrade of Polyaromatic Hydrocarbons (PAHs) and Polychorinated Biphenyls (PCBs) in Culture Media. Australian journal of Basic an Applied Science 3 (3), 1076-1082

Qu X., Alvarez J.J.P., Li Q. 2013. Applications of nanotechnology in water and wastewater treatment. Water research 47, 3931-3946

Quintero J.C., Feijoo G., Lemar J.M. 2006. Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos. Vitae Revista de la facultad de química farmacéutica 13 (2), 61-67

Radha K.V., Regupathi I., Arunagiri A., Murugesan T. 2005. Decolorization studies of synthetic dyes using *Phanerochaete chrysosporium* and their kinetics. Process Biochemestry 40, 3337-3345.

Ramalho R.S. 1977. Introduction to Wastewater Treatment Processes. Editor Academic Press Inc. 9

Rathore, S.; Desai, P.; Liew, C.; Chan, L.; Heng, P. 2013. Microencapsulation of microbial cells. J. Food Eng. 116(2), 369-381

Rodarte-Morales A. I., Feijoo G., Moreira M. T., Lema J. M. 2012. Operation of stirred tank reactors (STRs) and fixed-bed reactors (FBRs) with free and immobilized *Phanerochaete chrysosporium* for the continuous removal of pharmaceutical compounds. Biochemical Engineering Journal 66, 38-45

Rodríguez C.S. 2009. Dye removal by immobilised fungi. Biothechnology Advances 27, 227-235

Rodríguez C.S., Sanromán Ma A. 2004. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. Biochemical Engineering Journal 22, 211-219

Ruíz Dueñas F. J. 1998. Caracterización molecular de un nuevo tipo de peroxidasa ligninolítica, Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

Sánchez-López M.I., Guerra G., Hechevarria Y., Domínguez O., Manzano A.M., Torres G., Arguelles J., Ramos-Leal M. 2010. Estabilidad y actividad enzimática del crudo enzimático del cultivo de *Trametes maxima*, decoloración in vitro de colorantes sintéticos. Revista CENIC. Ciencias Biológicas 41, 1-13

Say R., Denizli A., Arıca M.Y. 2001. Biosorption of cadmium(II), lead(II) and copper(II) with the filamentous fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Bioresource Technology 76 (1), 67-70.

Sepehr M N., Nasseri S., Zarrabi M., Samarghandi M R., Amrane A. 2012. Removal of Cr(III) from tanning effluent by *Aspergillus niger* in airlift bioreactor. Separation and Purification Technology 96, 356-262

Seshikala D., Singara Charya M A. 2012. Collection and screening of basidiomycetes for better lignin degraders. International Journal of Life Sciencies Biotechnology and Pharma Research 1 (4), 203-211

Sharari M., Roohani M., Latibari A.J., Guillet A., Aurousseau M., Sharari A. 2013. Treatment of bagasse preparation effluent by *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on polyurethane foam: Enzyme production versus pollution removal. Industrial Crops and Products 46, 226-233

Shim S., Kawamoto K. 2002. Enzyme production activity of *Phanerochaete chrysosporium* and degradation of pentachlorophenol in a bioreactor. Water Research 32, 4445-4454

Simate G.S., Cluett J., Iyuke S.E., Musapatika E.T., Ndlovu S., Walubita L.F., Alvarez A.E. 2011. The treatment of brewery wastewater for reuse: State of the art. Desalination 273, 235-247

Songulashvili G., Elisashvili V., Wasser S. P., Nevo E., Hadar Y. 2007. Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. Enzyme and Microbial Technology 41 (1), 57-61

Sukhorukov G. B., Volodkin D. V., Günther A. M., Petrov A. I., Shenoy D. B., Möhwald H. 2004. Porous calcium carbonate microparticles as templates for encapsulation of bioactive compounds. Journal of Materials Chemistry 14 (14), 2073-2081

Susla M., Novotny C., Erbanova P., Svobodova K. 2008. Implication of *Dichomitus squalens* Manganese-Dependent Peroxidase in Dye Decolorization and Cooperation of Enzyme with Laccase. Folia Microbiol. 53 (6), 479-485

Tapia N., Cabrejos J., Rojas N., Torres F., Reyes I. 2009. Preparación de perlas de alginato de calcio con propiedades magnéticas y su aplicación en la adsorción de Cu (II). Revista Peruana de Química e Ingeniería Química 12(2), 29-33

Taccari M., Stringini M., Comitini F., Ciani M. 2009. Effect of *Phanerochaete chrysosporium* inoculation during maturation of co-composted agricultural

wastes mixed with olive mill wastewater. Waste management 29 (5), 1615-1621

Tejocote-Pérez M., Balderas-Hernández P., Barrera-Dìaz C.E., Roa-Morales G. 2010. Treatment of industrial effluents by a continuous system: Electrocoagulation –Activated sludge. Bioresource Technology 101, 7761-7766

Tian J., Liang H., Nan J., Yang Y., You S., Li G. 2009. Submerged membrane bioreactor (sMBR) for the treatment of contaminated raw water. Chemical Engineering Journal 148, 296-305

Tripathi A.K., Harsh N.S.K., Gupta N. 2007. Fungal treatment of industrial effluents: a mini-review. Life Science Journal 4 (2), 78-81.

Tuor U., Winterhalter K., Fiechter A. 1995. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinant for wood decay. Journal of Biotechnology 41, 1-17.

Universidad del trabajo de Uruguay. ACMV “Determinación de azucares reductores por licor de Fehling”. Ultimo acceso 15 de junio de 2014. Disponible en: http://www.utu.edu.uy/Escuelas/departamentos/canelones/vitivinicultura/Laboratorio/Modulo%20propedeutico%20Practico/Ferricianuro%20de%20potasio.pdf

Universidad de Wisconsin. 2014. Departamento de botánica. Ultimo acceso 15 de junio de 2014. Disponible en http://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi

Ürek R. Ö., Pazarlioğlu N. K. 2005. Production and stimulation of manganese peroxidase by immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. Process biochemistry, 40 (1), 83-87

Van Ginkel S.W., Oh S., Green P., Logan B.E. 2005. Biohydrogen gas production from food processing and domestic wastewaters. International Journal of Hydrogen Energy. 30, 1535-1542.

Vörösmarty, C.J, Green P., Lammers R.B. 2000. Global Water Resources: Vulnerability from Climate Change and Population Growth. Science. 289, 284-288

Wang X., Jia X., Wen J. 2011. Transient CFD modeling of toluene waste gas biodegradation in gas-liquid-solid three-phase airlift loop reactor by immobilized *Pseudomonas putida*. Chemical Engineering Journal. 172, 735-745

Xiong X., Wen X., Bai Y., Qian Y. 2008. Effects of culture conditions on ligninolytic enzymes and protease production by *Phanerochaete chrysosporium* in air. Journal of Environmental Sciences 20 (1), 94-100

Xiong X-J., Meng X-J., Zheng T-L. 2010. Biosorption of C. I. Direct Blue 199 from aqueous solution by nonviable *Aspergillus niger*. Journal of Hazardous Materials 175, 241-246

Xu S. W., Jiang Z. Y., Lu Y., Wu H., Yuan W. K. 2006. Preparation and catalytic properties of novel alginate-silica-dehydrogenase hybrid biocomposite beads. Industrial & engineering chemistry research 45 (2), 511-517

Yabroudi S.C., Almarza J., Pedrique F., Cárdenas C., Herrera L. 2009. Optimización del proceso de tratamiento de aguas residuales de una industria cervecera. Interciencia 34 (11), 764-770.

Yu Z., Zeng G. M., Chen Y. N., Zhang J. C., Yu Y., Li H., .Tang, L. 2011. Effects of inoculation with *Phanerochaete chrysosporium* on remediation of pentachlorophenol-contaminated soil waste by composting. Process Biochemistry 46 (6) 1285-1291

Zahmatkesh M., Tabandeh F., Ebrahimi S. 2010. Biodegradation of reactive orange 16 by *Phanerochaete chrysosporium* fungus: application in a fluidized bed bioreactor. J. Environ. Health. Sci. Eng. 7 (5), 385-390.

Zhang K., Xu Y., Hua X., Han H., Wang J., Wang J., Liu Y., Liu Z. 2008. An intensified degradation of phenanthrene with macroporous alginate-lignin beads immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. Biochemical Engineering Journal 41, 251-257.

Zouari H., Labat M., Sayadi S. 2002. Degradation of 4-Chlorophenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* in free and immobilized cultures. Biosource Technology. 84, 145-150.