

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



Casa abierta al tiempo

**Biodegradación de taninos de curtidurías mediante
cultivos de *Aspergillus niger***

T E S I S
Que para obtener el grado de:
Maestro en Biotecnología
P R E S E N T A
I.B.I. Sonia Escárcega Cruz
Matricula 98381669

Asesores: Dr. Gustavo Viniegra G.
Dr. Felipe López I.
Dr. Oscar Moroy H.

Septiembre 2001

2001

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular de Hongos Filamentosos y el Laboratorio de Tratamiento de Aguas Residuales del Departamento de Biotecnología, perteneciente a la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, en la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa.

El Posgrado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el convenio 471-0/Maestría en Biotecnología.

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la comunicación
de resultados que presentó:

I.B.I. Sonia Escárcega Cruz

El día 27 de Septiembre del año 2001

Jurado:

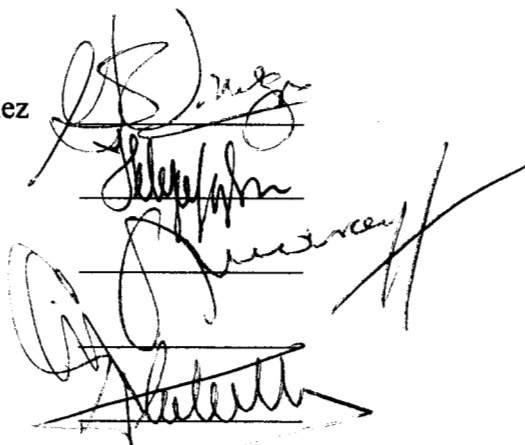
Director Dr. Gustavo Viniegra González

Asesor: Dr. Felipe López Isunza

Asesor Dr. Oscar Monroy Hermosillo

Sinodal: Dra. Claudia Muñoz Sánchez

Sinodal: Dr. Frederic Thalasso



The image shows five handwritten signatures in black ink, each written over a horizontal line. The signatures are: 1. Gustavo Viniegra González (top), 2. Felipe López Isunza, 3. Oscar Monroy Hermosillo, 4. Claudia Muñoz Sánchez, and 5. Frederic Thalasso (bottom). The signatures are written in a cursive style.

ST-610/02

Dedicatoria

**A mi esposo J. Eduardo González Iribarren
y a mi hija Ana González**

Por el gran apoyo que me han brindado,
por todos sus consejos y por el gran cariño
que me han mostrado en todo momento,
por el interés que tienen en todo lo que hago.

A mi mamá por confiar en mi y apoyarme siempre
en todas las decisiones importantes de mi vida,
por el tiempo que ha dedicado al cuidado de mi hija
para que yo continúe con mis proyectos y
porque gracias a ella he logrado muchas cosas.

**A mis hermanos Rafael, Humberto y Magaly,
y a mi sobrino Ale** porque creen en mi y
son la gran compañía de mi vida.

**A mis compañeros y amigos, especialmente a
Alba Mónica, Jaime y Miguel Ángel**
por hacer más agradable mi estancia en el laboratorio,
gracias por su compañía y por su ayuda, por brindarme
su amistad y por la confianza que me tienen.

A mis amigas de toda la vida: Irasema y Angélica
que han estado conmigo para brindarme su compañía
y buen humor cuando las necesito.

A Leticia González porque ha sido muy solidaria,
buena amiga siempre interesada en lo que hago
y que de alguna manera me ha permitido conocer
la nobleza del ser humano.

Agradecimientos

Agradezco a los Doctores **Felipe López Isunza, Gustavo Viniegra González y Oscar Monroy Hermosillo** por su asesoría y por las facilidades brindadas a lo largo de este trabajo de investigación que me dejó muchas satisfacciones.

A los miembros externos del jurado: **Dra. Claudia Muñoz y al Dr. Frederic Thalasso** por haber aceptado realizar la revisión de este trabajo y por sus comentarios.

Al **CONACyT**, por el apoyo financiero brindado.

Resumen

Una de las actividades económicas importantes de nuestro país es la industria del curtido de pieles; en la ciudad de León, Guanajuato, esta actividad representa el 70% de la producción peletera del país. Para tal actividad el uso de grandes volúmenes de agua y de los extractos curtientes vegetales es indispensable.

Los curtientes vegetales usados en esa industria contienen proantocianidinas (taninos condensados). Este tipo de compuestos son polifenoles de alto peso molecular que resultan tóxicos para muchos organismos, por tal motivo el tratamiento del agua se ve limitado y es necesario implantar nuevos sistemas que ayuden al tratamiento de los efluentes de las mencionadas industrias. La digestión anaerobia que sería el tratamiento indicado para reducir las elevadas descargas de materia orgánica de las curtidurías se inhibe, lo cual significa que existen compuestos que no son degradados y que además resultan tóxicos para algunas de las bacterias implicadas en este proceso.

Por las razones señaladas, el presente trabajo propone implementar un sistema de pretratamiento aeróbico con la aplicación de microorganismos con mecanismos de degradación de taninos, capaz de degradar los componentes tóxicos para que las bacterias anaerobias cumplan las necesidades del tratamiento del agua residual de las curtidurías.

El estudio de degradación de taninos hidrolizables ha sido de gran importancia para la industria alimentaria o farmacéutica. Se ha observado que son productores de sistemas enzimáticos inducibles conocidas como tanasas (tanin-acil-hidrolasa, EC.3.1.1.20) cuyas propiedades varían dependiendo de: el microorganismo utilizado, las condiciones del medio de cultivo y del tipo de cultivo que se trate. Sin embargo, no se tienen referencias sobre los mecanismos de acción para la degradación de proantocianidinas y sus aplicaciones. En la presente tesis se trabajó con una cepa de *Aspergillus* que es productora de tanasas de amplio rango, es decir, degrada tanto taninos hidrolizables como condensados y esto hace posible una destoxificación de los efluentes de la mencionada industria para completar el tratamiento del agua residual.

Se caracterizaron los sólidos del extracto de acacia por ser el curtiente más utilizado actualmente por la industria del curtido de pieles, el análisis se efectuó por la fijación del extracto al polvo de cuero usado para medir el poder curtiente en las tenerías, obteniéndose dos fracciones de sólidos: los llamados taninos que son el 63% y, los llamados no-taninos que son el 37%. Dentro de los no-taninos se cuantificaron azúcares (10%), monómeros de flavanoles, ácido gálico y cenizas. Cabe mencionar que también pueden existir

otro tipo de componentes como gomas, fibras, ácidos grasos, proteínas, etc. que no fueron cuantificados por tratarse de un extracto complejo. Se logró determinar que *A. niger* consume azúcares y la producción de biomasa tiene principalmente una relación directa con el consumo de los azúcares presentes en la fracción de los no-taninos y que la velocidad específica de crecimiento de *A. niger* Aa20 crecido sobre extracto de acacia como única fuente de carbono y energía, en medio líquido, se inhibe al incrementar la concentración inicial de sustrato. Cabe mencionar que la degradación del extracto curtiente utilizado se probó dentro de las concentraciones que se espera tengan los efluentes y aún existe actividad para la destoxificación. Al estudiar el efecto de la concentración del extracto de acacia sobre la velocidad específica de crecimiento de *A. niger* Aa20, se observó un efecto inhibitorio de tipo Luong.

Aspergillus niger Aa20 fue capaz de crecer en medio líquido con extracto de acacia como única fuente de carbono y energía desde 5 hasta 120 g/L con un $Y_{x/S} \approx 0.1$, sin embargo, el balance de sólidos indicó que este organismo consume preferencialmente los no-taninos, aunque posiblemente modifica los taninos. Con las pruebas de actividad metanogénica en los lodos anaerobios se observa que la metanogénesis aumenta en 20%, aproximadamente.

Los modelos matemáticos de crecimiento, de consumo de sustrato y de los fenómenos de transferencia y difusión en el reactor pueden ser un complemento importante para la descripción más detallada del sistema y así poder diseñar de una forma más precisa el sistema adecuado para la industria.

La comparación entre los matraces agitados y el reactor de biopelícula inmovilizada sobre plástico indicó que la biopelícula degrada mejor a los componentes tóxicos del extracto de acacia, según se evaluó por su efecto sobre un consorcio de bacterias metanogénicas. Este resultado es importante para el diseño de reactores de película inmovilizada de *A. niger* como método parcial del tratamiento del agua residual de las tenerías.

Estos resultados permiten proponer el uso de biopelículas de *A. niger* como sistema de tratamiento parcial de la fracción de no-taninos. Lo cual implica que, por separado, se debe desarrollar un proceso industrial de separación y reuso de los taninos residuales. De esta forma se podrá atenuar considerablemente el impacto ecológico de las descargas de las tenerías.

Se recomienda el estudio de la dinámica y optimización de los reactores de biopelícula de *A. niger* alimentados por la fracción de no-taninos de los extractos curtientes vegetales para obtener las ecuaciones de diseño de este tipo de reactores industriales. En este sentido esta tesis es un antecedente metodológico para este fin.

Contenido

RESUMEN	I
LISTA DE TABLAS	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Impacto ambiental	1
1.2. Definición de los taninos	3
1.3. Fuentes de curtientes vegetales	3
1.4. Clasificación comparativa y origen de los taninos	4
1.4.1. Taninos hidrolizables	6
1.4.2 Taninos condensados	7
1.5. Características químicas de los taninos	7
1.5.1. Interacción de taninos con otras macromoléculas	7
1.6. Características químicas del extracto de acacia	9
1.7. Toxicidad de los taninos en microorganismos	10
1.8. Biodegradación de los taninos	11
1.9. Aplicación industrial de organismos resistentes a los taninos	13
1.10. Los reactores biológicos	15
1.10.1. Películas biológicas	16
1.10.2. Naturaleza de las biopelículas	16
1.11. Contaminación del agua	18
1.11.1. Tratamiento de aguas residuales	18
1.12. Propuestas alternativas o complementarias para el reúso y tratamiento de los efluentes de curtidurías.	19

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
2.1 Esquema del proceso por estudiar	21
2.2. Modelo teórico del crecimiento y del metabolismo de <i>Aspergillus niger</i> crecido sobre el extracto de acacia	22
3. HIPÓTESIS	26
4. OBJETIVO	26
4.1. Objetivo general	26
4.2. Objetivos particulares	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS	27
5.1. Microorganismo	27
5.2. Medio de propagación y conservación de la cepa	27
5.3. Medio líquido para la degradación de taninos	27
5.4. Condiciones de crecimiento de <i>A. niger</i> Aa20	28
5.4.1. Cosecha de esporas	28
5.4.2. Cuantificación de la biomasa por peso seco	28
5.5. Análisis del extracto de acacia	29
5.6. Técnicas analíticas del medio de cultivo	29
5.6.1. Azúcares totales	29
5.6.2. Ácido gálico	30
5.6.3. Antocianidinas	30
5.6.4. Monómeros y polímeros de flavanoles	30
5.7. Medio anaerobio para pruebas metanogénicas	31
5.7.1. Sistema experimental para medir actividad metanogénica	32

6. RESULTADOS	33
6.1. Análisis del extracto de acacia	33
6.2. Autoxidación de taninos	35
6.3. Efecto de la concentración del extracto de acacia sobre la metanogénesis	36
6.4. Crecimiento de <i>A. niger</i> Aa20 en medio líquido con extracto de acacia como fuente de carbono y energía	37
6.4.1. Crecimiento de <i>A. niger</i> en No-taninos del extracto de acacia	39
6.4.2. Efecto de la concentración del extracto de acacia sobre la velocidad específica de crecimiento	44
6.4.3. Análisis de la degradación de los componentes del extracto de acacia por <i>A. niger</i> Aa20	48
6.5. Comparación de la actividad metanogénica de las bacterias anaerobias con pretratamiento del extracto	51
6.6. Instalación de un reactor de biopelícula por lote	52
6.6.1. Homogeneidad del reactor	54
6.6.2. Comparación de los perfiles de consumo de sustrato en el reactor de biopelícula y los matraces agitados	55
6.6.3. Comparación de la metanogénesis al utilizar diferentes sistemas de pretratamiento del extracto de acacia	57
7. CONCLUSIONES	59
8. RECOMENDACIONES	60
9. BIBLIOGRAFÍA	61

Lista de Tablas

Tabla 1 Especificaciones para el extracto de acacia negra brasileña.....	10
Tabla 2 Microorganismos productores de taninas.....	12
Tabla 3 Composición del medio utilizado para crecer <i>A. niger</i> Aa20.....	28
Tabla 4 Composición del medio de cultivo anaerobio	31
Tabla 5. Composición porcentual total de los no-taninos.....	33
Tabla 6 Efecto de la oxidación de taninos sobre la metanogénesis.....	35
Tabla 7. Rendimientos hipotéticos biomasa/sustrato aparente.....	38
Tabla 8. Comparación del rendimiento aparente de <i>A. niger</i> Aa20 crecido en extracto de acacia	39
Tabla 9. Comparación del crecimiento del hongo con en el extracto de acacia y con los no- taninos	41
Tabla 10 Medición de la DQO para diferentes tratamientos del medio de cultivo	41
Tabla 11 Efecto de la concentración de extracto de acacia sobre la velocidad específica de crecimiento y la producción de biomasa de <i>Aspergillus niger</i> Aa20.....	45
Tabla 12. Comparación de los modelos de inhibición.....	47

Lista de Figuras

Figura 1 Diagrama del proceso de curtido de pieles	2
Figura 2 Ruta biosintética del ácido shiquímico	5
Figura 3 Estructuras moleculares de los taninos hidrolizables	6
Figura 4 Estructuras moleculares de los taninos condensados.....	8
Figura 5 Despolimerización de taninos condensados (Proantocianidinas).....	9
Figura 6 Esquema del posible tratamiento de efluentes de las curtidurías	21
Figura 7 Patrón del crecimiento típico de microorganismos en cultivos por lote.....	23
Figura 8 Modelos de crecimiento con inhibición por sustrato.....	24
Figura 9 Esquema del sistema para medir la actividad metanogénica	32
Figura 10 Composición de los sólidos del extracto de acacia.....	34
Figura 11 Efecto de la concentración del extracto de acacia sobre la metanogénesis.....	36
Figura 12 Crecimiento de <i>A. niger</i> Aa20 sobre extracto de acacia como única fuente de carbono y energía, y colonización del soporte.	37
Figura 13 Efecto de los taninos y no-taninos del extracto de acacia sobre el crecimiento de <i>A.</i> <i>niger</i> Aa20	39
Figura 14 Comparación de la actividad metanogénica con diferentes tratamientos del extracto de acacia	43
Figura 15 Efecto de la concentración del extracto de acacia sobre el crecimiento de <i>A. niger</i> Aa20	44
Figura 16 Efecto de la concentración del extracto de acacia sobre la producción de biomasa de <i>A. niger</i>	45
Figura 17 Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad específica de crecimiento	46
Figura 18. Degradación del extracto de acacia con 60 g/L en la concentración inicial	49
Figura 19. Degradación del extracto de acacia con 75 g/L en la concentración inicial	49
Figura 20. Degradación del extracto de acacia con 120 g/L en la concentración inicial.....	50
Figura 21 Comparación de la actividad metanogénica de las bacterias anaerobias.	51
Figura 22 Esquema del reactor por lote de 800 mL	53
Figura 23 Prueba de la homogeneidad del reactor	55
Figura 24 Comparación del consumo del extracto de acacia en los sistemas de matraz y el reactor de biopelícula	56
Figura 25 Comparación de la metanogénesis con los diferentes tratamientos del extracto de acacia a 60 g/L.....	58

1. Introducción

1.1 Impacto ambiental

La industria curtidora puede ser calificada como un motor básico para la economía de León, Guanajuato. En esta ciudad se procesa el 70% de la producción peletera del país, que se ocupa al 60% de la mano de obra local. El estado de Guanajuato surte de cueros y pieles al 81% de la industria zapatera leonesa, que a su vez cubre el 60% de la producción nacional del calzado, además de significar 13% de las exportaciones zapateras mexicanas. En esta entidad, se encuentran cerca de 721 tenerías, o curtidurías, el mayor número de las cuales se encuentra en los municipios de San Francisco del Rincón, Purísima de Bustos y León.

Las curtidurías de la región elaboran una amplia gama de artículos, enfocados principalmente al suministro de la industria del calzado (81%), así como también a las áreas de la vestimenta y marroquinería como son: piel para forros, corte, suelas, cerco y tacones, bolsas, cinturones, maletería, etc. Dentro de los tipos de piel que preponderadamente se curten en la industria de la curtiduría se encuentran las de bovino (82%), porcino (8%), cabra (4%), borrego y equino, principalmente; sin embargo, a últimas fechas la curtición de pieles exóticas permitidas ha tenido gran auge, tal es el caso de la piel de avestruz.

Para realizar el curtido de cualquier tipo de piel se utiliza un conjunto de operaciones (Figura 1), que consiste en la maceración de las pieles, previamente lavadas y limpiadas, con soluciones curtientes vegetales (en aproximadamente el 15% de las tenerías) o minerales (cromatos en el resto de las tenerías).

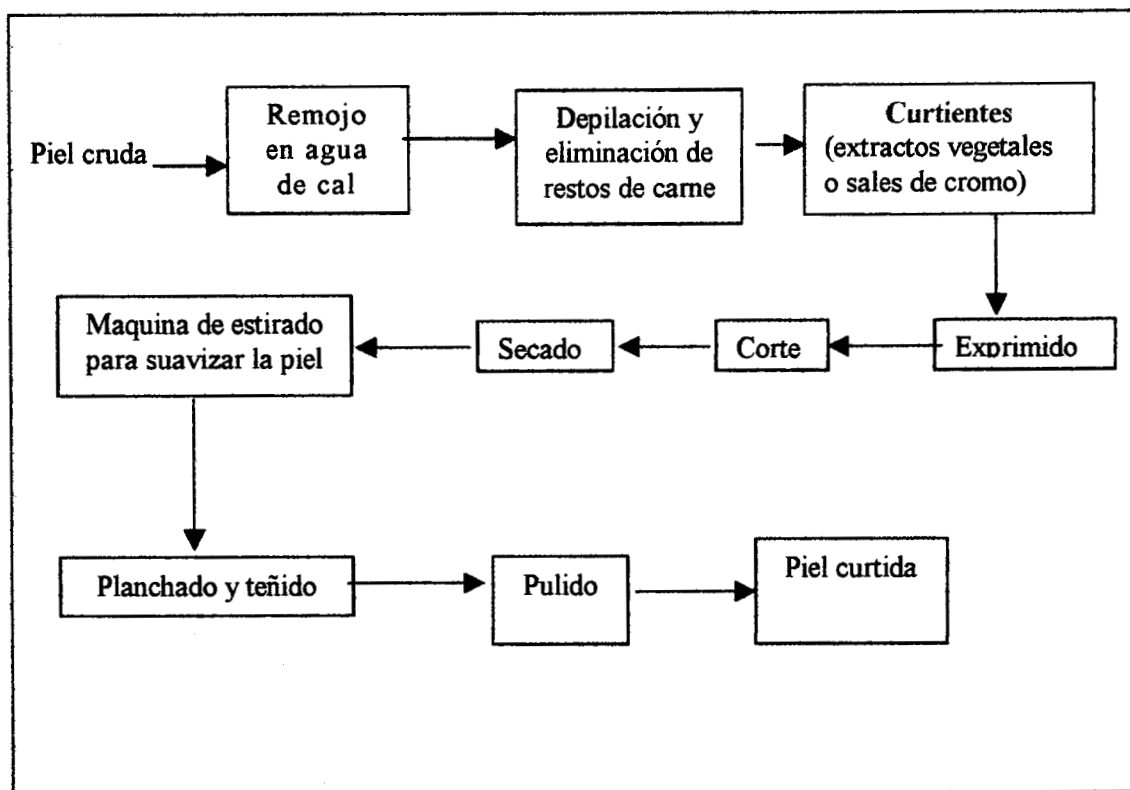


Figura 1 Diagrama del proceso de curtido de pieles

El exceso de curtientes genera un importante volumen de aguas residuales, contaminadas con cerca de 100 g/L de materia orgánica y taninos que no reaccionaron con las proteínas de la piel. Estas descargas orgánicas son de muy difícil degradación biológica debido a que los taninos están formados por polifenoles, sustancias tóxicas para la mayoría de los microorganismos utilizados en las plantas convencionales de tratamiento biológico de aguas residuales. Además, estas descargas ricas en taninos también resultan dañinas para la flora y fauna acuática de la región y se ha planteado la necesidad de reducir su impacto ambiental. De ahí que sea importante, para mejorar la ecología de Guanajuato, entender la naturaleza de los taninos usados en las curtidorías y las alternativas de su tratamiento biológico.

Por lo tanto, se hace necesario encontrar métodos para reducir o eliminar las descargas de taninos residuales de esta industria, incluyendo un método nuevo de tipo biológico que

permita superar los problemas de toxicidad de los taninos sobre la acción de los microorganismos de los digestores, que dado el alto nivel de descarga orgánica, tendrían que ser de tipo anaerobio (metanogénico), porque los aerobios requerirían un gran consumo de oxígeno con largos tiempos de residencia de los efluentes y, en consecuencia, con altos costos de construcción, operación y mantenimiento.

1.2. Definición de los taninos

Los taninos o extractos curtientes son mezclas de compuestos de composición química muy diversa. Son extraídos de cortezas, maderas, frutos, hojas o vainas de diversas especies vegetales y tienen la propiedad de combinarse, bajo ciertas condiciones, con la proteína de la piel (colágeno o corium), para obtener un producto de estabilidad hidrotérmica, muy resistente a las acciones mecánicas, comúnmente llamado cuero (López y Hernández, 1986).

1.3. Fuentes de curtientes vegetales

Su distribución en los vegetales es muy amplia; abarca casi todas las familias de ese reino, incluyendo a los vegetales inferiores. Geográficamente, su presencia predomina en regiones de clima templado y tropical, influyendo en su abundancia, la altura sobre el nivel del mar, la constitución del terreno, la humedad, etc. (Cannas, 1999).

Comercialmente, los taninos se obtienen como extractos de árboles, entre los que destacan: el quebracho, el castaño y la mimosa, y entre los secundarios: el pino valonea, los mirabolanos, el zumaque y el eucalipto. Recientemente ha tomado mucha importancia la mimosa brasileña, conocida como acacia, acacia brasileña, acacia negra, etc., ya que dicho extracto puede ser considerado dentro de los principales curtientes vegetales utilizado en nuestro país (López y Hernández, 1986).

1.4. Clasificación comparativa y origen de los taninos

Según Cannas (1999), en los vegetales existen tres grandes clases de metabolitos secundarios:

- Compuestos que contienen nitrógeno
- Terpenoides
- Fenólicos

Los taninos pertenecen a los compuestos fenólicos y son formados por la ruta biosintética del ácido shiquímico (Figura 2), la cual también participa en la formación de otros compuestos fenólicos, tales como: isoflavones, cumarinas, ligninas y aminoácidos aromáticos (triptofano, fenilalanina y tirosina). Los taninos se clasifican en dos grupos principales: taninos hidrolizables y los condensados (proantocianidinas)

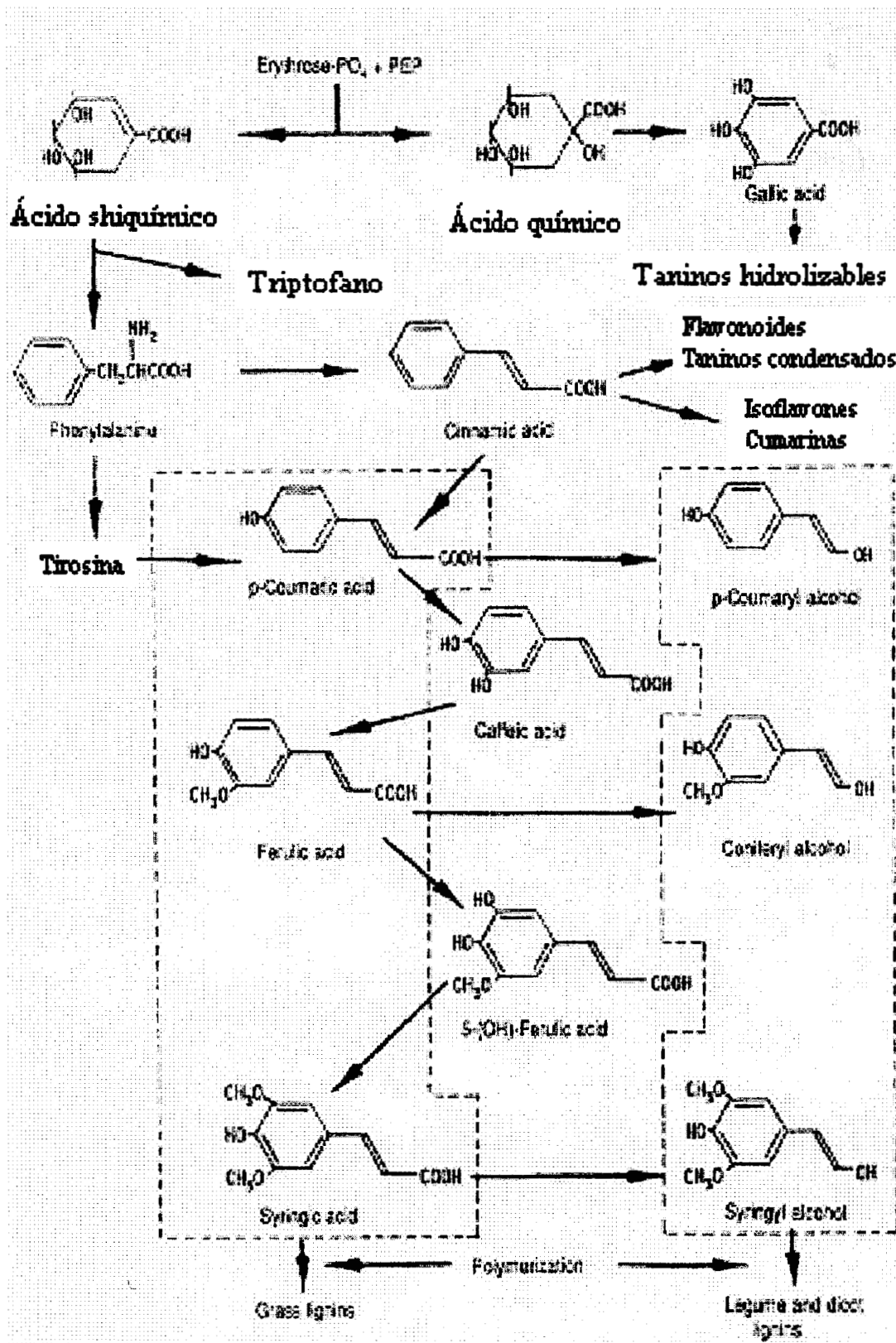


Figura 2 Ruta biosintética del ácido shiquímico

1.4.1. Taninos hidrolizables

Este tipo de taninos cuentan con una estructura molecular mínima para manifestarse como curtientes (Figura 3) y ésta suele ser: ácido gálico o ácidos derivados de éste unidos por esterificación a una molécula central de azúcar que puede ser un mono- o bien un oligosacárido. (López y Hernández, 1986). Este tipo de taninos son fácilmente degradados por la acción de muchos microorganismos mediante la acción de las esterasas llamadas tanasas, discutidas más adelante.

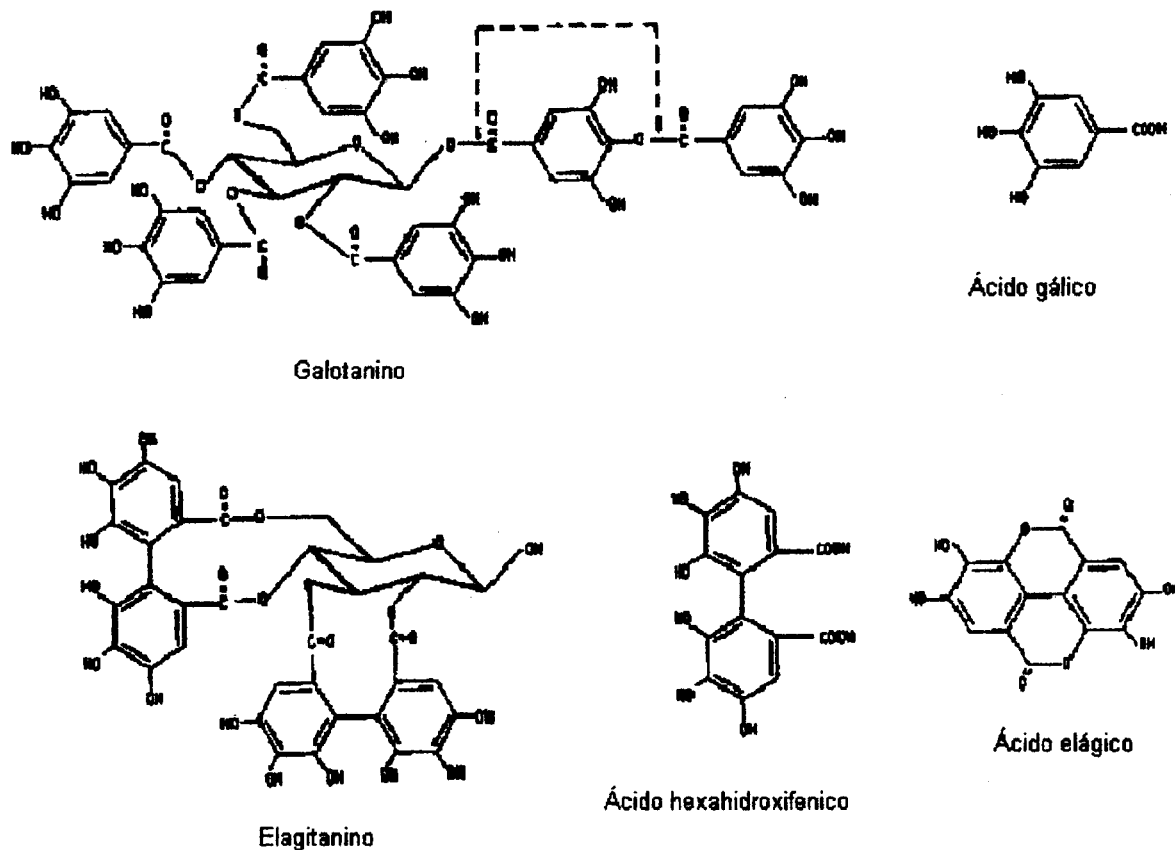


Figura 3 Estructuras moleculares de los taninos hidrolizables

1.4.2 Taninos condensados

Son conocidos como proantocianidinas, se forman por la unión de núcleos polifenólicos (mono-, di- o trifenoles) mediante enlaces de tipo éter, a través de cadenas carbonadas de longitud variable y posiblemente por los propios carbonos del núcleo, el cual puede ser del tipo de catequina, resorcina, pirogalol, fenol, floroglucina, etc. (Figura 4) Esta unión entre núcleos fenólicos puede ser también mediante heterociclos que contienen átomos de oxígeno y carbonos alifáticos. (López y Hernández, 1986). La despolimerización de estos compuestos se origina a temperaturas elevadas y en medio ácido, formando antocianidinas (Figura 5). Los taninos condensados son más resistentes al ataque microbiano. (Lewis y Starkey, 1962) y aún no se conocen los sistemas enzimáticos que los degradan, incluso se ignora si esta biodegradación se lleva fuera o dentro de las células de los organismos que pueden degradarlos.

1.5. Características químicas de los taninos

Químicamente, los taninos se caracterizan por su contenido de grupos funcionales fenólicos. En algunos casos, están en forma de glucósidos, con diferentes azúcares en su molécula, en otros están exentos de ellos. Forman agrupaciones moleculares complejas de peso generalmente alto (2000 y más) son solubles en agua e insolubles en la mayoría de los solventes orgánicos, producen soluciones de carácter coloidal y no son cristalizables (Fessenden y Fessenden, 1983).

1.5.1. Interacción de taninos con otras macromoléculas

La actividad de los taninos causa gran impacto negativo sobre la fisiología de las células debido a su capacidad de formar complejos con numerosos tipos de moléculas, tales como: carbohidratos, proteínas, polisacáridos, membranas celulares y enzimas. (Cannas, 1999) y por esa razón su presencia es indeseable en las descargas líquidas de origen industrial, cuyo destino final sean los lagos, ríos o mares circundantes a las tenerías.

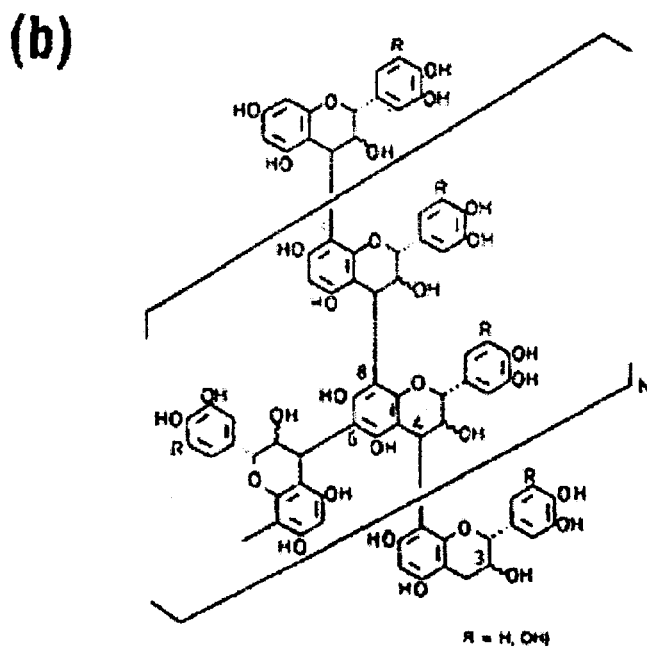
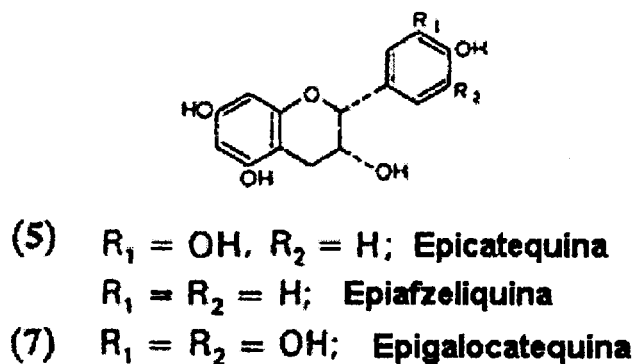
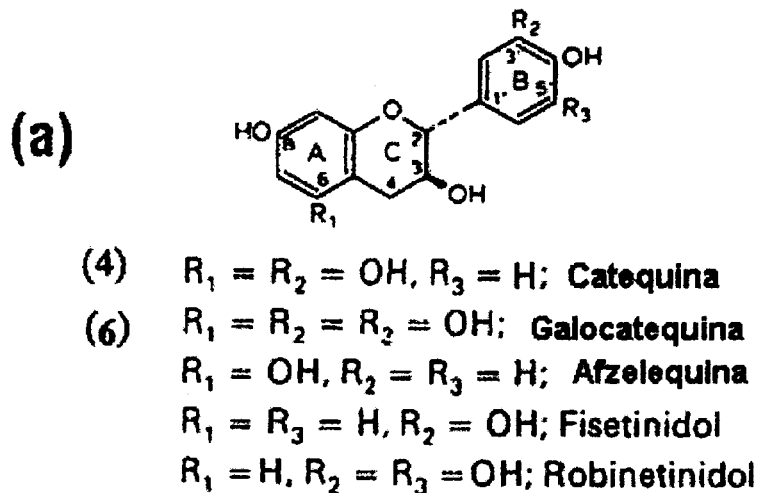


Figura 4 Estructuras moleculares de los taninos condensados

- b) La parte correspondiente a los no-taninos está constituida de carbohidratos (hexosas, pentosas, disacáridos, etc.) y glucuronatos complejos (gomas, hidrocoloides, etc.), los cuales ayudan en el equilibrio de la reactividad de los taninos y contribuyen al curtido para el llenado de los cueros (López y Hernández, 1986).
- c) Los sólidos insolubles son compuestos originados de sales inorgánicas y micro-residuos de fibras vegetales presentes en la materia prima (López y Hernández, 1986).

En la Tabla 1 se muestra la composición de una muestra de extracto de acacia negra brasileña, en la cual se indica que cerca del 70% está formada por taninos, el 25% por no-taninos y menos del 1% por insolubles. El resto corresponde a la humedad de la muestra. Esto implica que cerca del 75% de los sólidos de la mezcla está compuesto por taninos. Sin embargo, a cada curtiembre vegetal que se desea utilizar en las tenerías es necesario practicar una prueba de calidad de las muestras mediante un análisis químico para determinar sus características.

Tabla 1 Especificaciones para el extracto de acacia negra brasileña

% Taninos*	65-69
% No-Taninos	24-26
% Insolubles	0.8-1.3
% Humedad	5-7
pH	4-5
Color (LOVIBOND) Amarillo	0.8-1.2
Rojo	0.6-0.8
Viscosidad solución al 50% -70%	20-25 cps

*Métodos Oficiales de Análisis (Society of Leather Trades Chemists) Método de Agitación

1.7. Toxicidad de los taninos en microorganismos

La toxicidad de los taninos se ha estudiado en los microorganismos del rumen, como en *Streptococcus bovis*, *Butyvirbio fibrosolvans*, *Fibrobacter succinogenes*, *Prevotella ruminicola* y *Ruminobacter amylophilis*, en los cuales se han identificado tres mecanismos de toxicidad:

- Inhibición enzimática y secuestro de sustrato
- Interacción con las membranas celulares
- Secuestro de iones metálicos

Por lo que los taninos conducen a cambios en la morfología de muchas especies bacterianas y a crear mecanismos de defensa como son:

- Secreción de polímeros
- Síntesis de enzimas resistentes a los taninos
- Biodegradación de taninos (peculiarmente de algunas bacterias recientemente descubiertas que son capaces de tolerar altos niveles de proantocianidinas) (Cannas, 1999; Bhat, *et al.*, 1998)

La toxicidad de los taninos sobre las bacterias anaerobias es de gran importancia ambiental porque impide la biodegradación de estas moléculas en los digestores anaerobios (Field, *et al.*, 1987, 1990), siendo esto una limitante para el tratamiento de agua residual de la industria de la curtiduría, ya que para la producción requerida se utilizan grandes volúmenes de agua que contienen el exceso del curtiente utilizado para la curtición de las pieles.

1.8. Biodegradación de los taninos

Se han realizado estudios de la degradación de los taninos y se han encontrado microorganismos resistentes a ellos, entre los que destaca el deuteromiceto *Aspergillus niger*, pues se tiene noticia que puede tolerar hasta 100 g/L de ácido tánico (Aguilar, 2000; Ramírez, 2000). Pero no se tienen datos de su tolerancia a los taninos condensados, aunque se sabe que puede degradarlos en menor grado que los hidrolizables, tanto en ambientes aerobios como anaerobios (Lewis y Starkey, 1962, Bhat *et al.*, 1998). Se sabe que para la biodegradación de los taninos hidrolizables se sintetizan enzimas llamadas tanasas (tanin-acil-hidrolasa, EC3.1.1.20). El mecanismo de acción es la hidrólisis de los enlaces éster del ácido gálico, que en los taninos hidrolizables puede ser de dos tipos: *esterasa*, cuando la hidrólisis se da entre una molécula de ácido gálico y glucosa, o bien entre un grupo metilo y una molécula de ácido gálico; *depsidasa*, cuando la hidrólisis se da entre dos moléculas de ácido gálico y la enzima actúa despolimerizando la molécula, como ocurre en el ácido tánico (Beverini y Metche, 1990).

Se han encontrado diversos microorganismos (Tabla 2) que producen tanasas, entre los cuales se puede mencionar a trece especies del género *Aspergillus*. Estas enzimas son inducibles, porque su biosíntesis requiere de la presencia de algún derivado de los taninos como señal para producir la enzima, aunque se ignora la estructura química de las moléculas inductoras (Bajpai y Patil, 1996).

Tabla 2 Microorganismos productores de tanasas

Microorganismo	Referencia
Bacterias	
<i>Bacillus pumilis</i>	Deschamps <i>et al.</i> , 1983
<i>B. polymyxa</i>	Deschamps <i>et al.</i> , 1983
<i>Corynebacterium</i> spp.	Deschamps <i>et al.</i> , 1983
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Deschamps <i>et al.</i> , 1983
Levaduras	
<i>Candida</i> sp K1	Aoki <i>et al.</i> , 1976, 1979a,b
Hongos	
<i>Ascochyta boltshauseri</i>	Reshetnikova <i>et al.</i> , 1984
<i>A. pisi</i>	Reshetnikova <i>et al.</i> , 1984
<i>A. biochemica</i>	Reshetnikova <i>et al.</i> , 1984
<i>A. viciae</i>	Reshetnikova <i>et al.</i> , 1984
<i>Aspergillus carneus</i>	Ganga <i>et al.</i> , 1977
<i>A. flaviceps</i>	Ganga <i>et al.</i> , 1977
<i>A. flavus</i>	Chae and Yu, 1973
<i>A. fumigatus</i>	Lewis and Starkey, 1962
<i>A. japonicus</i>	Ganga <i>et al.</i> , 1977
<i>A. leuchensis inui</i>	Rhind and Smith, 1922
<i>A. nidulans</i>	Ganga <i>et al.</i> , 1977
<i>A. niger</i>	Nishira and Mugibayashi, 1960
<i>A. oryzae</i>	Yamada <i>et al.</i> , 1967
<i>A. oryzae pseudoflavus</i>	Seiji <i>et al.</i> , 1973
<i>A. parasiticus</i>	Ganga <i>et al.</i> , 1989
<i>A. terreus</i>	Ganga <i>et al.</i> , 1977
<i>A. ustus</i>	Ganga <i>et al.</i> , 1977
<i>Chaetomium lobosum</i>	Nishira and Mugibayashi, 1960
<i>Mucor pranii</i>	Nishira and Mugibayashi, 1960
<i>Mirothecium verrucaria</i>	Nishira and Mugibayashi, 1960
<i>Neurospora</i>	Nishira and Mugibayashi, 1960
<i>Rhizopus</i>	Nishira and Mugibayashi, 1960
<i>Trichothecium roseum</i>	Nishira and Mugibayashi, 1960
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Rajkumar and Nandy, 1983
<i>P. fellutanum</i>	Ganga <i>et al.</i> , 1978
<i>P. islandium</i>	Ganga <i>et al.</i> , 1978
<i>P. notatum</i>	Ganga <i>et al.</i> , 1978
<i>P. variable</i>	Ganga <i>et al.</i> , 1978

Fuente: P.K. Lekha y B.K. Lonsane, 1997

La producción de tanasas, así como sus propiedades varían dependiendo del microorganismo, de las condiciones del medio de cultivo y del tipo de cultivo que se use (medio sólido o líquido) (Lekha y Lonsane, 1994 y 1997; Lane *et al.*, 1997; Bajpai y Patil, 1996 y 1997; Bradoo *et al.*, 1997; Deschamps *et al.*, 1980; Hadi *et al.*, 1994; Chatterjee *et al.*, 1996; Bhat *et al.*, 1997).

Conviene aclarar que aún se desconoce el mecanismo enzimático por el cual ciertos microorganismos puedan degradar a los taninos condensados, aunque se han aislado algunas cepas microbianas capaces de crecer en ellos como única fuente de carbono (Grant, 1976; Galoitou *et al.*, 1986; Cancino *et al.*, 2000).

1.9. Aplicación industrial de organismos resistentes a los taninos

Algunos estudios se han enfocado a la producción de tanasas con *A. niger*, para disminuir la capacidad astringente de los polifenoles. Así las tanasas tienen un uso muy amplio en la manufactura del té instantáneo, de bebidas con sabor a café, de vino de bellota y de ácido gálico, en la clarificación de cerveza y jugos de fruta, en el tratamiento para la estabilización de la malta, en el mejoramiento del sabor de vino de uva y en la prueba analítica para determinar las estructuras de ácido gálico esterificado (Lekha y Lonsane, 1994). La mayor aplicación comercial de la tanasa es la hidrólisis de galotaninos a ácido gálico, que es un intermediario clave requerido para la síntesis de una droga antibacterial, conocida como trimetoprima (Bajpai y Patil, 1996).

Otros estudios se han enfocado al tratamiento, por la acción de *A. niger*, de aguas residuales de la industria de la aceituna ricas en taninos que producen efluentes líquidos negros, donde la fracción orgánica contiene azúcares, taninos, polifenoles, mucílagos, polialcoholes, pectinas y lípidos, encontrando que la porción fenólica limita la posibilidad del uso de digestores anaerobios para el tratamiento de agua residual y el tratamiento de esas descargas por la acción de las tanasas aumenta considerablemente su tratabilidad por digestión anaerobia. (Field, *et al.*, 1987 y 1990, Hamdi y Ellouz, 1992; Sayadi y Ellouz, 1993). Por lo que Hamdi

(1991) desarrolló nuevos sistemas de tratamiento de efluentes con taninos, que se han adaptado a las plantas tradicionales.

Se han estudiado diferentes tipos de reactores destoxificadores que contienen *Aspergillus niger*. El cual no forma las estructuras entrecruzadas llamadas madejas o pelotitas (“pellets”) pero el micelio puede crecer como una biopelícula en la propela y en la superficie de las paredes del reactor (Hamdi, 1991; Hamdi, *et al.*, 1991; Hamdi y Ellouz, 1992; Hamdi *et al.*, 1992). Esta observación permite inferir que *A. niger* puede llegar a formar biopelículas estables cuando se cultive en soluciones de taninos.

No se han localizado referencias bibliográficas del uso de cultivos de *A. niger* para la degradación parcial de los taninos típicos de las curtidurías y en los estudios publicados sobre la degradación parcial de los taninos de las fábricas de aceitunas, no se indican las preferencias en su ataque a las diversas clases de sustratos presentes. De ahí que sea interesante desarrollar un estudio de laboratorio que investigue los problemas y compare el uso de reactores agitados o de biopelícula para sentar las bases técnicas de un desarrollo tecnológico que reduzca el impacto ambiental de los taninos derramados por las curtidurías.

El interés que se ha desarrollado en estos últimos años por la degradación de los taninos, así como por la producción de tanasas, ha tenido como objetivo la purificación de estas últimas. Ramírez (2000) purificó y caracterizó la tanasa extracelular de *Aspergillus niger* Aa20 producida en medio sólido utilizando ácido tánico como inductor. Encontró que es una enzima de amplio espectro capaz de degradar, al menos parcialmente, los taninos hidrolizables y condensados. La enzima tiene un monómero de peso molecular de 85 KDa y forma un homodímero de 170 KDa, también tiene actividad β -D-glucosidasa, sobre la celobiosa, aunque esta actividad es inhibida en presencia del ácido tánico. Su actividad de esterasa es poco específica, pues actúa sobre los ésteres del ácido gálico ligados a muy diferentes tipos de taninos. Dicha enzima tiene actividad esterasa (hidroliza ésteres del ácido gálico con azúcares) y también tiene actividad depsidasa, pues hidroliza ésteres del ácido gálico con taninos condensados como la catequina y la epicatequina, pero no actúa sobre los taninos condensados sin enlaces de tipo éster.

El amplio espectro de acción de esta enzima sería compatible con la posible versatilidad de esta cepa de *A. niger* y por ello se ha decidido utilizarla como posible agente destoxicador de los taninos condensados para facilitar el tratamiento anaerobio de las aguas residuales de las tenerías.

1.10. Los reactores biológicos

La biotecnología es una integración de la microbiología, de la bioquímica, de la biología molecular y de la ingeniería química con el propósito de utilizar microorganismos, plantas o enzimas para la síntesis de productos. La parte central de un proceso biotecnológico es el biorreactor o reactor biológico que es un dispositivo en donde los materiales son tratados para promover transformaciones bioquímicas por la acción de células vivas o por enzimas. Este tipo de reactores son ampliamente usados en alimentos, farmoquímica y tratamiento de aguas residuales. Por su forma de operación sólo hay tres tipos de reactores biológicos, cuya clasificación más general es: biorreactores continuos, por lote y semicontinuos.

Los biorreactores usados en el tratamiento de agua residual pueden ser como reactores catalíticos heterogéneos de dos o tres fases.

- La fase líquida contiene el sustrato en forma disuelta.
- El biocatalizador o fase sólida la componen los microorganismos, que se pueden encontrar suspendidos en el medio líquido o inmovilizados en un soporte.
- La fase gaseosa está representada por aire, en el caso de los procesos aeróbicos o por el biogás producido (mezclas de metano y bióxido de carbono) para los procesos anaerobios.

En este estudio, se comparará el funcionamiento de dos clases de reactores agitados por lote: uno con la biomasa suspendida y otra en forma de biopelícula por ser dos configuraciones de fácil construcción y análisis.

1.10.1. Películas biológicas

Una biopelícula puede ser definida como una agregación de microorganismos que semejan una capa fija en una superficie sólida y es usualmente idealizada como si estuviera compuesta de una matriz homogénea células y del polímero extracelular que enlaza a estas en la superficie (Sáenz y Rittmann, 1988).

La inmovilización de microorganismos es el proceso por el cual se adhieren células a un material sólido que actúa como soporte en un reactor biocatalítico. Hay muchas técnicas para inmovilizar microorganismos dentro de un biorreactor. Para reactores de tratamiento de aguas, la más importante es la colonización espontánea en la superficie del soporte. Muchos microorganismos tienen la habilidad natural de colonizar superficies y, algunas veces, esta característica puede ser perjudicial; por ejemplo, puede acelerar la corrosión en sistemas de distribución de agua, incrementar la resistencia a la transferencia de calor en intercambiadores, etc. (Characklis y Wilderer, 1989)

1.10.2. Naturaleza de las biopelículas

Los procesos y factores que se observan en las biopelículas y que son determinantes para su desarrollo son:

1. Transporte de materia desde el seno del fluido hacia la superficie de la biopelícula fija en el soporte.
2. Metabolismo microbiano dentro de la película. El crecimiento microbiano y la producción de polímeros extracelulares contribuyen al incremento del espesor de la biopelícula facilitando la adherencia de sólidos inorgánicos suspendidos.
3. El esfuerzo de corte en la superficie de la película puede limitar el depósito y crecimiento global de la biopelícula.
4. Las propiedades físicas de la superficie del soporte influyen el micromezclado cerca de la superficie.

5. La tasa de muerte debido a la presencia de compuestos que inhiben la actividad metabólica de los microorganismos, además de la falta de nutrientes o fuentes de carbono facilitan el desprendimiento o destrucción de las biopelículas.

En las películas biológicas, la materia orgánica es absorbida y metabolizada por las células situadas en las capas superficiales. Uno de los problemas que se presentan durante el metabolismo y crecimiento de la colonización de microorganismos es el aumento de las resistencias a la transferencia de masa interfacial y a la difusión intrapartícula de oxígeno y sustrato, que es proporcional al espesor de las biopelículas.

La estructura física, química y biológica de una biopelícula está influenciada por su ambiente. La superficie de la biopelícula es altamente adsorbente y puede obtener cantidades significativas de sales, arcilla y otros compuestos presentes en aguas naturales.

Como ya se ha mencionado, el desarrollo de una biopelícula involucra una diversidad de aspectos que dificultan la representación fenomenológica de los procesos que se llevan a cabo en el espesor activo utilizando un modelo matemático, por lo que en muchas ocasiones sólo se considera un cierto espesor de la película biológicamente activa y es en esta región donde se llevan a cabo los procesos de difusión-reacción, sin que haya actividad en las capas más internas. El grosor de la capa activa de la biopelícula se puede estimar en cerca de 100 μm de acuerdo con el uso de modelos matemáticos de difusión y reacción (Pirt, 1975). Este grosor corresponde a la delgada capa de células que tiene acceso al oxígeno y que al consumirlo, dejan anóxicas a las capas más profundas de una biopelícula.

Por lo tanto, resulta importante la evaluación de los parámetros cinéticos de crecimiento de *A. niger* Aa20 con extracto de acacia como fuente de carbono y energía en matraces agitados y observar si tiene la capacidad de formar biopelícula sobre algún soporte rígido y poroso para posteriormente pensar en el funcionamiento de un reactor de biopelícula destoxificador de taninos de curtidurías.

1.11. Contaminación del agua

La contaminación del agua es un factor que degrada nuestro medio y debe evitarse que las descargas industriales con materiales tóxicos, como los desagües de la ciudad de León, Guanajuato, contaminen las cuencas fluviales cercanas con materiales tóxicos y poco biodegradables como los taninos residuales de las tenerías, pues de otra forma, se dificulta mucho el ciclo de reúso del agua a través de la agricultura o de su disposición final en las descargas a los ríos o al mar.

En este caso, el tratamiento especializado de las descargas con taninos puede servir de ejemplo para resolver otros problemas de tratamiento de descargas de aguas residuales contaminadas con material tóxico y poco biodegradable, si se logra establecer un método biológico especializado que elimine o reduzca la toxicidad de los taninos para su ulterior tratamiento en plantas de tipo anaerobio, que usualmente pueden manejar descargas con muy altos niveles de demanda química de oxígeno (DQO), por ejemplo: superiores a 10 g/L, ya que las plantas convencionales de tipo aerobio (lodos activados), solamente pueden manejar con eficiencia descargas menores a 2 g/L de DQO debido a limitaciones físicas de la transferencia de oxígeno al agua, puesto que este gas es muy poco soluble en este líquido. Y para darles un tratamiento adecuado tendrían que diluirse las descargas ricas en taninos con aguas relativamente limpias, lo cual aumentará el volumen del agua contaminado y el costo de los reactores requeridos para ese fin. De ahí que sea necesario revisar brevemente la estructura de los sistemas de tratamiento de aguas residuales.

1.11.1. Tratamiento de aguas residuales

El tratamiento de aguas residuales comprende varias etapas: en el tratamiento preliminar se efectúa la remoción de sólidos de alta densidad o tamaño que se encuentren suspendidos en la corriente, mediante rejillas. Posteriormente, la corriente pasa al **tratamiento primario**, cuyo objetivo es la remoción de materia sólida suspendida, mediante tanques sedimentadores en donde se elimina el 30% de la DQO. Después pasa al **tratamiento secundario**, donde se elimina la materia orgánica disuelta por acción microbiana. Los sistemas más utilizados son

los reactores biológicos continuos agitados, empacados, de escurrimiento, lecho fluidizado, anaerobios y tanques de aireación con lodos activados. Cabe señalar que el sistema más adecuado para tratar agua residual con más de 1 g/L de materia orgánica suspendida es el anaerobio, porque no requiere de agitación ni de aireación. Por eso es importante que las descargas no contengan residuos tóxicos que reduzcan la transformación de la materia orgánica en metano y bióxido de carbono. Finalmente el **tratamiento terciario** consistente en una serie de métodos físicos y químicos para eliminar impurezas (adsorbedores, tanques de cloración, etc.).

Como se indicó anteriormente, la industria del curtido de pieles arroja al ambiente taninos que resultan tóxicos para los reactores de tipo anaerobio. (Field *et al*, 1987, 1989, 1990). Por lo que se hace necesario introducir un pretratamiento aeróbico previo al sistema secundario para aumentar la biotratabilidad de los efluentes sin recurrir a su dilución y para ello se propone el empleo de un reactor aeróbico con un cultivo de un microorganismo que sea resistente a los taninos y capaz de degradarlos, como sería el caso de *Aspergillus niger*.

De ahí que la evaluación del efecto de los taninos sobre la producción de metano por lodos de digestores anaerobios sea un índice importante para juzgar la tratabilidad de este tipo de descargas.

1.12. Propuestas alternativas o complementarias para el reúso y tratamiento de los efluentes de curtidurías.

En el Instituto Tecnológico de Celaya, se ha desarrollado un método para precipitar la mayor parte de los taninos condensados reactivos con proteínas que se encuentran en las aguas residuales de las curtidurías. Una fábrica, cerca de León, Gto., usa esa técnica para reutilizar los taninos condensados como materia prima de las propias curtidurías. Sin embargo, los efluentes finales resultantes, contaminados con taninos poco reactivos hacia las proteínas, ya sea porque sean de tipo hidrolizable o porque son taninos condensados de bajo peso moleculares pequeños, seguirían siendo un problema ambiental, pues se sabe que los taninos de bajo peso molecular son precisamente los más tóxicos para las bacterias metanogénicas

(Field, *et al.*, 1990). Por lo tanto, sigue siendo de gran interés estudiar sistemáticamente la biodegradabilidad de las distintas fracciones de los taninos de acacia usados en las curtidurías para desarrollar en un futuro cercano un proceso integral para la recuperación parcial de los taninos condensados y para el tratamiento final por medio de reactores biológicos, hasta convertir a estos residuos en bióxido de carbono y metano.

2. Planteamiento del problema

2.1 Esquema del proceso por estudiar

El efecto de los polifenoles sobre muchos organismos marca la preocupación del tratamiento de los efluentes de las industrias que los contienen. Dado que los efluentes de las curtidurías contienen altas concentraciones de taninos de bajo peso molecular, el tratamiento biológico convencional se ve limitado (Field, *et al.*, 1990), por eso se ha pensado en la posibilidad de realizar algunas modificaciones a los sistemas de tratamiento anaerobio para poder efectuar la degradación de dichas sustancias. Existen dos opciones de pretratamiento de los efluentes antes de entrar al digester anaerobio, como se muestra en la Figura 6.

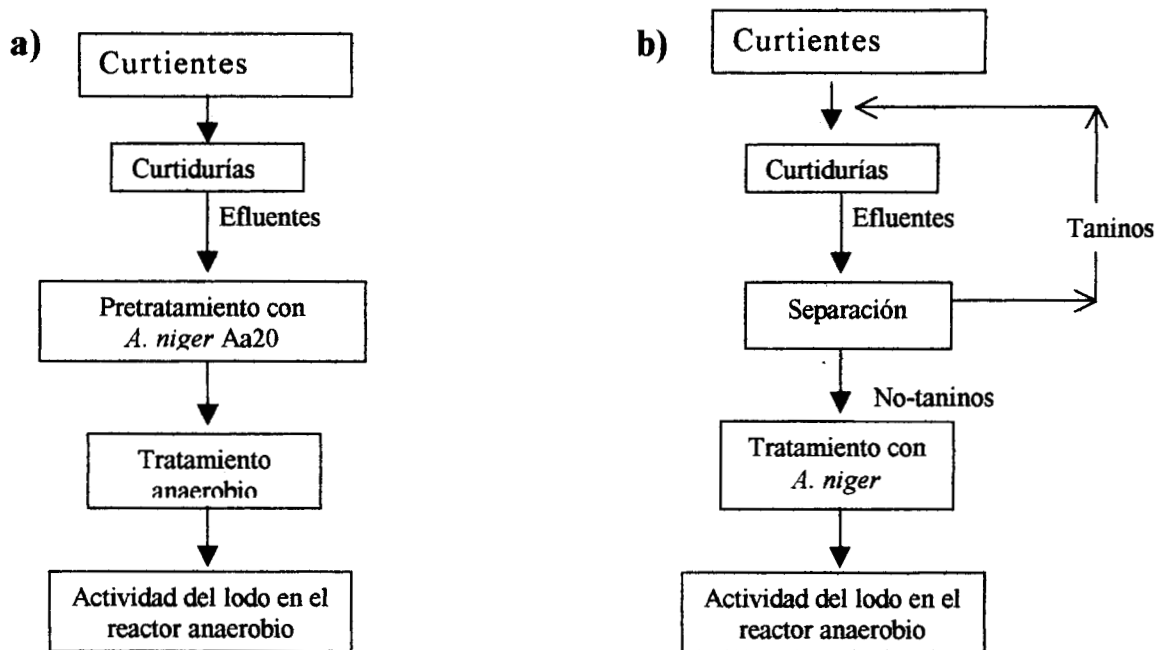


Figura 6 Esquema del posible tratamiento de efluentes de las curtidurías

La presente investigación es para estudiar la factibilidad de cada una de las dos opciones propuestas. Si *A. niger* puede degradar taninos y no-taninos se preferirá la primera alternativa, de otra forma será la segunda la más adecuada.

225548

Para la realización de la presente tesis se pensó en un reactor biológico con *Aspergillus niger* Aa20 inmovilizado en un soporte inerte, rígido y poroso para estudiar la degradación de los taninos de acacia* y destoxificar los efluentes, ya que se ha observado, como se indicó en los antecedentes, los *Aspergilli* no producen madejas al estar en contacto con taninos. Por el contrario, tiende a pegarse en las paredes y en la propela de los reactores formando biopelículas de aproximadamente 1 mm de espesor.

2.2. Modelo teórico del crecimiento y del metabolismo de Aspergillus niger crecido sobre el extracto de acacia

Una parte importante de este trabajo es la descripción cinética del crecimiento de *Aspergillus niger* Aa20 sobre el curtiente vegetal, para determinar si es posible la biodegradación de distintas fracciones de los taninos. Así que los parámetros de crecimiento de *A. niger* sobre el extracto de acacia como fuente de carbono y energía se evaluarán en reactores por lote en medio líquido y se observará el efecto de la concentración sobre su crecimiento, también se verificará el efecto de destoxificación para efectuar el tratamiento anaerobio.

En el biorreactor por lote, el tanque se llena con un medio de cultivo adecuado e inoculado con el microorganismo elegido para iniciar la biorreacción hasta que los nutrientes han sido consumidos hasta la máxima capacidad del microorganismo.

Normalmente el número o cantidad de células vivas en el cultivo por lote varían con el tiempo como se muestra en la Figura 7.

A nivel macroscópico la velocidad de crecimiento de los microorganismos puede estimarse usando ecuaciones basadas en aspectos fenomenológicos observados, como por ejemplo la cantidad de biomasa máxima producida.

* se eligió este extracto por ser el más utilizado actualmente por la industria del curtido de pieles

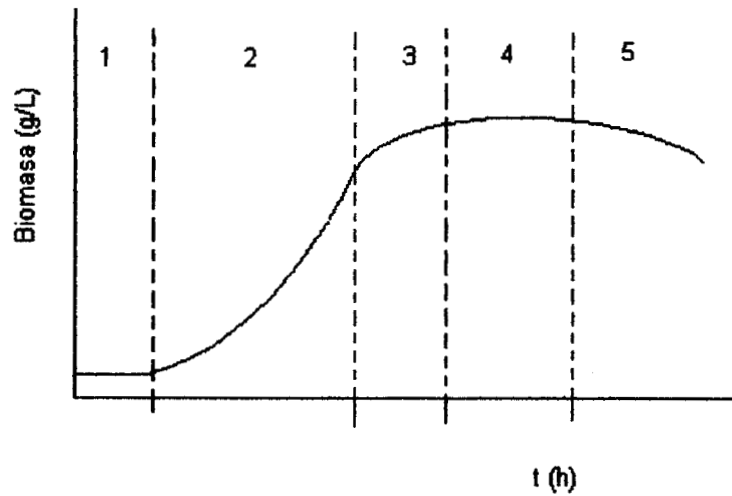


Figura 7 Patrón del crecimiento típico de microorganismos en cultivos por lote
 La curva de crecimiento consiste de (1) fase lag, (2) fase de crecimiento exponencial, (3) decaimiento del crecimiento, (4) fase estacionaria y (5) fase de muerte.

La ecuación de crecimiento propuesta para describir el crecimiento de *A. niger* Aa20 sobre extracto de acacia en reactores por lote es la ecuación logística que incluye el termino de inhibición por crecimiento (Iwai; S. y Kitao, T., 1994):

$$\frac{dX}{dt} = \mu X(1 - \beta X) \quad (1)$$

donde μ y β son constantes y $X(0) = X_0$, μ representa la velocidad específica de crecimiento del microorganismo determinada por la concentración de sustrato y $\beta = \frac{1}{X_{\max}}$.

La ecuación (1) se integra para obtener la ecuación 2, donde la concentración de biomasa en la fase estacionaria es X_{\max} , así pues:

$$X = \frac{X_0 e^{\mu t}}{1 - \beta X_0 (1 - e^{\mu t})} \quad (2)$$

El coeficiente $\mu = \mu(S)$ corresponde a la velocidad específica de crecimiento, cuando el sustrato tiene el nivel S y X_{\max} es el máximo nivel de la biomasa.

En la Figura 8 se presenta un esquema de los modelos de crecimiento de los microorganismos. La función $\mu = \mu(S)$ puede ser una curva de saturación de Monod, pero si el sustrato es tóxico a altas concentraciones, el crecimiento del microorganismo disminuye al incrementar la concentración de sustrato y esta situación se describe con la ecuación de Monod modificada por Haldane (Carlson, 1999):

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_I}} \quad (3)$$

Donde μ_{\max} es la velocidad específica de crecimiento máxima para el microorganismo, S es la concentración de sustrato, K_s es la constante de afinidad, que es la concentración de sustrato en la que la velocidad específica de crecimiento es igual a $\frac{\mu_{\max}}{2}$. Si el valor de esta constante es muy pequeña nos dice que el microorganismo tiene una afinidad muy grande por el sustrato y si el valor es muy grande la afinidad será menor. K_I es la constante de inhibición, si su valor es grande la fuerza inhibitoria es pequeña.

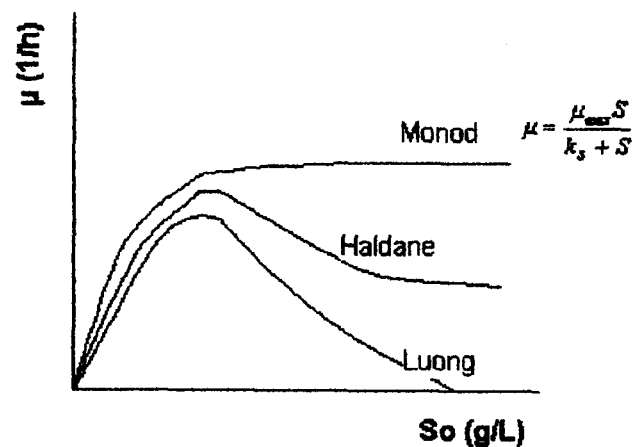


Figura 8 Modelos de crecimiento con inhibición por sustrato

Cuando el sustrato contiene compuestos que son tóxicos, como es el caso de los taninos, el fenómeno puede estar descrito de mejor manera con la ecuación de Monod modificada por Luong:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S} \left(1 - \frac{S}{S^*} \right) \quad (4)$$

Donde μ_{\max} , S y K_S tienen el significado ya descrito anteriormente y S^* es la concentración límite del sustrato, es decir, a mayores concentraciones que esta el crecimiento se inhibe completamente.

La evaluación del modelo que mejor describa el crecimiento de *A. niger* con los extractos curtientes vegetales, será el que permita diseñar mejor el proceso de crecimiento y degradación de los sustratos. Para ello se hace necesario ligar el crecimiento con una ecuación de consumo, la más sencilla es de la siguiente forma:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{x/S}} \frac{dx}{dt} + mx \quad (5)$$

Si el coeficiente de mantenimiento (m) es muy pequeño, se puede estimar el rendimiento a partir de la siguiente relación:

$$Y_{x/S} \approx -\frac{dx}{dS} = \frac{x - x_0}{S_0 - S} \quad (6)$$

Esta forma fue la utilizada para relacionar los cambios entre x y S .

3. Hipótesis

- Es posible degradar al menos parcialmente, los taninos de acacia de un efluente modelo de tenerías mediante el uso de un pretratamiento con *A. niger* para reducir la toxicidad sobre las bacterias anaerobias.
- Posiblemente *A. niger* degrade en forma preferente los compuestos con bajo poder curtiente que los taninos, asociados con la propiedad de fijarse a las proteínas del cuero.

4. Objetivo

4.1. Objetivo general

Reducir la toxicidad de los efluentes modelo de tenerías con taninos de acacia mediante un pretratamiento con *Aspergillus niger*.

4.2. Objetivos particulares

- Fraccionamiento del curtiente en sólidos tánicos y no-tánicos.
- Evaluación de la toxicidad del extracto de acacia sobre las bacterias anaerobias.
- Evaluación del crecimiento de *Aspergillus niger* Aa20 sobre el curtiente vegetal como fuente de carbono y energía, libre e inmovilizado usando fracciones de taninos y no-taninos
- Obtención de parámetros cinéticos de *A. niger* libre, crecido en medio líquido, con el curtiente vegetal como fuente de carbono y energía.
- Determinación de la destoxificación de los efluentes modelo midiendo la actividad metanogénica de las bacterias anaerobias después del pretratamiento con *A. niger*.
- Evaluación de la desaparición de distintas fracciones de los curtientes de acacia por el crecimiento de *A. niger*.
- Montaje de un reactor de laboratorio, operado por lote que degrade parcialmente los taninos de curtientes vegetales.

5. Materiales y métodos

5.1. Microorganismo

Se utilizó una cepa de *Aspergillus niger*, que forma parte de la colección UAM-IRD, que viene de Checoslovaquia y, caracterizada en 1997 en el Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences, Barn, Holanda.

Se escogió la cepa Aa20 porque los trabajos realizados por Ramírez (2000) mostraron que fue capaz de crecer en medio mínimo y 10% de ácido tánico como única fuente de carbono y energía. Además la producción de tanasas por este hongo tenía la más alta actividad específica (de las diversas cepas probadas) y posteriormente se encontró que la tanasa producida por este hongo no era específica, es decir, que podía degradar diferentes tipos de taninos.

5.2. Medio de propagación y conservación de la cepa

La propagación de la cepa de *A. niger* Aa20 se realizó sobre agar papa dextrosa (PDA) en matraces Erlenmeyer de 250 mL incubados a 30 °C durante 96 horas. El medio se esterilizó a 121 °C y 1.02 bar durante 15 min.

La conservación de la cepa fue hecha con el hongo crecido durante 96 h sobre PDA estéril, en tubos microbiológicos, almacenados a 4 °C y resembrada cada mes.

5.3. Medio líquido para la degradación de taninos

El medio líquido utilizado para crecer *A. niger* Aa20 se describe en la Tabla 3 que fue usado para producir tanasas por *Aspergillus niger* PKL 104 por Lekha y Lonsane (1994). La variación en la fuente de carbono (extracto de acacia) estuvo acompañado de un ajuste proporcional de la fuente de nitrógeno y fósforo para mantener la relación C/N = 10 y C/P=20, el pH se ajustó con NaOH 1N. El medio mineral se esterilizó por separado (ver sección 5.2) y el extracto de acacia se esterilizó por filtración con membranas de 0.45 µm

Tabla 3 Composición del medio utilizado para crecer *A. niger* Aa20

<i>Compuesto</i>	<i>g/L</i>
KH ₂ PO ₄	0.53
NH ₄ NO ₃	0.69
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.02
MnCl ₂ ·6H ₂ O	0.004
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.002
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.0025
Extracto de acacia	5
pH	5.5

5.4. Condiciones de crecimiento de *A. niger* Aa20

Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 50 mL de medio líquido, incubados a 30 °C y 220 rpm, el muestreo se realizó cada seis horas. Todos los experimentos se realizaron por duplicado y los resultados muestran el promedio de los mismos.

5.4.1. Cosecha de esporas

Para la preparación del inóculo se adicionó a un matraz que contenía al hongo crecido durante 96 h sobre PDA, 10 mL de solución estéril de Tween 80 al 0.01% en agua destilada. Se agitó suavemente con una barra magnética estéril para desprender las esporas. Se realizó el conteo de esporas al microscopio en cámaras de Neubauer y se tomó la cantidad necesaria para inocular 5×10^7 esporas/mL en 50 mL de medio.

5.4.2. Cuantificación de la biomasa por peso seco

Se filtró el volumen de medio contenido en los matraces usando una bomba de vacío, a través de papel Whatman No 1, llevado previamente a peso constante, y haciendo 3 lavados de la torta con agua destilada. Posteriormente se metieron a la estufa a 105 °C durante 24 horas y después se enfriaron en un desecador, pesándose las muestras en una balanza analítica. El peso seco de la muestra se obtuvo por la diferencia del peso del papel filtro antes y después de haber filtrado la muestra dividido entre el volumen de medio filtrado, el resultado se reportó en $\text{g}_{\text{peso seco}}/\text{L}_{\text{medio}}$

5.5. Análisis del extracto de acacia

El extracto curtiente vegetal se analizó de acuerdo con López y Hernández (1986), en el cual se describe toda la metodología para preparar la muestra y encontrar la composición de taninos y no-taninos presentes en el extracto curtiente utilizado en este trabajo de investigación. En esencia, este método mide la proporción de los sólidos que son retenidos por una cantidad conocida de polvo de cuero. A los sólidos así removidos de la solución se les llama taninos y a la diferencia no-taninos.

El polvo de cuero, usado comúnmente por los laboratorios de las curtidurías para evaluar la potencia curtiente de los extractos vegetales, se compró en el Centro de Investigación y Asesoría Tecnológica en Cuero y Calzado A.C., Gto.

5.6. Técnicas analíticas del medio de cultivo

Se han desarrollado diferentes metodologías para el análisis de degradación de taninos, hidrolizables y condensados como es el uso de polivinilpirrolidona, HPLC, cromatografía en capa fina y, finalmente, los métodos colorimétricos que resultan muy sencillos y rápidos de realizar. (Field *et al.*, 1987, 1988 y 1989, Banwart *et al.*, 1985; Galoitou-Panayotou y Macris, 1986; Canas, 1999; Inoue *et al.*, 1988; Price *et al.*, 1978; Sun *et al.*, 1998).

El análisis de la degradación del extracto de acacia se basó en la cuantificación de los no-taninos (azúcares y ácido gálico) y taninos (flavanoles y antocianidinas) por medio de métodos colorimétricos descritos a continuación.

5.6.1. Azúcares totales

Los azúcares totales se midieron con el reactivo de antrona, que se preparó disolviendo 200 mg en 100 mL de ácido sulfúrico concentrado, del cual se adicionaron 2 mL a 1 mL de muestra, en tubos de ensaye; se calentaron por 10 min, se enfriaron en hielo y se leyó en el espectrofotómetro a 625 nm. La curva patrón se hizo con diluciones de una solución de sacarosa de 100 mg/L.

5.6.2. Ácido gálico

Se utilizó el método reportado por Inoue y Hagerman (1988) con rodanina, que se preparó en metanol al 0.667%, de este reactivo se adicionaron 1.5 mL a 1 mL de muestra. Después de 5 min se adicionó 1 mL de KOH 0.5N, después de 2.5 min, la mezcla fue diluida a 25 mL con agua destilada, se agitó en un vortex y se dejó reposar entre 5 y 10 min para leer la absorbancia a 520 nm. La curva patrón se hizo con diluciones de una solución de ácido gálico 0.5 g/L.

5.6.3. Antocianidinas

Se usó un método de despolimerización con sulfato ferroso en ácido clorhídrico y butanol. Consiste en la transformación de proantocianidinas (taninos condensados) en antocianidinas, originando un color rojo que se leyó en el espectrofotómetro a 550 nm. Se disolvieron 0.7 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 50 mL de ácido clorhídrico concentrado y se aforó a 1000 mL con n-butanol. Se adicionaron 7 mL de este reactivo a 500 μL de muestra, en un tubo de ensaye bien tapado, se calentó en baño maría 100 °C durante 40 - 60 min, se enfriaron con hielo y se leyó en el espectrofotómetro (Swan y Hillis, 1959).

Para esta técnica no se contó con estándares para la curva patrón, así que sólo se midió el cambio de absorbancia durante el crecimiento de *A. niger* Aa20.

5.6.4. Monómeros y polímeros de flavanoles

Se utilizó el método con el reactivo de vainillina, reportado por Sun *et al.* (1998), específico para monómeros y polímeros de flavanoles.

Se adicionó a 1 mL de muestra: 2.5 mL de H_2SO_4 9N en metanol y 2.5 mL de vainillina al 1% en metanol, se agitó en un vortex y se dejó reposar durante 15 min a una temperatura de 30 °C, posteriormente se leyó en el espectrofotómetro a 500 nm. Sólo se midió el cambio de absorbancia durante la degradación del extracto de acacia.

5.7. Medio anaerobio para pruebas metanogénicas

La composición del medio de cultivo basal para realizar las pruebas de la actividad metanogénica del lodo anaerobio se describe en la Tabla 4. El pH se ajustó con ácido clorhídrico 1N y se esterilizó como se describe en la sección 5.2. Se esterizaron por separado la solución de acetato de sodio 1M y la de Na₂S 2%, y se adicionó un volumen de 5 mL de la solución de taninos que se requería para cada experimento en cada botella serológica.

Tabla 4 Composición del medio de cultivo anaerobio

<i>Medio de cultivo anaerobio (por litro)</i>	
Solución mineral 1	50 mL
Solución mineral 2	50 mL
Solución de oligoelementos	10 mL
Solución de vitaminas	10 mL
Solución de cloruro de níquel (0.005%)	10 mL
Solución de sulfato ferroso (2.5%)	1 mL
Solución de resarsurina (0.1%)	1 mL
Peptona de caseína	0.1 g
Extracto de levadura	0.1 g
Bicarbonato de sodio	2 g
Cisteína	0.5 g
pH	7 ± 0.2
Acetato de sodio (1M)	10 mL
Na ₂ S (2%)	10 mL

225548

5.7.1. Sistema experimental para medir actividad metanogénica

Se utilizaron botellas serológicas de 60 mL, con 20 mL de medio, en baño de temperatura controlada a 35 °C, la concentración de lodo metanogénico se representa como sólidos suspendidos volátiles (SSV), fueron 1.5 g SSV·l⁻¹. La actividad metanogénica, del lodo, se midió indirectamente por el desplazamiento de una columna de NaOH 1N en el sistema mostrado en la Figura 9.

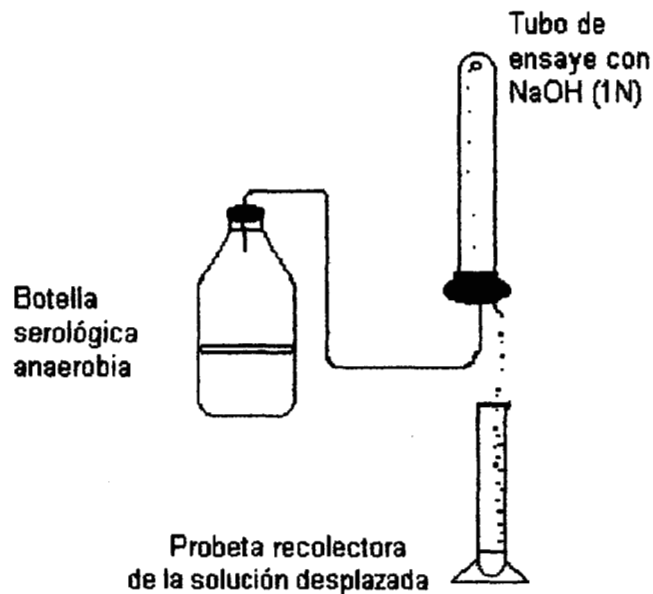


Figura 9 Esquema del sistema para medir la actividad metanogénica

6. Resultados

El análisis del extracto de acacia es parte fundamental en este trabajo debido a que se conoce que en este tipo de materiales se encuentran taninos condensados en alta proporción (López y Hernández, 1986). Como ya se ha explicado en la sección 1.5.2 son los de más difícil degradación. Otra parte importante es la influencia de los taninos condensados sobre la actividad metabólica de las bacterias anaerobias. Finalmente, se procura averiguar si *Aspergillus niger* Aa20 es capaz de crecer con extracto de acacia como fuente de carbono y energía, destoxificándolo para poder tratar los efluentes en los reactores anaerobios.

6.1. Análisis del extracto de acacia

Como se muestra en la Figura 10a, el extracto de acacia tiene 88% de materia orgánica y está formado por taninos y no-taninos (Figura 10b). Dentro de los no-taninos se encuentran los azúcares (10 %), el ácido gálico(0.4 %), los monómeros de flavanoles (8 %) y cenizas (9 %) (Figura 10c y Tabla 5). Los monómeros, al ser taninos de bajo peso molecular no interaccionan con la proteína de la piel que se desea curtir y no se consideran dentro de los curtientes.

Tabla 5. Composición porcentual total de los no-taninos

<i>Componente</i>	<i>Composición total (%)</i>
Taninos	63
No-taninos:	
<i>Azúcares totales</i>	10
<i>Ácido gálico</i>	0.4
<i>Monómeros de flavanoles</i>	8
<i>Cenizas</i>	9
<i>Otros</i>	9.6

Debido al alto porcentaje de taninos se piensa que el extracto puede resultar tóxico para las bacterias anaerobias, pero se observa que existen otros componentes que podrían ser consumidos, como los azúcares que forman parte importante de los no-taninos y constituyen

aproximadamente el 10 % del extracto de acacia. Los azúcares son un sustrato más fácilmente biodegradable. Por este motivo cabe resaltar que se requiere un microorganismo que además de degradar los azúcares ataque los flavanoles y otros compuestos.

Las sales minerales, cuantificadas como cenizas, también aportan nutrientes que son de suma importancia para el desarrollo de los microorganismos (Stanier, R.Y. *et al*, 1986).

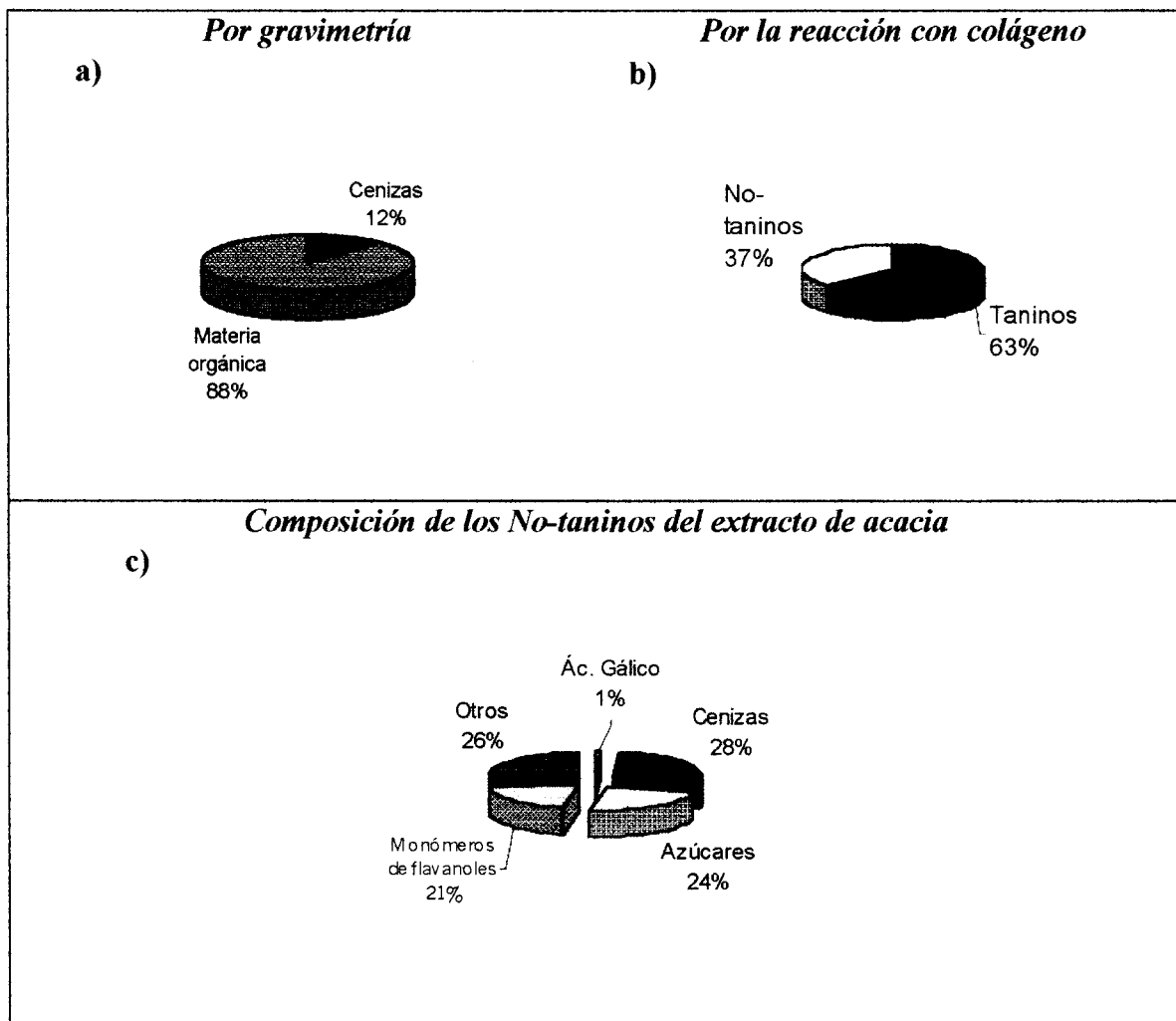


Figura 10 Composición de los sólidos del extracto de acacia

Las cantidades de ácido gálico en el extracto de acacia hacen pensar que la proporción de taninos hidrolizables es pequeña en relación con los taninos condensados. Existe otra fracción no caracterizada y que bien podrían tratarse de gomas, fibras, ácidos grasos, proteínas, etc. debido a que la materia prima es un extracto vegetal complejo, pero para los fines del trabajo realizado, los análisis propuestos son englobados dentro de los no-taninos.

6.2. Autoxidación de taninos

Los taninos de bajo peso molecular son inhibitorios de la actividad metabólica de las bacterias anaerobias, pero al darse su polimerización autooxidativa se forman taninos de alto peso molecular (Field, J. *et al.*, 1990). Así, cualquier tratamiento que se le de a los efluentes modelo con taninos de acacia, podría tener un efecto favorable debido principalmente a las reacciones de las moléculas que lo componen. Por esta razón se midió el efecto inhibitorio del extracto de acacia sobre la metanogénesis. Para esta prueba se usaron diferentes concentraciones de extracto de acacia (50, 100 y 150 ppm) con soluciones expuestas al medio ambiente.

Después de 21 días de haber preparado la solución, almacenada a 4 °C (Tabla 6) se observa que el efecto de añejamiento, por acción de la luz y de la cantidad de oxígeno presente en la solución del extracto de acacia, es despreciable sobre la toxicidad en las bacterias anaerobias, pues los niveles de producción de metano fueron casi los mismos comparados con la solución recién preparada. Por lo que se deduce que la autoxidación de los taninos del extracto de acacia bajo las condiciones especificadas, no fue suficiente para disminuir su toxicidad.

Tabla 6 Efecto de la oxidación de taninos sobre la metanogénesis

<i>Solución usada</i>	<i>Actividad metanogénica (mg DQO /d * gSSV)</i>			
	0 ppm	50 ppm	100 ppm	150 ppm
0 días	17	17	16	12
21 días	17	17.6	17	13

6.3. Efecto de la concentración del extracto de acacia sobre la metanogénesis

Se preparó un medio anaerobio descrito en la sección 5.7 con acetato de sodio y extracto de acacia como inhibidor. Se usaron 8 diferentes concentraciones del extracto y se observó su efecto sobre la metanogénesis de las bacterias anaerobias como se presenta en la Figura 11a.

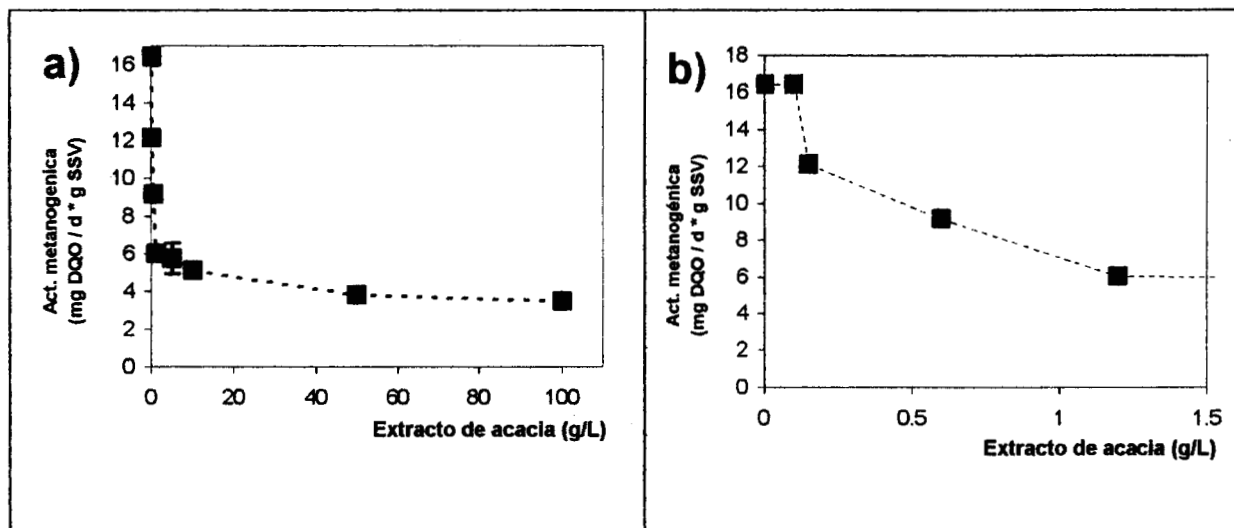


Figura 11 Efecto de la concentración del extracto de acacia sobre la metanogénesis

Claramente pueden observarse dos regiones, la primera se encuentra en el rango de 0-1 g/L (Figura 11b) donde la disminución de la actividad metanogénica es rápida, con estos datos se calculó la dosis letal 50 (LD_{50}), que es la concentración de extracto de acacia en que la actividad metanogénica de los lodos anaerobios disminuye 50 %, encontrando de esta manera que la LD_{50} es de 0.8 g/L.

Puede observarse la segunda región a partir de 5 g/L (Figura 11a) donde la inhibición de la actividad metanogénica es más lenta, cambiando del 65% al 79% con 100 g/L de extracto de acacia.

Con este resultado se muestra que el extracto de acacia, debido a su alto contenido de taninos condensados, es tóxico para las bacterias anaerobias, con lo cual se justifica el desarrollo del

proceso de pretratamiento de taninos con *A. niger* para estudiar la posibilidad de reducir la toxicidad de los mismos sobre las bacterias metanogénicas.

Se puede determinar que a bajas concentraciones (5 g/L) del extracto de acacia las bacterias anaerobias presentan una actividad baja. Esto es de suma importancia porque la concentración en los efluentes de las tenerías llega a ser hasta 15 veces mayor, por lo tanto los reactores de tratamiento no serían capaces de efectuar la degradación de este material.

6.4. Crecimiento de *A. niger* Aa20 en medio líquido con extracto de acacia como fuente de carbono y energía

Se requirió conocer si *A. niger* Aa20 crecía sobre el extracto de acacia como fuente de carbono y energía en medio líquido, entonces se probó la concentración de 5 g / L. Al observar que existía crecimiento del hongo se decidió triplicar la concentración y analizar su crecimiento como micelio libre y mostrar si era capaz de colonizar de manera espontánea el soporte que se utilizará en el reactor para inmovilizar micelio (Figura 12). Se utilizó como soporte para formación de la biopelícula fibra tipo Scotch-Brite™.

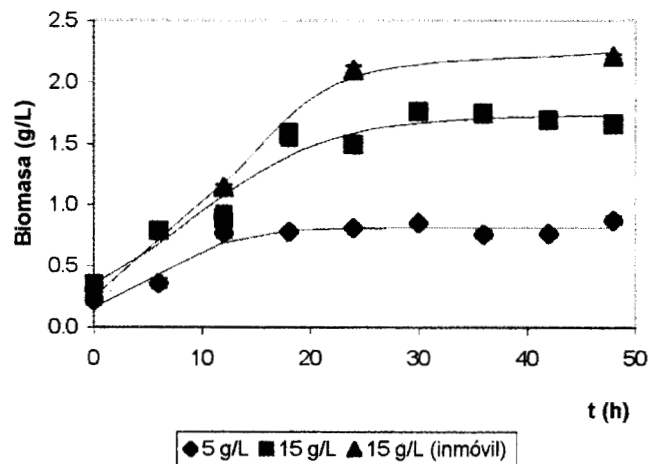


Figura 12 Crecimiento de *A. niger* Aa20 sobre extracto de acacia como única fuente de carbono y energía, y colonización del soporte.

Se encontró que el micelio se pegaba a las paredes de los matraces y los micelios desprendidos de la pared crecían dispersos en el medio, sin formar las madejas que comúnmente forman los hongos filamentosos al crecer en medios de cultivo líquido con agitación.

La cantidad de biomasa final aumentó al doble al triplicar la concentración inicial de fuente de carbono, lo cual indicó un aprovechamiento mayor de los nutrientes. Además se observó que podía colonizar de buena forma el soporte de plástico utilizado.

En base a la estimación del rendimiento aparente biomasa/sustrato (Tabla 7) y con el análisis porcentual del extracto de acacia se podría saber que fracción se degradaría por el cultivo de *A. niger*, suponiendo su total asimilación. Cabe mencionar que cuando los hongos son crecidos en glucosa como fuente de carbono el rendimiento $Y_{x/S}$ es ≥ 0.4 (Larralde, 1996) Si el organismo no atacase los taninos, que son moléculas complejas, el rendimiento aparente $Y_{x/S}$ sería menor a 0.2. Por lo tanto, rendimientos mayores implican que el organismo si es capaz de atacar al menos una parte de los taninos.

Más adelante se estima y se compara el valor de $Y_{x/S}$ medido en función de la disminución de la DQO total o de la DQO de los no-taninos, la cual indicó importantes diferencias con los valores hipotéticos de las Tabla 7 y Tabla 9.

De las diferencias entre la hipótesis de las Tabla 7 y Tabla 8 se puede sospechar que no toda la materia orgánica es degradable por *A. niger* pues el $Y_{x/S}$ aparente resultó ser 0.14 ± 0.06 a diferencia de la hipótesis $Y_{x/S} = 0.36$. Más adelante se analizará el $Y_{x/S}$ para los no-taninos.

Tabla 7. Rendimientos hipotéticos biomasa/sustrato aparente

Material consumido	$\Delta S/S_0$	$Y_{x/S}^*$
Toda la materia orgánica	0.90	0.36
Taninos	0.45	0.20
No-taninos	0.27	0.11
Azúcares	0.07	0.03

* Rendimiento aparente calculado como el producto del rendimiento máximo (0.4) y la fracción biodegradable ($\Delta S/S_0$). Suponiendo que la materia orgánica de cada fracción fuese completamente biodegradable

La cantidad de biomasa inmovilizada en el soporte plástico (fibra Scotch-Brite™) es 35 % mayor que con el micelio libre a la misma concentración de sustrato inicial (Tabla 8), probablemente esta diferencia se deba a que el hongo tiene más contacto con el sustrato y que por lo tanto las ramificaciones sean mayores, debido al mejor aprovechamiento de los nutrientes, entonces al inmovilizar el micelio y triplicar la fuente de carbono, la cantidad de biomasa se triplica. Los resultados de $Y_{x/S}$ comparados con los resultados de la Tabla 7 indican que el microorganismo está tomando como fuente de carbono los no-taninos porque el rendimiento aparente es ligeramente mayor a 0.1, y *Aspergillus niger* Aa20 es más resistente a los componentes tóxicos del extracto de acacia que las bacterias anaerobias, por lo tanto puede ser capaz de destoxificarlos, al menos parcialmente.

Tabla 8. Comparación del rendimiento aparente de *A. niger* Aa20 crecido en extracto de acacia

S_0 (g/L)	x_{max} (g/L)	$Y_{x/S}$ (Aparente)*
5	0.82	0.16
15	1.73	0.12
15 (para micelio inmóvil)	2.25	0.15
PROMEDIO		0.14 ± 0.06

*Calculado como x_{max}/S_0

6.4.1. Crecimiento de *A. niger* en No-taninos del extracto de acacia

En la Figura 13 se compara la producción de biomasa de *A. niger* al crecerlo sobre los no-taninos del extracto de acacia (tratado con polvo de cuero como se indica en la sección 5.5) y sobre el extracto de acacia sin tratamiento, es decir, sobre taninos + no-taninos. La producción de biomasa es mayor cuando se crece al microorganismo sobre el extracto sin tratar que cuando se trata con el polvo de cuero.

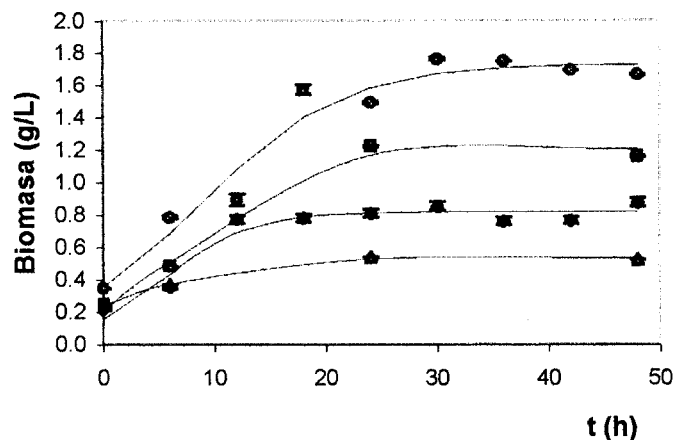


Figura 13 Efecto de los taninos y no-taninos del extracto de acacia sobre el crecimiento de *A. niger* Aa20
 ● Crecimiento de biomasa con 5 g/L de extracto de acacia (taninos + no-taninos), △ Crecimiento de biomasa con 5 g/L de extracto de acacia tratado con polvo de cuero (no-taninos), ● Crecimiento de biomasa con 15 g/L de extracto de acacia, ■ Producción de biomasa con 15 g/L de extracto de acacia tratado con polvo de cuero

Al tratar el extracto de acacia con el polvo de cuero se remueven los taninos, entonces la DQO disminuye, lo cual indica que la materia orgánica disminuye, por lo cual se puede inferir que esa materia orgánica que se remueve participa de manera importante en la producción de biomasa, aunque realizando un análisis en la Tabla 9 se observa que el rendimiento aparente es mayor cuando se crece al hongo sobre los no-taninos que sobre el extracto completo, lo cual indica la facilidad relativa para degradar la parte no curtiente y que muy probablemente los rendimientos mostrados al crecerlo sobre el extracto completo son bajos porque solamente está tomando como fuente de carbono a los no-taninos y los taninos sean componentes inhibitorios para su crecimiento, lo cual se tratará más adelante.

También se observa que no existen diferencias significativas en la velocidad específica de crecimiento entre los cultivos con sólidos totales del extracto de acacia y con no-taninos, pero si las hubo en x_{\max} y en $Y_{x/S}$, puesto que el rendimiento aparente fue mayor con no-taninos (0.26) que con el extracto total (0.14).

Tabla 9. Comparación del crecimiento del hongo con en el extracto de acacia y con los no-taninos

Sólidos Totales (S_0 [=] g/L)	x_{max} (g/L)*	μ (h^{-1})*	$Y_{x/S}$ **
5	0.82	0.21	0.16
15	1.73	0.16	0.12
No-taninos (S_0 [=] g/L)			
1.85	0.54	0.18	0.30
5.55	1.21	0.21	0.22

* Parámetros estimados por la ecuación logística

** Parámetros estimados por la relación x_{max}/S_0 y tomados de la Tabla 8

También fue medida y comparada la demanda química de oxígeno (DQO) en los medios preparados antes y después de ser tratados con el polvo de cuero y también después de haber crecido *A. niger* sobre los mismos durante 48 h. Este resultado fue confirmado al comparar la producción de biomasa en relación con la DQO residual en las fracciones tratadas con polvo de cuero (Tabla 10). Por ejemplo: en la muestra con 15 g/L de extracto de acacia, se observó un nivel de 22 ± 1 g/L de DQO y en la Figura 13 se muestra que $x_{max} = 1.7$ g/L, por lo tanto si se considera que el 50% de la DQO está asociada a materia biodegradable $Y_{x/S} = 0.15$. En cambio con el extracto residual del tratamiento con el polvo de cuero, se observó una relación $Y_{x/S} = 0.56$ que es claramente superior al rendimiento con el extracto total. Esto comprueba que *A. niger* crece principalmente sobre los no-taninos.

En la Tabla 10 se muestran las diferencias en DQO debido a los tratamientos con polvo de cuero y la subsecuente incubación de *A. niger*. Los resultados obtenidos con 5 g/L no mostraron diferencia alguna por causas indeterminadas, pero en la segunda serie de experimentos (15 g/L) si se apreciaron diferencias debido a los tratamientos.

Tabla 10 Medición de la DQO para diferentes tratamientos del medio de cultivo

Muestra	DQO (g/L)	Balance (%)	Balance teórico*
Medio 5 g/L de extracto de acacia	7.40 ± 0.1	100	
Tratado con polvo de cuero	1.00 ± 0.01	13.5	
Tratado con polvo de cuero y 48 h con <i>A. niger</i> Aa20	0.96 ± 0.1	13	
Medio 15 g/L	22 ± 1.0	100	100
Tratado con polvo de cuero	5 ± 0.1	23	27
Tratado con polvo de cuero y 48 h con <i>A. niger</i> Aa20	1.5 ± 0.02	7	

* Calculado como $-(\Delta S/S_0) \cdot 100$, $-\Delta S = Y_{x/S} \Delta x$, donde $Y_{x/S} = 0.26$ y $\Delta x = 1.21$ (Tabla 9)

Las diferencias de la DQO medidas se deben primero a que al reaccionar los taninos con el polvo de cuero se está quitando una parte importante de material orgánico, dejando sólo aquellas moléculas que no interaccionan con el colágeno, por lo tanto se considera que la medición de la DQO después de tratarlo con el polvo de cuero es sólo de la parte que conforman los no-taninos. Y la DQO medida del último tratamiento habla de la capacidad que tiene *A. niger* Aa20 de degradar los no-taninos. Los resultados obtenidos nos indican que aproximadamente el 70% de la DQO de los no-taninos es removible por *A. niger* Aa20 y la estimación del consumo de los no-taninos por *A. niger* concuerda con los datos de la Tabla 9 en donde se midió el rendimiento $Y_{x/S}$ de *A. niger* según se indica en la Figura 13.

La cantidad de materia orgánica que queda del extracto de acacia después de haber sido tratado con el polvo de cuero es menor que antes del tratamiento, pero su afinidad para el hongo es mayor debido a que se han removido los taninos condensados. Porque el rendimiento ($Y_{x/S}$) es mayor con los no-taninos que con el extracto completo.

Para analizar el efecto combinado del tratamiento con polvo de cuero y *A. niger* conviene estimar la cantidad de materia orgánica añadida.

En primer lugar, en la Tabla 10 se indica que el medio con 15 g/L de sólidos tuvo un nivel de DQO de 22 ± 1 g/L, que corresponden a 13 g/L de materia orgánica, según la Figura 10 y los no-taninos presentan 28% de la materia orgánica (Figura 10c). Por otra parte, según las Figura 10b y Figura 10c, de 15 g/L de sólidos de acacia se tendrían 5.55 g/L de no-taninos, de los cuales aproximadamente 4 g/L son materia orgánica, que corresponden según la Tabla 10, a 5 g/L de la DQO (aproximadamente 80% de biodegradabilidad). Por lo tanto, en el experimento de metanogénesis el 20% del volumen provino de la muestra de no-taninos, que tenía alrededor de 0.8 g/L de materia orgánica de no-taninos y 4.5 g/L de acetatos tiene una DQO más alta que en la muestra tratada con *A. niger* que solamente tendría 4.5 g/L de acetatos y 0.24 g/L de materia orgánica de no-taninos.

Durante el crecimiento de *A. niger* Aa20 con 15 g/L de extracto de acacia antes y después de ser tratado con polvo de cuero observamos que la diferencia de biomasa final es del 24 %.

Con 15 g/L la DQO baja 78% al tratar con polvo de cuero y se remueve hasta el 93 % de la DQO al crecer *A. niger* Aa20 durante 48 h en los restos no reaccionantes.

Un análisis importante es la actividad metanogénica de las bacterias anaerobias después de cada uno de los tratamientos dados a la solución de extracto de acacia (Figura 14), encontrando que la actividad metanogénica aumenta al remover los taninos. Los datos indican claramente que los taninos son un componente más inhibitorio sobre las bacterias metanogénicas y que los no-taninos también son inhibitorios, pero estos datos no demuestran concluyentemente que el crecimiento de *A. niger* remueva la toxicidad de los no-taninos.

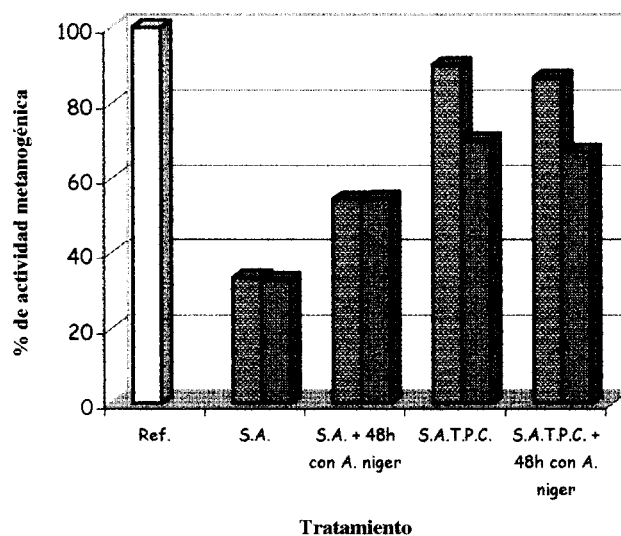


Figura 14 Comparación de la actividad metanogénica con diferentes tratamientos del extracto de acacia

- Indica la actividad metanogénica de los lodos con acetato de sodio como única fuente de carbono.
- Indica la actividad metanogénica de los lodos anaerobios con diferentes tratamientos que se le aplicaron al medio con 5 g/L de extracto de acacia.
- Indica la actividad metanogénica de los lodos anaerobios con diferentes tratamientos que se le aplicaron al medio con 15 g/L de extracto de acacia.

Abreviaturas: S.A.: Medio líquido para *A. niger* preparado como se indica en la sección 5.3 con la concentración indicada de extracto de acacia. S.A. + 48 h con *A. niger*: Es el medio líquido después de haber crecido durante 48 h *A. niger*. S.A.T.P.C.: Es el medio líquido a la concentración indicada de extracto de acacia tratado con polvo de cuero. S.A.T.P.C. + 48 h con *A. niger*: Es el medio líquido tratado con polvo de cuero y tratamiento posterior durante 48h con *A. niger*

Lo importante a destacar con estos resultados es que *A. niger* Aa20 tiene más de una fuente de carbono disponible en el extracto de acacia, sin embargo los resultados obtenidos parecen indicar que consume preferencialmente los no-taninos.

Se espera que los microorganismos tomen primero aquel sustrato que sea más sencillo de degradar y los que resultan tóxicos o no biodegradables quedan en el seno del líquido o en el mejor de los casos tienen un consumo muy lento, en este caso particular es posible que *A. niger* degrade alguna proporción de los taninos, pero esto tendría que ser estudiado con fracciones separadas de los no-taninos que no fueron obtenidas en esta tesis.

6.4.2. Efecto de la concentración del extracto de acacia sobre la velocidad específica de crecimiento

En base a los resultados anteriores sabemos que *A. niger* Aa20 puede crecer sobre el extracto de acacia. Entonces se procedió a estudiar el crecimiento de *A. niger* en varias concentraciones del extracto de acacia para observar su efecto midiendo la producción de biomasa y estimando los parámetros cinéticos de *A. niger* Aa20 crecido en medio líquido. Así, se estudiaron 8 concentraciones: 5, 15, 30, 45, 60, 75, 90 y 120 g/L, midiendo por peso seco la cantidad de biomasa producida durante 48 horas (Figura 15). Con los datos obtenidos se realizó un ajuste con el modelo logístico (Ecuación 2, sección 2.2).

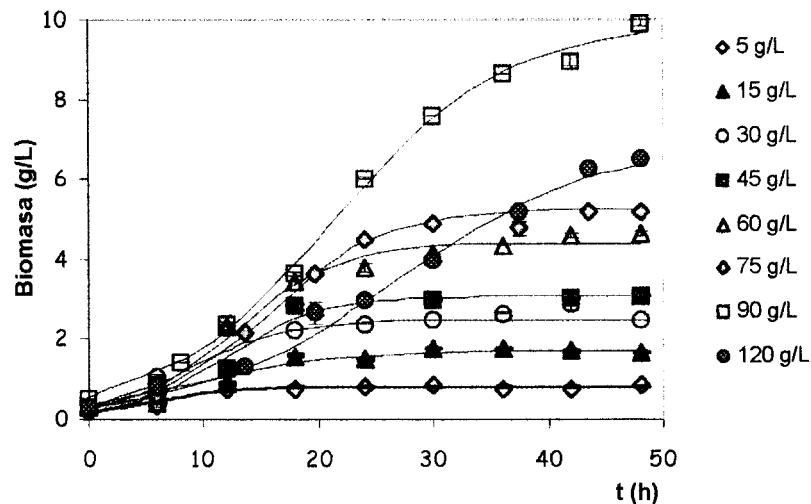


Figura 15 Efecto de la concentración del extracto de acacia sobre el crecimiento de *A. niger* Aa20

Se ajustaron los puntos experimentales a la ecuación logística para modelar el crecimiento de *A. niger* Aa20 su velocidad específica de crecimiento son satisfactorios ya que los coeficientes de correlación no lineal son en promedio de 0.97. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

Al aumentar la concentración de sustrato, la biomasa final también aumentó. Este fenómeno se dio hasta la concentración de 90 g/L, pero en 120 g/L se nota una producción de biomasa menor a la obtenida en la concentración anterior, lo cual nos da una idea de que existe inhibición por sustrato, como se ha mencionado en la sección 2.2.

Tabla 11 Efecto de la concentración de extracto de acacia sobre la velocidad específica de crecimiento y la producción de biomasa de *Aspergillus niger* Aa20

S_0 (g/L)	5	15	30	45	60	75	90	120
μ (h^{-1})	0.21	0.16	0.19	0.19	0.21	0.20	0.14	0.12
x_{max} (g/L)	0.82	1.73	2.62	3.11	4.44	5.12	9.85	6.98
R^2	0.93	0.95	0.98	0.98	0.98	1.00	1.00	0.99
$Y_{x/S}$	0.16	0.12	0.09	0.07	0.07	0.07	0.11	0.06

El rendimiento biomasa/sustrato ($Y_{x/s}$) es la expresión cuantitativa de los requerimientos nutricionales de cualquier microorganismo, así que graficando la cantidad de biomasa máxima producida (x_{max}) contra la cantidad de sustrato inicial (S_0), obtenemos que $Y \approx 0.1$ (Figura 16). Este resultado es de suma importancia ya que al tratarse de un tratamiento de agua residual, esto es conveniente, ya que es capaz de degradar los componentes de los extractos curtientes vegetales y producir poca biomasa. Pero también este resultado corrobora las estimaciones de las Tabla 7 y Tabla 10, confirmando que *A. niger* casi no degrada a la mayor fracción del extracto que son los taninos.

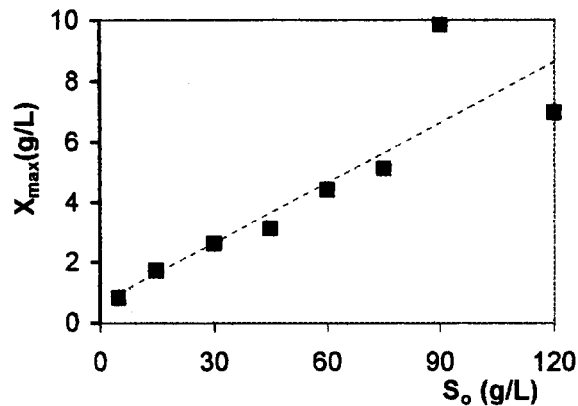


Figura 16 Efecto de la concentración del extracto de acacia sobre la producción de biomasa de *A. niger*

Por otra parte, la velocidad específica de crecimiento (μ) graficada contra S_0 (Figura 17) mostró tener una curva de inhibición para $S_0 > 60$ g/L. Este fenómeno pudo ser ajustado tanto por el modelo de Luong como por el modelo de Haldane, siendo el modelo de Luong el que mejor describe los datos obtenidos. Se estimó que el nivel de sustrato que inhibe fuertemente el crecimiento de *A. niger* es superior a 100 g/L. Este resultado es importante porque indica que aún para $S_0 > 100$ g/L, se puede observar una tasa medible del crecimiento de *A. niger*. Lo cual confirma que este organismo es muy tolerante de la acción inhibitoria de los taninos y por ello debe ser un organismo de elección para esta clase de procesos.

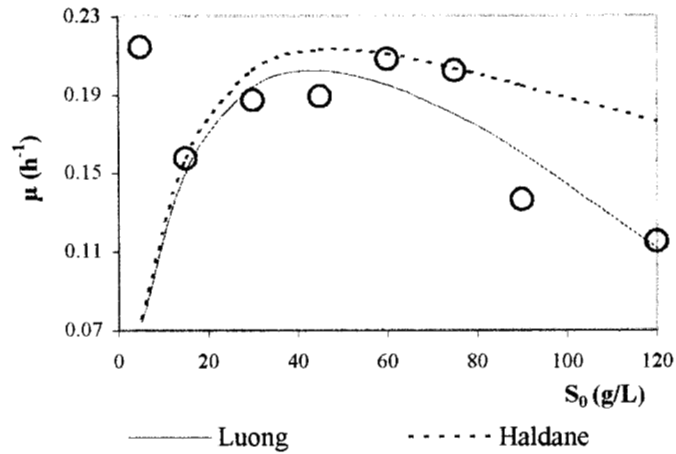


Figura 17 Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad específica de crecimiento

La velocidad específica de crecimiento (μ) estimada con el modelo logístico a 5 g/L de extracto de acacia es mayor que en cualquier otra concentración, lo que se puede deducir es que el crecimiento del microorganismo se encuentra limitado por sustrato, ya que la cantidad de nutrientes es insuficiente para que pueda mantener su metabolismo activo hacia la producción de biomasa, la fase estacionaria se alcanza a las 12 horas (ver Figura 15).

En la Figura 17 se observa que la μ incrementa conforme se va incrementado la concentración inicial de sustrato, hasta 60 g/L, concentraciones mayores a esta se observa un efecto inhibitorio.

Se estimaron los parámetros cinéticos del microorganismo para cada modelo propuesto en la sección 2.2, encontrando los resultados de la Tabla 12.

Tabla 12. Comparación de los modelos de inhibición

<i>Modelo</i>	<i>Parámetros estimados</i>
Haldane	$\mu_{\max} = 0.4 \text{ h}^{-1}$
	$K_S = 21 \text{ g/L}$
	$K_I = 110 \text{ g/L}$
Luong	$\mu_{\max} = 0.4 \text{ h}^{-1}$
	$K_S = 21 \text{ g/L}$
	$S^* = 180 \text{ g/L}$

En ambos modelos la μ_{\max} y la K_S son iguales, sin embargo con el modelo de Haldane encontramos que la $S_{\text{crit}} = 48 \text{ g/L}$ (calculada como $[K_S K_I]^{0.5}$), la cual concuerda con los valores de la Figura 17, para lo cual μ alcanza un valor máximo. Vemos que después de esta concentración predice el efecto inhibitorio muy lento, y esto en comparación con los resultados obtenidos no es satisfactorio. En cambio, con el modelo de Luong se obtiene que la $S^* = 180 \text{ g/L}$ y a partir de los 60 g/L de extracto de acacia la inhibición es más rápida y predice satisfactoriamente los resultados obtenidos después de dicha concentración.

Por lo tanto, el extracto de acacia como única fuente de carbono y energía para el *A. niger* Aa20 en medio líquido tiene un efecto inhibitorio de tipo Luong sobre la velocidad específica de crecimiento.

Se ha reportado por Hamdi y Ellouz (1992) que la μ_{\max} para un *Aspergillus* crecido sobre efluentes de la industria de la aceituna, que son ricos en taninos, es de 0.2 h^{-1} . Obviamente este parámetro no puede ser tan elevado porque se trata de componentes tóxicos, recordemos que como ha descrito Carlson (1999), si el sustrato es tóxico a altas concentraciones, el crecimiento del microorganismo disminuye al incrementar la concentración de sustrato y esta situación se describe con la ecuación de Haldane, en cambio cuando el sustrato contiene compuestos que son tóxicos debido a las interacciones moleculares que puede tener con el microorganismo, el fenómeno puede estar mejor descrito con la ecuación de Luong.

6.4.3. Análisis de la degradación de los componentes del extracto de acacia por *A. niger* Aa20

Para saber en que proporción la biomasa producida estaba consumiendo los taninos y azúcares del extracto de acacia se realizó un análisis del consumo de sustrato midiendo azúcares totales, ácido gálico, antocianidinas, y monómeros y polímeros de flavanoles. Esto únicamente se realizó para tres concentraciones: 60 , 75 y 120 g/L , obteniendo los perfiles que se muestran a continuación:

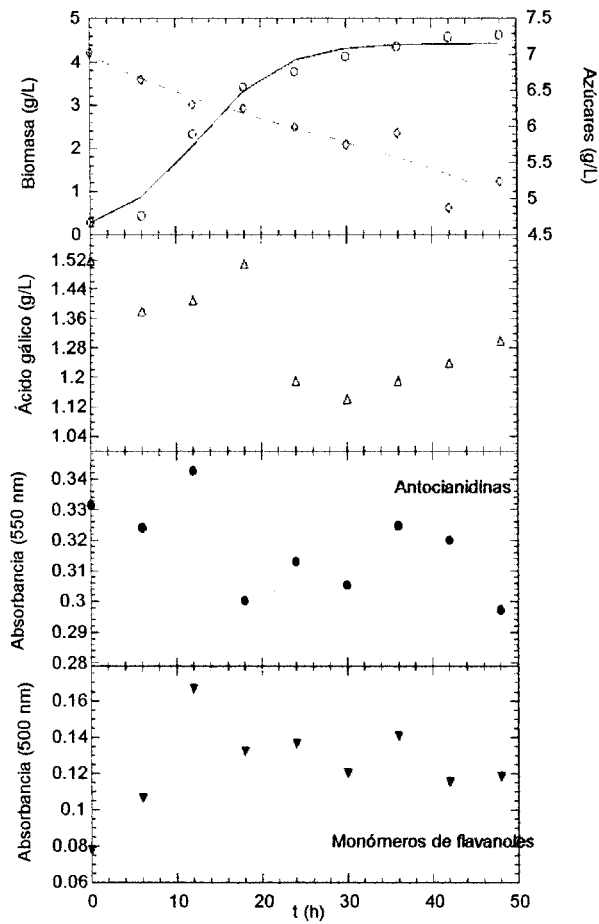


Figura 18. Degradación del extracto de acacia con 60 g/L en la concentración inicial

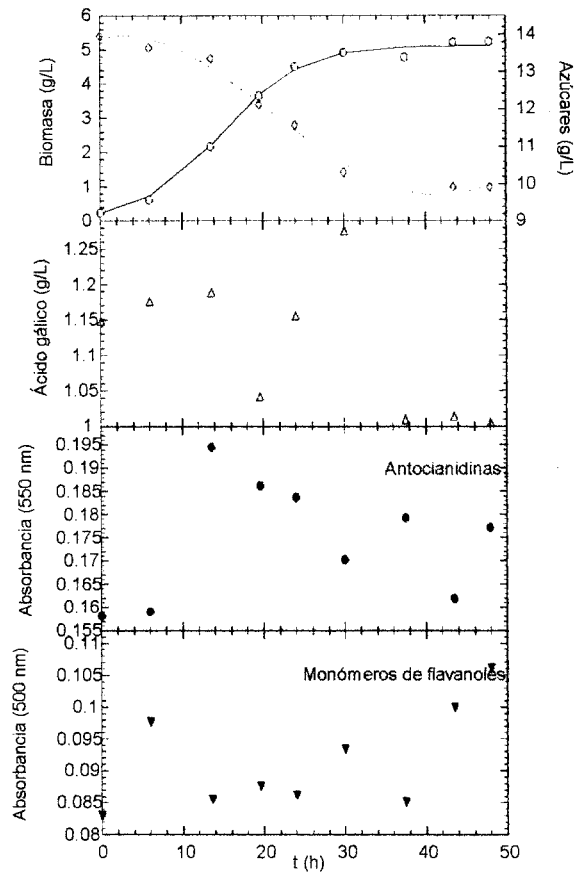


Figura 19. Degradación del extracto de acacia con 75 g/L en la concentración inicial

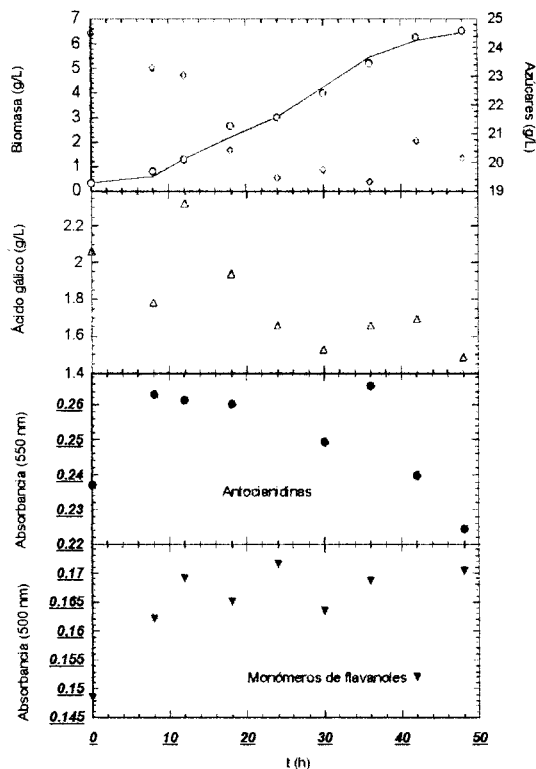


Figura 20. Degradación del extracto de acacia con 120 g/L en la concentración inicial

Durante el análisis de degradación del extracto de acacia, se midieron azúcares totales (estimados como equivalente a sacarosa por el método de antrona), ácido gálico, antocianidinas y monómeros de flavanoles como se ha descrito ya en la sección 5.6, cabe mencionar que en el análisis de antocianidinas y de monómeros de flavanoles se midió únicamente la variación de la densidad óptica debido a que no se contó con los estándares necesarios para realizar la curva patrón, así que se asume que la disminución de la absorbancia

implica una disminución en la concentración de dichos compuestos.

En las tres concentraciones probadas se observa que los azúcares son los componentes preferidos para el consumo del microorganismo y es con ellos con los que se puede establecer una relación directa de la producción de biomasa, el ácido gálico varía poco durante toda la cinética en los tres casos, la absorbancia medida para las antocianidinas y los monómeros de flavanoles tiene ligeras variaciones hacia la disminución.

Sin embargo, es pertinente aclarar que el consumo medido de carbohidratos no explica satisfactoriamente el nivel de biomasa producida, pues arroja valores de $Y_{x/S} > 1$. Esto indica que hay otros componentes orgánicos que son biodegradables y que no fueron identificados en este estudio.

Entonces, podemos decir que el crecimiento de *A. niger* Aa20 sobre extracto de acacia como fuente de carbono y energía en medio líquido se debe principalmente al consumo de los azúcares y de los no-taninos presentes en el extracto y que efectivamente están siendo consumidos simultáneamente, ya que los perfiles de medición así lo muestran.

6.5. Comparación de la actividad metanogénica de las bacterias anaerobias con pretratamiento del extracto

Como ya se ha probado que el extracto de acacia es tóxico para las bacterias anaerobias y que *A. niger* es un microorganismo más resistente se realizó un análisis del efecto de la concentración del extracto de acacia, sobre los lodos anaerobios, con y sin tratamiento por el *Aspergillus*.

En la Figura 21 se encuentran graficados los resultados de la comparación de la actividad metanogénica de las bacterias anaerobias cuando se le adiciona la misma cantidad del extracto de acacia tratado con *A. niger* Aa20 durante 48 horas y del mismo extracto con la misma concentración pero sin el pretratamiento, para saber en que medida puede ser útil la intervención del *Aspergillus* en la destoxificación de taninos del extracto curtiente vegetal sobre la metanogénesis.

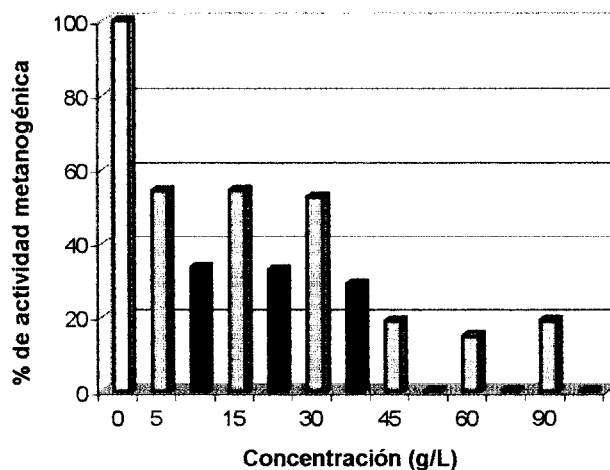


Figura 21 Comparación de la actividad metanogénica de las bacterias anaerobias.

Esta serie de experimentos está referida a la actividad metanogénica del lodo con acetato de sodio como única fuente de carbono y energía (□). □ Actividad metanogénica después de tratar durante 48 h el extracto de acacia con el hongo *A. niger* Aa20, y ● Actividad de las bacterias metanogénicas al exponerlas con el extracto de acacia sin tratamiento previo por *A. niger* Aa20.

Como se puede notar el pretratamiento ayuda aproximadamente en 20% a la actividad metanogénica de las bacterias anaerobias al ponerlas en contacto con el extracto de acacia, esto indica que aunque el microorganismo está degradando principalmente no-taninos, también está destoxificando por lo menos parcialmente el extracto de acacia. De acuerdo con la Figura 14, el tratamiento con *Aspergillus* sería poco importante para el tratamiento de los no-taninos, es decir, no ayudaría a incrementar la actividad metanogénica de los lodos anaerobios. Por tanto los datos de la Figura 21 indican que si bien, los taninos no son bien asimilados o degradados por *A. niger* si se disminuye en forma apreciable su toxicidad sobre los lodos metanogénicos. Esto sugiere que *A. niger* quizá modifique a los taninos sin consumirlos. Por ejemplo: las tanasas al hidrolizar los esteres de los taninos con el ácido gálico podrían haber disminuido su toxicidad sobre las bacterias metanogénicas. Esto se apoya por la forma de la curva de ácido gálico en el medio de cultivo de las Figura 18 -Figura 20, pues su concentración se mantiene casi constante durante las primeras 20 h del cultivo, lo cual podría deberse al rompimiento de dichos esteres.

Así pues, se ha mostrado que el tratamiento del extracto de acacia tratado con *Aspergillus niger* Aa20 es destoxificado de manera parcial, ya que la actividad metanogénica de los lodos aumenta aproximadamente en un 20 %, lo cual indica que se puede montar un reactor que trate, con este tipo de microorganismo, las aguas que contienen curtientes vegetales y pasarlos posteriormente al sistema anaerobio.

6.6. Instalación de un reactor de biopelícula por lote

Se mostró con los resultados anteriores que *A. niger* Aa20 es capaz de destoxificar, parcialmente, los efluentes modelo de las curtidurías con extracto de acacia como curtiente vegetal, por lo tanto se plantea la posibilidad de montar un reactor para estudiar su degradación y destoxificación.

El volumen de operación del reactor utilizado fue de 800 mL con 60 g/L de extracto de acacia, ya que fue a esta concentración donde se encontró la mayor velocidad específica de

crecimiento, dentro del rango de concentraciones probadas además, la concentración de los efluentes de las curtidurías se encuentran en este rango.

En la Figura 22 se muestra un diagrama del reactor que se usó para la degradación de taninos del curtiente vegetal de acacia con *A. niger* Aa20 inmovilizado. Se utilizó como soporte para formación de la biopelícula fibra tipo Scotch-Brite™, que ocupaba un volumen de 127.5 cm³, la temperatura se controló con un baño a 30 °C, la biomasa inicial que colonizó la fibra de manera espontánea fue de 3.25 g en el volumen total del soporte. Por la parte inferior del reactor se suministró aire de manera continua para satisfacer las necesidades de oxígeno del hongo y mantener un régimen de mezclado adecuado.

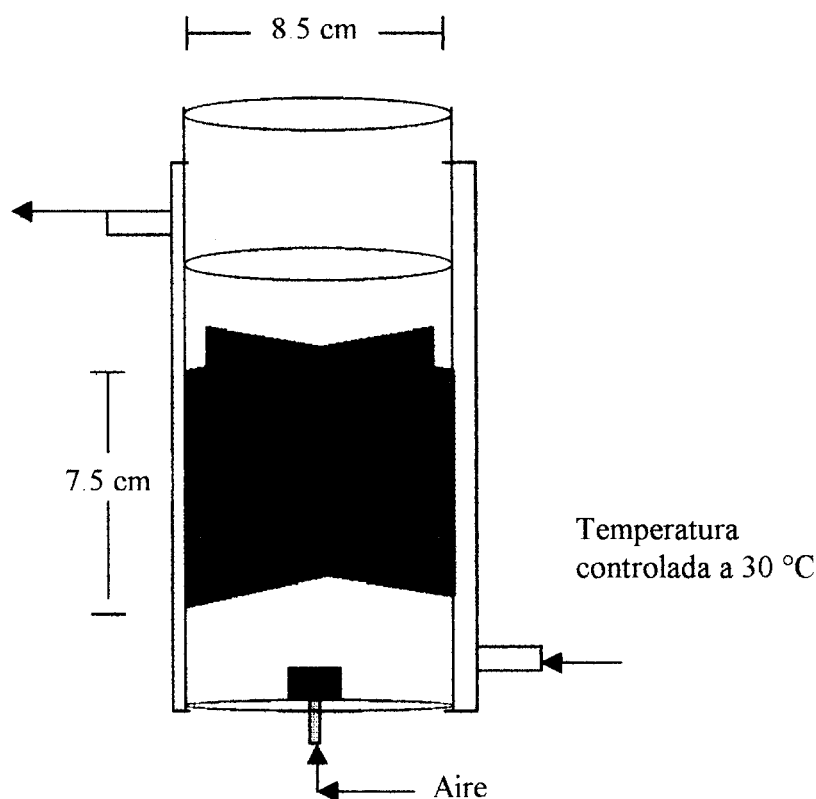


Figura 22 Esquema del reactor por lote de 800 mL

6.6.1. Homogeneidad del reactor

Para comparar la degradación del extracto curtiente vegetal estudiada en la sección 6.4 se decidió tener un reactor por lote monitoreado durante 120 horas y completamente mezclado.

En primera instancia para determinar el mezclado del reactor que se instaló se realizó la medición del pH, en diferentes puntos del reactor al agregar 5 mL de NaOH 1N, observando que en 10 min. la concentración del álcali era la misma en todo el sistema (Figura 23).

En los resultados de pH(1) el bulbo del electrodo se situó aproximadamente a 5 cm de la base del reactor y ahí se mantuvo hasta que ya no se observaron variaciones, después de 30 min. se midió el pH en diferentes puntos del reactor encontrando que el pH era el mismo en cualquier punto del sistema.

Después se realizó una prueba independiente de la anterior, instalando el electrodo en la parte superior del reactor, se adicionó el álcali y se observó su homogenización en 1 min. (pH2), después de 10 min. se adicionaron 5 mL más del álcali y se observó el mismo tiempo de homogenización, al cabo de 30 min. se movió el electrodo a diferentes puntos del reactor y se observó que no existían diferencias de pH en el sistema.

Finalmente se hizo una prueba visual, agregando tinta china, encontrando que en un tiempo promedio de 1 min. la tinta queda homogénea en el reactor. Con estos datos concluimos que se tiene un reactor con agitación continua por medio de la aireación, donde el fluido se considera perfectamente mezclado, lo cual asegura que todo el volumen es utilizado para efectuar la reacción sin que exista ningún espacio muerto apreciable. Además que el tiempo de circulación de un elemento de fluido (colorante agregado) dentro del recipiente es menor que la velocidad de reacción de los componentes del extracto de acacia con el *A. niger*, ya que la μ_{\max} de este microorganismo es de 0.4 h^{-1} .

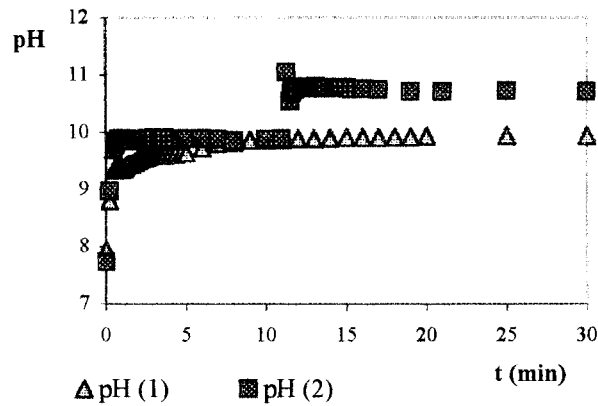
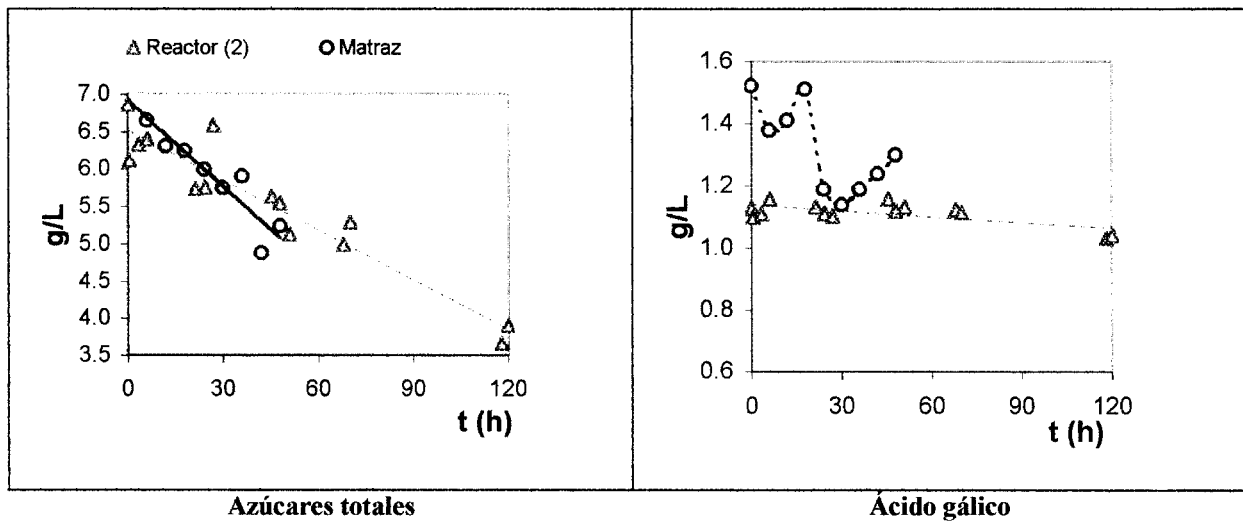


Figura 23 Prueba de la homogeneidad del reactor

6.6.2. Comparación de los perfiles de consumo de sustrato en el reactor de biopelícula y los matraces agitados

Al igual que en la sección 6.4.3. se analizó la degradación del extracto de acacia en el reactor de biopelícula cuantificando azúcares, ácido gálico, antocianidinas y flavanoles (Figura 24). La cantidad de biomasa producida no fue posible monitorerla junto con el consumo de sustrato, así que sólo se cuantificó la cantidad inicial (4.06 mg/mL) y la final (7.6 mg/mL).



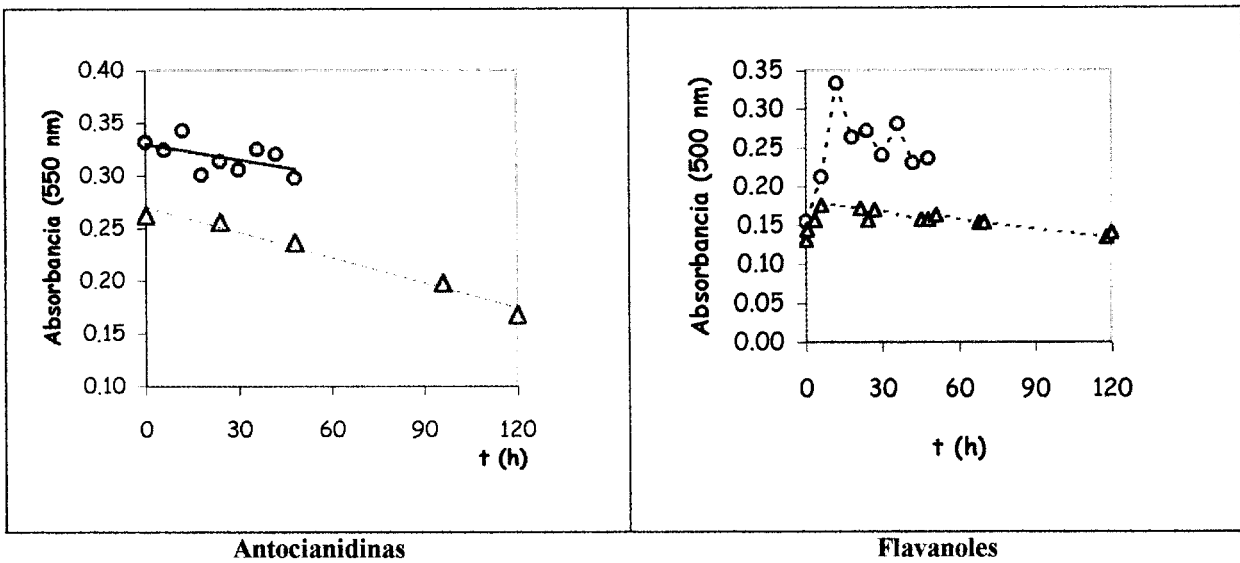


Figura 24 Comparación del consumo del extracto de acacia en los sistemas de matraz y el reactor de biopelícula

Los perfiles de consumo de antocianidinas y azúcares son muy similares tanto en matraz como en el bioreactor, pero midiendo la degradación que se efectúa por la cantidad de biomasa presente obtenemos para los azúcares totales que se degradan 0.4 g de azúcar/g de biomasa en el matraz, mientras que el reactor es más eficiente porque se degrada 1 g de azúcar/g de biomasa. Con respecto a las antocianidinas, tenemos que la velocidad de degradación, medida como el cambio de absorbancia en el tiempo por gramo de biomasa es ligeramente mayor en el bio-reactor ($3.53 \cdot 10^{-3}$) que en los matraces ($2.91 \cdot 10^{-3}$).

La concentración de ácido gálico en el bio-reactor permanece casi constante (Figuras 18, 19 y 20), mientras que en los matraces se observan variaciones diferentes que tienden a disminuir sin una correlación aparente con la producción de biomasa, como se ha mencionada anteriormente: si la concentración de ácido gálico permanece constante puede deberse a dos factores:

- No se produce ni se degrada
- Se produce a la misma velocidad que se degrada

Los taninos esterificados con el ácido gálico tienen mayor capacidad curtiente que si los enlaces ésteres son rotos por la tanasa. Podría ser que la segunda opción explique este resultado junto con la disminución de la toxicidad, pero sin verse asociado con la degradación de las antocianidinas del extracto curtiente estudiado ya que las tanasas de *A. niger* estarían rompiendo los enlaces del ácido gálico con los diversos tipos de polifenoles al mismo tiempo que disminuirían en cierto grado la toxicidad de esos compuestos.

Con respecto a los flavanoles, durante las primeras horas en ambos sistemas, se observa un aumento en la absorbancia y después de doce horas la disminución de la misma es evidente, siendo más pronunciada en los matraces que en el reactor de biopelícula, pero si es importante destacar que el consumo de los taninos del extracto de acacia es importante ya que pocos microorganismos pueden, en primer lugar tolerar altas concentraciones y utilizarlas como fuente de carbono.

En conclusión se establece que la degradación del extracto de acacia es mas eficiente en el reactor de biopelícula que con el micelio disperso en los matraces y el consumo de taninos y no-taninos es simultáneo.

6.6.3. Comparación de la metanogénesis al utilizar diferentes sistemas de pretratamiento del extracto de acacia

Se probaron los remanentes de los matraces agitados a 48 h y del reactor de biopelícula a 48 y 120 h para realizar la comparación de biodegradabilidad de los compuestos tóxicos comparando la actividad metanogénica de los lodos (Figura 25).

Así pues se obtuvo que los efluentes del reactor, después de haber sido tratados durante 48 h con *Aspergillus niger* Aa20, la actividad metanogénica es 10% mayor en comparación con los matraces agitados. Con tratamiento en el reactor de biopelícula durante 120 h, aumenta hasta 30%.

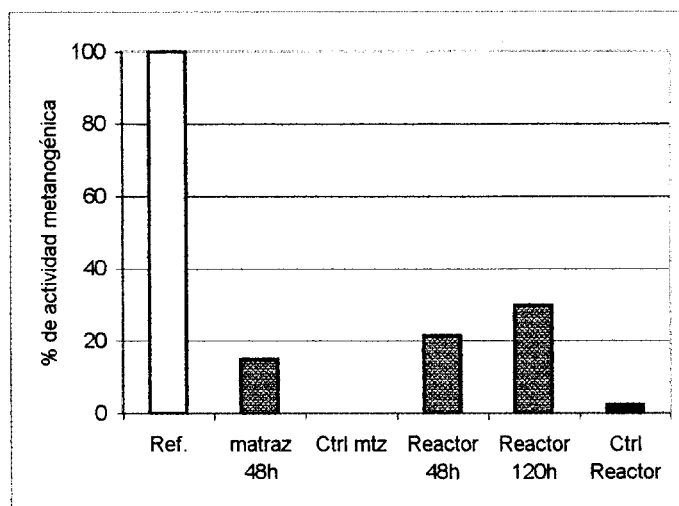


Figura 25 Comparación de la metanogénesis con los diferentes tratamientos del extracto de acacia a 60 g/L.

Puede observarse que en cualquiera de los dos sistemas, si no existe el pretratamiento, la actividad metanogénica de los lodos es inhibida casi en forma completa.

La autoxidación de los taninos por el oxígeno que se administra en el reactor de biopelícula no es suficiente para destoxificar el extracto curtiente vegetal utilizado en esta investigación, pero el burbujeo directo de aire beneficia el metabolismo del hongo ya que mejora el grado de mezclado y a tener mayor disponibilidad de oxígeno disuelto en el medio para la degradación de los componentes del extracto de acacia. Entonces, los taninos son los componentes que causan la inhibición metanogénica más importante en los lodos anaerobios y el pretratamiento del extracto de acacia con *A. niger* Aa20 ayuda a destoxificarlo de manera parcial.

7. Conclusiones

El estudio de las fracciones de los curtientes de acacia mostró que su mayor componente (63%) son taninos que se asocian fuertemente al polvo de cuero, se observa que tiene mayor proporción de taninos condensados que de taninos hidrolizables. La materia orgánica restante (37%) son no-taninos, es decir, compuestos que no funcionan como material curtiente.

El hongo filamentoso *A. niger* creció principalmente a expensas de la materia orgánica no curtiente (no-taninos) y de manera especial a expensas de los carbohidratos solubles. Por ello mostró bajos rendimientos aparentes con el curtiente vegetal total. El hongo filamentoso *Aspergillus niger* Aa20 es un productor de taninas de amplio espectro por lo cual es posible su utilización en la degradación parcial de los taninos condensados, ya que fue capaz de crecer en medio líquido con extracto de acacia como única fuente de carbono y energía.

Por separado, los curtientes de acacia mostraron ser tóxicos para las bacterias metanogénicas con dosis superiores a 5 g/L y esta propiedad pudo ser removida en un 20% por *A. niger*, principalmente por su acción sobre los taninos. Pues los no-taninos, que resultaron ser menos tóxicos que los taninos, casi no cambiaron su toxicidad por el cultivo de *A. niger*.

El cultivo de *A. niger* toleró concentraciones altas de curtientes vegetales porque su crecimiento se vió inhibido solamente cuando las concentraciones de esos sólidos suspendidos fueron mayores a 60 g/L. Esto confirma la elección de este organismo para cultivarlo en este tipo de sustrato.

El cultivo de *A. niger* resultó ser más efectivo para destoxificar parcialmente a los taninos cuando se utilizó como biopelícula adherida a un soporte inerte poroso (fibra Scotch BriteTM). Por lo tanto, los residuos de las curtidurías pueden reducir su agresividad ambiental si se tratan en reactores aerobios con biopelículas de *A. niger*.

Queda por desarrollar un proceso integrado entre la separación y reuso industrial de los taninos residuales y el tratamiento biológico de los no-taninos, quizá por reactores de biopelícula de *A. niger* que reduzcan la carga de azúcares y polifenoles para ser tratados después en un sistema convencional de digestión biológica de la materia orgánica.

8. Recomendaciones

En este trabajo se utilizó el extracto de acacia como curtiente vegetal modelo debido al auge que ha tomado actualmente en la industria del curtido de pieles, pero en realidad, generalmente se llegan a utilizar mezclas de curtientes de diferentes orígenes, lo que hace que este problema sea más complicado, porque serán más componentes los que hay que analizar, si es que se desea saber de manera detallada su degradación y el grado de toxicidad de cada uno. Si lo importante es conocer el efecto tóxico, como tal, bastarán las pruebas inhibición metanogénica de los lodos anaerobios y la capacidad de destoxificación por parte de *A. niger*.

Un punto importante es que para este trabajo se desarrollaron los estudios con el curtiente completo, es decir, el curtiente no ha reaccionado con la proteína de la piel para formar el cuero. En consecuencia, los efluentes reales de la industria, contendrán taninos de peso molecular por debajo de 400 uma y taninos de peso molecular mayor a 3000 uma, porque estos no tienen la capacidad de entrelazarse con el colágeno. En la industria se pone un exceso de curtiente para poder obtener un producto de alta calidad que pueda ser utilizado en la industria del calzado y del vestido, así que al final del proceso de curtición se tiene un baño que permite la recuperación del material curtiente, con las especificaciones adecuadas; pasando a los desechos una menor cantidad de materia, específicamente taninos hidrolizables, taninos condensados de bajo peso molecular y no-taninos que son más biodegradables por el sistema propuesto. De ahí que se propone ampliar los estudios hacia la biodegradación de los no-taninos que son menos tóxicos que los taninos pero que no son completamente biodegradables por *A. niger*.

Por lo tanto se recomienda estudiar un proceso de remoción física de los taninos residuales para su reuso industrial, junto con la búsqueda de mejoras a un proceso de tratamiento integrado (aerobio / anaerobio) de los no-taninos en los que se pueda aprovechar la tolerancia de *A. niger* a esta clase de efluentes tóxicos. Sería conveniente realizar un estudio de destoxificación con efluentes reales de la industria y determinar la toxicidad y degradación de los mismos, antes de continuar con el modelamiento del sistema para optimizar su funcionamiento.

9. Bibliografía

1. Aguilar, C.N. **Inducción y represión de la síntesis de la tanasa de *Aspergillus niger* Aa20 en cultivo en medios líquido y sólido.** Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F. (2000).
2. Bajpai, B. y Patil, S. **Tannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20) activity of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* and *Trichoderma*.** World Journal of microbiology and biotechnology (1996) 12: 217-220.
3. Beverini, M. y Metche, M. **Identification, purification and physicochemical properties of tannase of *Aspergillus oryzae*.** Sciences des aliments (1990) 10: 807-816.
4. Bhakti , B. y Patil, S. **Induction of tannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20) activity in some members of *fungi imperfecti*.** Enzyme and microbial technology (1997) 20: 612-614.
5. Bhat, T.K., Makkar, H.P.P. y Singh, B. **Preliminary studies on tannin degradation by *Aspergillus niger* van Tieghem MTCC 2425.** Letters in applied microbiology (1997) 25: 22-23.
6. Bhat, T.K., Singh, B. y Sharma, O.P. **Microbial degradation of tannins-A current perspective.** Biodegradation (1998) 9: (5) 343-357.
7. Bradoo, S., Gupta, R. y Saxena, R.K. **Parametric optimization and biochemical regulation of extracellular tannase from *Aspergillus japonicus*.** Process Biochemistry (1997) 32 (2) : 135-139
8. Cancino, M., Viniegra-González, G. y Loera, O. **Producción de taninos condensados monoméricos a partir de semilla de uva por una fermentación líquida usando la cepa Aa20 de *Aspergillus niger*.** Simposium internacional de biotecnología UPIBI-IPN 2000.
9. Cannas, A. **Tannins: fascinating but sometimes dangerous molecules.** www.ansci.l.abc.cornell.edu/plants/toxicagents/tannin/tannin.htm (1999)
10. Carlson, C. **Influences of sorption on microbial degradation of organic substances.** www.ecotox.lu.se/STAFF/CK/introduc.htm

11. Chatterjee, R., Dutta, A., Banerjee, R. y Bhattacharyya, B.C. **Production of tannase by solid-state fermentation.** *Bioprocess engineering* (1996) **14** (3): 159-162.
12. Characklis, W.G. y Wilderer, P.A. **Structure and function of biofilms.** Dahlem workshop reports. John Wiley & Sons, Inc. (1989).
13. Chien, N.K. y Sofer, S.S. **Flow rate and bead size as critical parameters for immobilized-yeast reactors.** *Enzyme Microb. Technol.* (1985) **7**: 538-542.
14. De Freitas, V.A.P., Glories, Y., Bourgeois, G. y Vitry, C. **Characterisation of oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds by liquid secondary ion mass spectrometry.** *Phytochemistry* (1998) **49**: (5) 1435-1441.
15. Denbigh, K.G. y Turner, J.C. **Introducción a la teoría de los reactores químicos.** Editorial Limusa, México, D.F. (1990)
16. Deschamps, A.M., Mahoudeau, G., Conti, M. y Lebeault, J.M. **Bacteria degrading tannic acid and related compounds.** *J. Ferment. Technol.* (1980) **58** (2): 93-97.
17. Deshusses, M.A., Chen, W., Mulchandani, A. y Dunn, I.J. **Innovative bioreactors.** *Current opinion in biotechnology* (1997) **8**: 165-168.
18. Fessenden, R. J. y Fessenden, J. S. **Química orgánica.** Grupo editorial Iberoamérica. 2ª Edición (1983). México.
19. Field, J. **The effect of tannic compounds on anaerobic wastewater treatment.** Abstract, WAU dissertation no. 1299 (1989).
20. Field, J. y Lettinga, G. **Oxidative detoxification of aqueous bark extracts. Part I: Autoxidation.** *J. Chem. Tech. Biotechnol.* (1990) **49**: 15-33.
21. Field, J. y Lettinga, G. **The methanogenic toxicity and anaerobic degradability of a hydrolyzable tannin.** *Wat. Res.* (1987) **21**: (3) 367-374.
22. Field, J., Lettinga, G y Habets, A. **Measurements of low molecular weight tannins: indicators of methanogenic toxic tannins.** *Journal of fermentation and bioengineering* (1990) **69**: (3) 148-153.
23. Field, J., Sierra-Alvarez, R. y Lettinga, G. **Oxidative detoxification of aqueous bark extracts. Part II: Alternative methods.** *J. Chem. Tech. Biotechnol.* (1990) **49**: 35-53.
24. Galiotou-Panayotou, M. y Macris, J. **Degradation of condensed tannins by *Calvatia gigantea*.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1986) **23**: 502-506.

25. Grant, W.D. **Microbial degradation of condensed tannins.** *Science* (1976) 17: 1137-1139.
26. Gupta, R., Bradoo, S. y Saxena, R.K. **Rapid purification of extracellular tannase using polyethylene glycol-tannic acid complex.** *Letters in applied microbiology* (1997) 24: 253-255.
27. Hadi, T.A., Banerjee, R. y Battacharyya, B.C. **Optimization of tannase biosynthesis by a newly isolated *Rhizopus oryzae*.** *Bioprocess engineering* (1994) 11: 239-243.
28. Hamdi, M. **Effects of agitation and pretreatment on the batch anaerobic digestion of olive mill wastewater.** *Bioresource technology* (1991) 36: 173-178.
29. Hamdi, M. y Ellouz, R. **Bubble column fermentation of olive mill wastewaters by *Aspergillus niger*.** *J. Chem. Tech. Biotechnol.* (1992) 54: 331-335.
30. Hamdi, M., BouHamed, H y Ellouz, R. **Optimization of the fermentation of olive mill waste-waters by *Aspergillus niger*.** *Appl. Microbiol. Biotechnol* (1991) 36: 285-288.
31. Hamdi, M., Festino, C. y Aubart, C. **Anaerobic digestion of olive mill wastewaters in fully mixed reactors and in fixed film reactors.** *Process biochemistry* (1992) 27: 37-42.
32. Inoue, K.H. y Hagerman, A.E. **Determination of gallotannin with rhodanine.** *Analytical biochemistry* (1988) 169: 363-369.
33. Iwai, S. y Kitao, T. **Wastewater treatment with microbial films.** Technomic Publishing Company, Inc. (1994) 183 págs
34. Lane, R.W., Yamakoshi, J., Kikuchi, M., Mizusawa, K., Henderson, L. y Smith, M. **Safety evaluation of tannase enzyme preparation derived from *Aspergillus oryzae*.** *Food and chemical toxicology* (1997) 35: 207-212.
35. Larralde C., C.P. **Cinética de crecimiento de hongos filamentosos.** Tesis de doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana. (1996).
36. Lehninger, A.L. **Biochemistry.** New York, Worth Publishers, Inc. (1975)
37. Lekha, P.K. y Lonsane, B.K. **Comparative titres, location and properties of tannin acyl hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL 104 in solid-state, liquid surface and submerged fermentations.** *Process biochemistry* (1994) 29: 497-503.

38. Lekha, P.K. y Lonsane, B.K. **Production and application of tannin acyl hydrolase: State of the art.** *Advances in applied microbiology* (1997) **44**: 215-260.
39. Lewis, J.A., y Starkey, R.L. *Soil Sci.* (1962) **707**: 241-247.
40. Li, L., Crain, N. y Gloyna E. F. **Kinetic lumping applied to wastewater treatment.** *Water environment research* (1996) **68**: (5) 841-854.
41. López Gómez L.D. y Hernández Medina J.F. **Manual de métodos de análisis para el químico curtidor.** C.I.A.T.E.G., A.C. Guanajuato, México. (1986) pag 233-278.
42. Luong, J.H.T. **Generalization of Monod kinetic for analysis of growth data with substrate inhibition.** *Biotech. Bioeng.* (1987) **29**: 242-248.
43. Pourrat, H., Regeat, F., Pourrat, A. y Jean D. **Production of gallic acid from tara by strain of *Aspergillus niger*.** *J. Ferment. Technol.* (1985) **63**: (4) 401-403.
44. Price, M.L., Van Scoyoc, S. y Butler, L.G. **A critical evaluation of the vainillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain.** *J. Agric. Food Chem.* (1978) **25**: (5) 1214-1218.
45. Ramírez C., M.A. **Purificación y caracterización de una tanasa de *Aspergillus niger* Aa20, producida por fermentación en medio sólido.** Tesis de Maestría, UAM-I, México, D.F. (2000)
46. Sáenz, P.B. y Rittman, B.E. **Improved pseudoanalytical solution for steady-state biofilm kinetics.** *Biotech. Bioeng.* (1988) **32** (3): 379-385.
47. Sayadi, S. y Ellouz R. **Screening of white rot fungi for the treatment of olive mill waste-waters.** *J. Chem. Tech. Biotechnol.* (1993) **57**: 141-146.
48. Sun, B., Ricardo-Da-Silva, J.M. y Spranger, I. **Critical factors of vainillin assay for catechins and proanthocyanidins.** *J. Agric. Food Chem.* (1998) **46**: 4267-4274.
49. Stanier, R.Y., Adalberg, E.A. y Ingraham, J.L. **Microbiología.** Ediciones REPLA, S.A. 4ª edición. (1985). México, D.F.
50. Swan y Hillis. **Analysis of phenolic plant metabolites.** *Methods in ecology* (1959).
51. Willis, R. B. y Allen, P.R. **Improved method for measuring hydrolyzable tannins using potassium iodate.** *Analyst* (1998) **123**: 435-439.