



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
DE LA SALUD**

Departamento de Biotecnología

**BIODEGRADACIÓN DEL AZUL ÁCIDO 74 MEDIANTE UN TRATAMIENTO
SECUENCIAL ENZIMAS OXIDATIVAS – DIGESTIÓN ANAEROBIA**

Tesis presentada por
Jazmín Edith Méndez Hernández

Para optar por el grado de Doctor en Biotecnología que otorga la
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa

México D. F., Septiembre de 2014

**El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está
incluida en el padrón nacional de posgrados de calidad (PNPC) del CONACYT**

México D.F., 12 de Septiembre de 2014

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis
"BIODEGRADACIÓN DEL AZUL ÁCIDO 74 MEDIANTE UN TRATAMIENTO SECUENCIAL
ENZIMAS OXIDATIVAS – DIGESTIÓN ANAEROBIA"

que presentó:
Jazmín Edith Méndez Hernández

Comité Tutorial:

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

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

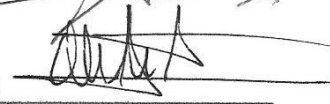
Asesora: Dra. María Myrna Solís Oba. Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada. IPN

Jurado:

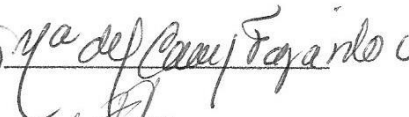
Presidente: Dra. Florina Ramírez Vives (UAM-I)



Secretario: Dra. Alma Socorro Sobrino Figueroa (UAM-I)



Vocal: Dra. María del Carmen Fajardo Ortiz (UAM-I)



Vocal: Dr. Oscar Arce Cervantes (UAEH)





Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00141
Matrícula: 208381355

BIODEGRADACION DEL AZUL
ACIDO 74 MEDIANTE UN
TRATAMIENTO SECUENCIAL
ENZIMAS OXIDATIVAS-DIGESTION
ANAEROBIA

En México, D.F., se presentaron a las 11:00 horas del día 12 del mes de septiembre del año 2014 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. FLORINA RAMIREZ VIVES
DR. OSCAR ARCE CERVANTES
DRA. MARIA DEL CARMEN FAJARDO ORTIZ
DRA. ALMA SOCORRO SOBRINO FIGUEROA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA
DE: JAZMIN EDITH MENDEZ HERNANDEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



REVISÓ
LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS
DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTA
DRA. FLORINA RAMIREZ VIVES

VOCAL
DR. OSCAR ARCE CERVANTES

VOCAL
DRA. MARIA DEL CARMEN FAJARDO ORTIZ

SECRETARIA
DRA. ALMA SOCORRO SOBRINO FIGUEROA

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2. Marco Teórico.....	3
2.1. Efluentes textiles y contaminación del agua.....	3
2.2. Evaluación eco-toxicológica de contaminantes ambientales.....	4
2.2.1. Evaluación eco-toxicológica del azul ácido 74.....	5
2.3. Eliminación de los colorantes sintéticos.....	6
2.4. Eliminación de colorantes mediante oxidación enzimática.....	8
2.5. Procesos biológicos secuenciales para la eliminación de los colorantes sintéticos.....	9
3. Justificación.....	11
4. Hipótesis.....	12
5. Objetivo General.....	13
6. Objetivos Particulares.....	13
7. Esquema General de Trabajo.....	14
8. Metodología.....	15
8.1. Microorganismo y preparación del inóculo.....	15
8.2. Producción de enzimas oxidativas en cultivo sólido.....	15
8.3. Determinaciones analíticas.....	16
8.4. Decoloración enzimática del efluente simulado de la industria textil.....	17
8.4.1. Preparación del efluente simulado.....	17
8.4.2. Pruebas de decoloración.....	18
8.4.3. Identificación de los productos de la oxidación enzimática del colorante Azul ácido 74.....	19
8.5. Tratamiento anaerobio del efluente textil decolorado por vía enzimática.....	19
8.5.1. Caracterización inicial de los lodos granulares (inóculo).....	19
8.5.2. Biodegradación anaerobia en continuo del efluente decolorado vía enzimática. Puesta en marcha del reactor UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket).....	20
8.5.3. Estudio de las comunidades microbianas involucradas en la biodegradación del efluente decolorado mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)...	22

8.5.4.	Biodegradación anaerobia en lote del efluente decolorado con el ECE de Fomes sp. EUM1	26
8.5.5.	Biodegradación anaerobia en lote del ácido isatin-5-sulfónico (AIS).....	27
8.6.	Evaluación eco-toxicológica del efluente textil sometido al tratamiento secuencial enzimático-anaerobio	28
8.6.1.	Ensayo Microbiológico de Viabilidad con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
8.6.2.	Ensayo de fitotoxicidad con semillas de <i>Sorghum vulgare</i>	29
8.6.3.	Ensayo de toxicidad aguda con <i>Daphnia magna</i>	30
8.7.	Análisis estadístico	31
9.	Resultados y discusión	32
9.1.	Producción de enzimas	32
9.2.	Ensayos de Decoloración.....	36
9.2.1.	Estabilidad de las lacasas y peroxidasas tipo DyP de Fomes sp. EUM1 ante la temperatura y fuerza iónica durante los ensayos de decoloración	41
9.2.2.	Identificación de los productos de la oxidación enzimática del Azul ácido 74	44
9.3.	Tratamiento anaerobio del efluente textil decolorado por vía enzimática	48
9.3.1.	Biodegradación anaerobia en continuo del efluente decolorado vía enzimática con la lacasa comercial (Biolite®).....	48
9.3.2.	Análisis de las comunidades microbianas involucradas en la biodegradación del efluente decolorado	55
9.3.3.	Biodegradación anaerobia en lote del efluente decolorado con el ECE de Fomes sp. EUM1	58
9.3.4.	Biodegradación anaerobia en lote del ácido isatín-5-sulfónico.....	59
9.4.	Evaluación eco-toxicológica del efluente textil sometido al tratamiento secuencial enzimático-anaerobio	61
9.4.1.	Ensayo Microbiológico de Viabilidad con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	61
9.4.2.	Ensayo de fitotoxicidad con semillas de <i>Sorghum vulgare</i>	65
9.4.3.	Ensayo de toxicidad aguda con <i>Daphnia magna</i>	70
10.	Resumen de Resultados	74
11.	Conclusiones	77

12. Perspectivas	78
13. Referencias	79
ANEXO I: Artículo Científico.....	91
ANEXO II: Estancia de Investigación	92

Resumen

La contaminación del agua es uno de los mayores problemas del mundo contemporáneo. En los últimos años el deterioro de los recursos hídricos se ha intensificado debido a la liberación de compuestos xenobióticos provenientes principalmente de las actividades industriales; en donde la industria textil y sus efluentes residuales juegan un papel fundamental.

En búsqueda de alternativas para el tratamiento de los efluentes textiles se ha dirigido la atención al aprovechamiento de las capacidades degradativas de las oxidasas fúngicas y su aplicación en la degradación de colorantes textiles. Sin embargo, aunque se conocen ampliamente los factores que afectan los procesos de decoloración enzimática, es claro que estas enzimas no catalizan la mineralización de estos compuestos, sino solo su bio-transformación en moléculas incoloras o menos coloreadas que pueden permanecer en solución. Además, poco se sabe sobre la identidad de los intermediarios producidos por la acción enzimática, la toxicidad de éstos y la estrategia idónea para lograr su eliminación. Por lo tanto, en este trabajo se propuso la utilización de un sistema secuencial enzimas oxidativas – digestión anaerobia para estudiar la degradación de un efluente simulado de la industria textil contaminado con el colorante azul ácido 74.

La producción de enzimas oxidativas (lacasas y peroxidasas) se realizó mediante el cultivo en medio sólido del hongo ligninolítico *Fomes sp.* EUM1 utilizando cuatro medios de cultivo distintos (M1: Rastrojo de maíz; M2: Rastrojo de maíz con salvado de trigo (80:20 p/p); M3: Rastrojo de maíz con glucosa y extracto de levadura y M4: Rastrojo de maíz, salvado de trigo, glucosa y extracto de levadura. La máxima producción de lacasas se observó a los 6 días en el M2 (3.9 UI gss⁻¹) y la de peroxidasas tipo DyP también a los 6 días, pero en el M4 (107 mU gss⁻¹). Los resultados sugirieron que la producción de estas dos enzimas se encuentra regulada por mecanismos distintos.

Los extractos enzimáticos (ECE) obtenidos del M2 (mejor medio para la producción de lacasas) y del M4 (mejor medio para la producción de peroxidasas tipo DyP), se aplicaron en la decoloración del efluente simulado. El ECE obtenido del M2 consiguió una decoloración del 98% en 5 h, la tasa inicial de decoloración fue de 27.1 mg l⁻¹ h⁻¹. Bajo las condiciones probadas no se comprobó la participación de las peroxidasas tipo DyP en la decoloración del azul ácido 74, lo cual se demostró aplicando el extracto obtenido del M4 en la decoloración del efluente. También se probó la decoloración del colorante utilizando un producto comercial con actividad lacasa (Biolite®), en este caso la decoloración fue de 98% en 1.3 h.

El análisis por RMN ^1H del efluente decolorado con el extracto obtenido del M2 o con la lacasa comercial reveló la presencia de ácido isatín-5-sulfónico (AIS) como principal producto de la degradación enzimática del colorante.

Los efluentes decolorados con el ECE de *Fomes* sp. EUM1 (M2) y con el producto comercial Biolite® fueron sometidos a un tratamiento anaerobio para complementar el proceso de degradación. El efluente decolorado con Biolite® fue tratado en un reactor en continuo de tipo UASB (carga orgánica volumétrica: $1 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$). El sistema presentó una eficiencia de remoción de la DQO del 77 % con una tasa de degradación de $0.77 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Bajo estas condiciones la producción de metano fue de $233.4 \text{ l CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ con un rendimiento de $303.3 \text{ l CH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ DQO removido}$.

Al final de la operación del reactor, se realizó un análisis por DGGE de las poblaciones de bacterias y arqueas en el *lodo inoculado* durante la puesta en marcha del UASB y del *lodo aclimatado* obtenido a los 412 días de operación. Los perfiles de bandas en los geles de DGGE reflejaron las poblaciones dominantes en cada muestra. Al comparar los perfiles entre el *lodo inoculado* y el *lodo aclimatado*, se hizo evidente la desaparición de varias bandas y la aparición de bandas nuevas tanto en el análisis de arqueas como en el de bacterias. Este fenómeno sugiere que el efluente decolorado ejerció una presión de selección sobre las poblaciones del *lodo inoculado*, alterando su dinámica poblacional. De esta manera, la modificación de las poblaciones pudo favorecer la *aclimatación* de los microorganismos y por tanto aumentar su eficiencia para degradar el efluente.

Para comprobar si el tratamiento anaerobio también era eficiente para degradar el efluente decolorado con el ECE de *Fomes* sp. EUM1, el efluente decolorado con dicho extracto fue sometido a un tratamiento anaerobio en lote utilizando como inóculo el lodo obtenido al final de la operación del reactor UASB. El sistema presentó una eficiencia para remover la DQO inicial del $86 \pm 1.5 \%$ a los 8 días utilizando concentraciones crecientes de DQO inicial (300 , 650 y 1000 mg l^{-1}). El porcentaje de metano registrado fue de 78.2 , 75 y 72.5% al trabajar con una DQO inicial de 300 , 650 y 1000 mg l^{-1} , respectivamente. Estos datos indicaron que no se presentó inhibición metabólica de la biomasa al tratar el efluente decolorado con el ECE de *Fomes* sp. EUM1.

Con el objetivo de determinar si el ácido isatín-5-sulfónico, (*identificado como producto de la oxidación del azul ácido 74*), podía ser degradado por el lodo obtenido del reactor UASB, se realizaron pruebas específicas de degradación en lote utilizando este compuesto como única fuente de carbono y energía. Al trabajar con una concentración de ácido isatín-5-sulfónico de 20 mg l^{-1} , la eficiencia de remoción del compuesto fue superior al 85% a los 10 días. La eficiencia de eliminación de la DQO fue de $71.5 \pm 10.6 \%$ con producción de metano como evidencia de mineralización; el

porcentaje de metano en el biogás fue de 68 ± 11 %. Por otra parte, a concentraciones de 50 y 100 mg l⁻¹, las eficiencias de remoción fueron de 57.7 ± 1.9 y 35.5 ± 11.3 %, respectivamente, con una proporción de CO₂ en el biogás superior al 90 %. Lo que sugiere que el aumento en la concentración inicial del ácido isatín-5-sulfónico ocasionó una inhibición en el metabolismo de la biomasa.

Finalmente, se evaluó el potencial eco-toxicológico del efluente simulado a su paso por el tratamiento secuencial. Los ensayos se realizaron por tres métodos utilizando los siguientes organismos de prueba: *Saccharomyces cerevisiae*, *Sorghum vulgare* y *Daphnia magna*. Los tres ensayos revelaron que la decoloración enzimática con la lacasa comercial Biolite® no disminuye la toxicidad del efluente sino que la aumenta. Para comprobar si este fenómeno se debía a la formación del AIS o a la toxicidad inherente al producto comercial, se estudió específicamente la toxicidad del compuesto y del producto Biolite® por separado. Los ensayos se realizaron utilizando a *Daphnia magna* como organismo de prueba. El AIS en un intervalo de concentraciones entre 0 y 1 g l⁻¹ no exhibió efectos tóxicos, mientras que el producto comercial mostró los mismos efectos tóxicos que el efluente decolorado. Debido a que se ha reportado la presencia de mediadores redox (frecuentemente tóxicos) en preparaciones comerciales de este tipo, es probable que la toxicidad del efluente decolorado se encuentre asociada con ello.

No obstante, cabe resaltar que el tratamiento anaerobio del efluente simulado permitió disminuir su toxicidad en un 50 %.

1. Introducción

En vista de la notable capacidad de los seres humanos para reconocer alrededor de 150 tonos distintos de color, es difícil imaginar un mundo desprovisto del mismo. Sin embargo, *el color* es también el primer contaminante en ser reconocido por el ojo humano; una cantidad muy pequeña de éste puede ser detectada a simple vista y por tanto, afectar la calidad estética de cualquier depósito o cuerpo de agua, además, aunque no todos los colorantes son tóxicos, todos reducen el paso de la luz solar afectando la actividad fotosintética y reduciendo la concentración de oxígeno disuelto (Wong y Yu 1999; Champagne y Ramsay 2010).

Los colorantes pueden agruparse de distintas formas: dependiendo de su origen (naturales o artificiales), de su forma de aplicación (colorantes a la tina, colorantes mordientes y colorantes directos) o de su grupo cromóforo (nitrocolorantes, colorantes azoicos, derivados de la antraquinona, derivados de la acridina, indigoides, etc.) (Ferreira et al 2004; COVENIN 1990; Morrison y Boyd 1998; Murugesan et al 2007). Entre ellos, los colorantes a la tina junto con los azoicos son los más utilizados en el teñido de algodón; como el algodón es el tejido más utilizado en la industria textil, es muy común que estos dos tipos de tintes sean descargados al medio ambiente con mucha frecuencia y en grandes cantidades (Manu y Caudhari 2003).

Entre los colorantes a la tina, el *azul índigo* y el azul ácido 74 son los más utilizados en la fabricación de mezclilla (**Fig. 1.1**) (Manu y Caudhari 2003). Debido a la ineficiencia de los procesos de teñido, se calcula que entre el 5 y el 20 % de estos compuestos no logra fijarse en las fibras y termina por ser descargado en el efluente residual (Wambuguh y Chianelli 2008).

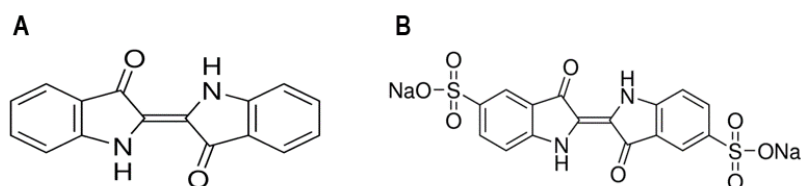


Fig. 1.1 Estructura molecular del azul índigo (A) y del azul ácido 74 (B).

Se ha reportado que la concentración de colorantes a la tina en los efluentes industriales se encuentra entre 0.01 y 0.1 g l⁻¹; debido a que el ojo humano puede detectar concentraciones tan pequeñas como 0.005 mg l⁻¹, valores que excedan este nivel invariablemente serán percibidos como un problema de contaminación (Wambuguh y Chianelli 2008).

2. Marco Teórico

2.1. Efluentes textiles y contaminación del agua

Debido al avance de la industrialización, la sociedad contemporánea debe encarar cada vez más y mayores problemas ecológicos (Ramírez y Mendoza 2008). Ejemplo de ello, es el deterioro de los recursos hídricos, el cual se ha intensificado debido a la acumulación de compuestos xenobióticos producidos durante las actividades antropogénicas (Kagalkar et al 2010). Tanto los residuos domésticos como aquellos provenientes de la agricultura contribuyen al avance de la contaminación, sin embargo, es evidente que los desechos más tóxicos provienen de la industria, principalmente de las refinerías petroleras, la industria química, del papel y la textil (Raymundo et al 2010).

En este sentido, los efluentes textiles poseen un elevado potencial contaminante debido a su contenido de compuestos recalcitrantes, entre ellos los colorantes sintéticos. En adición a ello, estos efluentes se descargan a temperaturas elevadas y presentan altas demandas químicas de oxígeno (Doğan y Türkdemir 2005; Kagalkar et al 2010).

La descarga de los efluentes textiles sin previo tratamiento ocasiona una serie de daños en los cuerpos receptores, entre ellos:

- Afectación de la estética y claridad del agua
- Disminución de la solubilidad de los gases
- Alteración de los procesos fotosintéticos
- Afectación del crecimiento de bacterias, protozoarios, algas, plantas y diferentes animales.

Incluso se ha reportado que algunos colorantes y/o sus productos de degradación poseen propiedades mutagénicas o carcinogénicas y son la causa de alergias, dermatitis y otros padecimientos (Raymundo et al 2010; Jadhav et al 2010; Wong y Yu 1999).

Por lo anterior, evaluar eficazmente los efectos tóxicos asociados con la exposición (*del medio ambiente y del ser humano*) a los contaminantes es un reto cardinal para científicos y evaluadores de riesgos (Spurgeon et al 2010).

2.2. Evaluación eco-toxicológica de contaminantes ambientales

Los contaminantes ambientales pueden alterar la salud humana a través de varias rutas. Pueden introducirse al organismo por consumo directo, por inhalación, pasar a lo largo de la cadena alimentaria, o incluso introducirse a partir de los suministros de agua (Fig. 1.2).

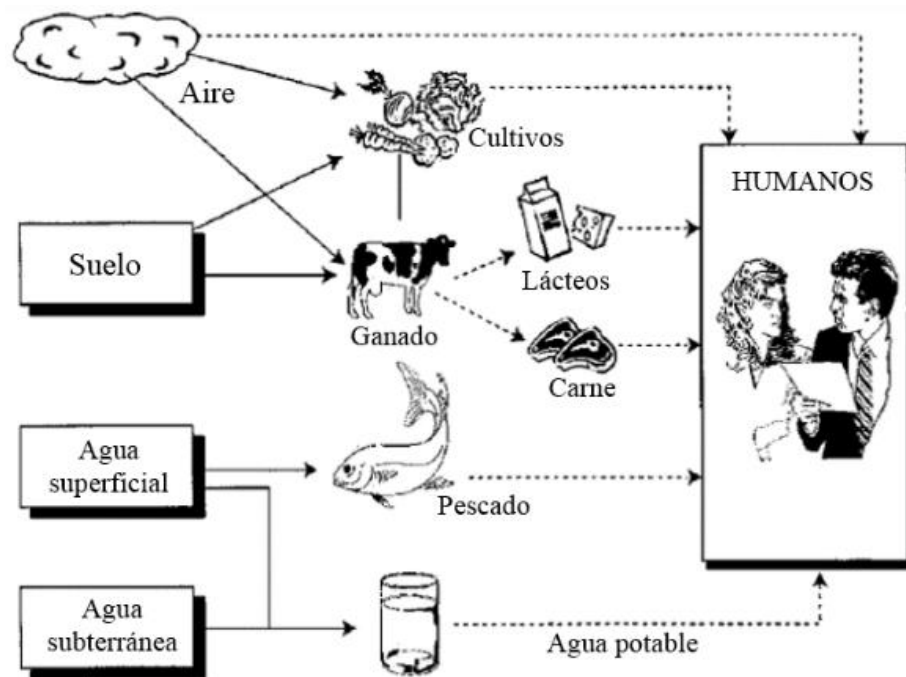


Fig. 1.2 Rutas comunes de la exposición humana a contaminantes (Kapanen e Itävaara 2001).

La evaluación de los riesgos asociados con la exposición a mezclas complejas de contaminantes, consiste en la determinación de su toxicidad intrínseca hacia organismos vivos (Ait-Aïssa et al 2003). Debido a que las respuestas biológicas inducidas por la exposición a contaminantes dependen en gran medida de la sensibilidad de los organismos de prueba, la elección del *organismo adecuado* es la etapa más importante en una evaluación eco-toxicológica. Además, en la medida de lo posible, el método debe ser confiable, reproducible y fácil de realizar (Kapanen e Itävaara 2001).

Puesto que es difícil reunir todas estas características en una sola prueba, se recomienda la aplicación de una batería de bioensayos que incluya organismos pertenecientes a distintos niveles tróficos, por ejemplo, bacterias, plantas y células o tejidos animales (Tabla 1.1) (Kapanen e Itävaara 2001; Farré y Barceló 2003).

Tabla 1.1 Algunos bioensayos de eco-toxicidad

Métodos		Fundamento
I. Microbiológicos		
1. Pruebas de respiración	Inhibición de la actividad respiratoria de lodos activados	Mide la actividad respiratoria metabólica global de los lodos activados. Por lo tanto, los efectos negativos sobre la actividad biológica debido a la presencia de toxinas son el resultado de una inhibición metabólica.
	Buena remoción de una gran variedad de colorantes.	
	Inhibición de la actividad deshidrogenasa en lodos activados	Se basa en el hecho de que la oxidación biológica de compuestos orgánicos es un proceso de deshidrogenación, por lo tanto, la actividad deshidrogenasa de un lodo activado refleja su actividad.
2. Ensayos de Viabilidad	Ensayo de viabilidad con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Se basa en la detección de cambios en la viabilidad del microorganismo luego de su exposición a una sustancia tóxica.
	Microtox®	Se basa en la inhibición de la bioluminiscencia de la bacteria marina <i>Vibrio fischeri</i> . Estas bacterias luminiscentes producen luz visible como resultado de sus procesos metabólicos normales. Los tóxicos presentes en las muestras de ensayo producen una inhibición del metabolismo de la bacteria que se traduce en una reducción de la bioluminiscencia.
II. Con organismos acuáticos		
	Ensayo de toxicidad aguda con <i>Daphnia magna</i>	Se basa en la elevada sensibilidad del organismo a una amplia gama de compuestos tóxicos, siendo ésta una de las características principales para que sea usado internacionalmente en pruebas de toxicidad.
III. Con organismo terrestres		
1. Invertebrados del suelo	Ensayo con <i>Eisenia foetida</i>	Se basa en la sensibilidad del organismo a la presencia de compuestos tóxicos en el suelo. <i>Eisenia foetida</i> es un invertebrado terrestre útil para la evaluación de los posibles efectos adversos de sustancias tóxicas sobre la fauna del suelo.
2. Ensayos de fitotoxicidad	Ensayos con semillas de plantas	Se basa en el hecho de que las plantas que son sensibles a sustancias tóxicas pueden utilizarse como bioindicadores. Especies recomendadas: <i>Lactuca sativa</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Cucumis sativus</i> , <i>Sorghum vulgare</i> entre otras.
IV. Ensayos Celulares		
	Prueba de inducción in vitro de hsp70	Se basa en la utilización de un gen reportero (cloranfenicol acetil transferasa) acoplado al promotor de un gen inducible por estrés. Por ejemplo, la inducción del gen de choque térmico (hsp70) en respuesta a la exposición a compuestos tóxicos o mezclas de ellos.

(Ait-Aissa et al 2003; Volpi Ghirardini et al 2009; Rumlova y Dolezalova 2012; Luongo et al 2010; Dutka et al 1983; Sun et al 2012; Gomare et al 2009; Ramirez y Mendoza 2008)

2.2.1. Evaluación eco-toxicológica del azul ácido 74

La evaluación de la toxicidad de los colorantes sintéticos ha recibido poca atención y en muchos casos las evaluaciones han quedado incompletas. En el caso del azul ácido 74, algunos estudios han mostrado que este compuesto no es capaz de ejercer efectos carcinogénicos en ratones ni en cerdos, cuando se administra por vía oral (Hooson et al 1975; Gaunt et al 1969). Por el contrario, en otros estudios se ha mostrado su clastogenicidad hacia células CHO (del inglés *Chinese hamster ovary*) y se ha reportado su capacidad para inducir el desarrollo de tumores en hámsters (Combes y Haveland-Smith

1982). Por otro lado, se ha evidenciado que este colorante puede ser degradado *in vivo* dando ácido-5-sulfoantranílico e isatín-5-sulfonato como productos (ensayos con ratas). Puesto que se ha observado que el tinte se decolora extensamente después de su incubación *in vitro* con bacterias intestinales de rata, es probable que la ruptura de la molécula pueda ocurrir en el intestino humano como resultado de la actividad de la microbiota natural (Combes y Haveland-Smith 1982).

2.3. Eliminación de los colorantes sintéticos

Los colorantes sintéticos poseen estructuras muy estables que les permiten resistir a la luz, el agua, los agentes oxidantes y el ataque microbiano. Por lo tanto, uno de los principales inconvenientes al tratar los efluentes textiles es precisamente la eliminación de estos compuestos (Vaithanomsat et al 2010; Levin et al 2010).

En los últimos años se han propuesto distintos tratamientos o combinaciones de ellos para la eliminación de los colorantes sintéticos en los efluentes textiles. En la **Tabla 1.2**, se presentan las ventajas y limitaciones de algunos de ellos.

Tabla 1.2 Ventajas y limitaciones de diferentes métodos para la eliminación de colorantes en efluentes textiles

Métodos disponibles	Ventajas	Limitaciones
I. Métodos Físicos		
1. Adsorción		
a. Carbón activado	Buena remoción de una gran variedad de colorantes	El proceso de regeneración es muy costoso
b. Virutas de madera	Buena capacidad de adsorción para colorantes ácidos	Requiere largos tiempos de contacto y grandes cantidades de material adsorbente
II. Métodos Químicos		
1. Reactivo de Fenton	Decoloración efectiva de colorantes solubles e insolubles	Prohibitivamente caro. Generación de lodos
2. Ozonación	Efectivo para la remoción de colorantes azoicos	No es adecuado para colorantes dispersos. Liberación de aminas aromáticas
3. Destrucción electroquímica	Los productos de degradación no son peligrosos	Alto costo de la electricidad
4. Coagulación y Precipitación	Tiempos de retención cortos, bajos costos y buena eficiencia de remoción	Alto costo de los reactivos para el ajuste de pH. Elevada producción de lodos, problemas para su manejo y deshidratación
III. Métodos Biológicos		
1. Procesos aerobios	El color se remueve junto con la DQO	Se requieren largos tiempos de retención, específico para ciertos colorantes, el proceso es poco resistente a compuestos recalcitrantes
2. Procesos anaerobios	El color se remueve junto con la DQO	Largos periodos de aclimatación, largos tiempos de retención, generación de aminas aromáticas en el caso de colorantes azoicos

Tabla 1.2 Continuación

3. Aplicación de cultivos puros (ej. Hongos, algas, bacterias)	Buena eficiencia de remoción cuando se trabaja con volúmenes y concentraciones pequeñas. Muy efectivo para la remoción de colorantes específicos	El mantenimiento de los cultivos es costoso. No se ha probado su efectividad en volúmenes grandes
IV. Tecnologías emergentes		
1. Procesos avanzados de oxidación	Se asegura la completa mineralización	Muy costoso
2. Filtración a través de membranas	Remueve todo tipo de colorantes	Producción de lodos muy concentrados, alto costo de operación
3. Fotocatálisis	El proceso se realiza en condiciones ambientales. Se obtiene la mineralización completa en tiempos cortos	Es efectivo solo para pequeñas cantidades de colorantes y es costoso

(Anjaneyulu et al 2005; Robinson et al 2001)

Como puede observarse, la remoción de los colorantes por métodos físicos (ej. carbón activado, coagulación, filtración, etc.) implica únicamente la transferencia de éstos de una fase a otra. Por lo tanto, al aplicar estas tecnologías debe considerarse la implementación de una estrategia adecuada para el tratamiento subsecuente o confinamiento de los desechos generados (Robinson et al 2001).

Por otro lado, aunque los tratamientos químicos remueven eficazmente los colorantes, sus elevados costos de operación limitan extensamente su uso (Champagne y Ramsay 2010).

En comparación con los métodos fisicoquímicos, los procesos biológicos han mostrado ser una mejor opción para el tratamiento de aguas residuales, sin embargo, en el caso de los efluentes textiles se ha reportado que las plantas de tratamiento convencionales (lodos activados) son ineficientes en la remoción de colorantes, mientras que aunque en algunos trabajos se ha encontrado que la degradación de estos compuestos por microorganismos anaerobios es más rápida que con aerobios (en ensayos en lote), la decoloración anaerobia sigue siendo ineficiente (pues comúnmente los consorcios microbianos no son capaces de degradar los colorantes textiles) (O'Neill et al 2000; Stolz 2001; Fischer-Colbrie et al 2005; Champagne y Ramsay 2010).

2.4. Eliminación de colorantes mediante oxidación enzimática

De acuerdo con el conocimiento actual de otros organismos, un tratamiento biológico prometedor es el uso de los hongos de pudrición blanca. Estos microorganismos constituyen un grupo eco-fisiológico diverso formado principalmente por basidiomicetos capaces de degradar la lignina. Esta propiedad se basa en su capacidad para producir oxidasas extracelulares e inespecíficas que además, también son capaces de degradar un amplio intervalo de contaminantes, entre ellos los colorantes textiles (Rodríguez 2009).

El sistema ligninolítico de los hongos de pudrición blanca está formado principalmente por dos tipos de enzimas: las lacasas y las peroxidasas. Las lacasas son capaces de catalizar la oxidación directa de *orto* y *para* difenoles, aminofenoles, polifenoles, poliaminas y aril diaminas, así como algunos iones inorgánicos (ej. Mn^{2+}). Estas enzimas oxidan al sustrato removiendo electrones de manera sucesiva y generando radicales libres que pueden polimerizar entre sí o sufrir una nueva oxidación enzimática. La lacasa almacena los electrones obtenidos en las reacciones de oxidación (*cuatro en total*) y los transfiere al oxígeno para formar agua (Giardina et al 2010).

Por otro lado, las peroxidasas más frecuentes en los hongos de pudrición blanca son las lignina peroxidasas (LiP) y las manganeso peroxidasas (MnP). Las MnP actúan mediante la producción enzimática de Mn(III), el cual difunde desde el sitio activo de la enzima y reacciona con diferentes sustratos fenólicos. Para alcanzar un potencial de degradación más elevado, el Mn(III) debe ser estabilizado por medio de un agente quelante, como por ej. ácido malónico o ácido málico. Por otro lado, las LiP poseen un potencial de reducción relativamente más elevado y pueden degradar exitosamente diferentes sustratos no fenólicos. El potencial oxidativo de la LiP puede incrementarse por medio de la adición de pequeñas moléculas aromáticas, como el alcohol veratrílico (Podgornik et al 2001).

Por otra parte, de forma relativamente reciente se describió un nuevo tipo de peroxidasas: las peroxidasas tipo DyP (Kim y Shoda 1999). Al igual que las MnP, las peroxidasas tipo DyP pueden catalizar la oxidación de compuestos fenólicos, sin embargo, a diferencia de éstas, las peroxidasas tipo DyP no requieren de Mn (Faraco et al 2007).

Otra característica singular de las peroxidasa tipo DyP es su habilidad para degradar colorantes antraquinónicos, los cuales no son sustrato para la mayoría de las peroxidasa (Faraco et al 2007). Además, aunque pocos estudios han caracterizado la función de estas proteínas, parece ser que se trata de enzimas bi-funcionales, pues aparte de la típica actividad peroxidasa, también presentan actividad hidrolasa (Sugano 2009).

El primer reporte sobre la degradación de colorantes sintéticos por oxidasas fúngicas se dio en 1990, cuando Cripps et al. observaron que los cultivos de *Phanerochaete chrysosporium* eran capaces de decolorar distintos compuestos (Stolz 2001). Posteriormente se demostró que las enzimas de otros hongos también eran capaces de degradar los colorantes y que incluso lo hacían con mayor eficiencia que las de *Phanerochaete chrysosporium* (Dias et al 2003). A partir de entonces, la remoción de colorantes utilizando enzimas ligninolíticas se convirtió en un área de investigación de gran interés (Anjaneyulu et al 2005). Sin embargo, aunque se ha estudiado ampliamente la capacidad de las enzimas para decolorar los tintes sintéticos y los factores que afectan el proceso de decoloración, poco se ha considerado el hecho de que estas enzimas no catalizan la mineralización de los colorantes, sino solo su bio-transformación en moléculas incoloras o menos coloreadas que permanecen en solución y que también pueden exhibir efectos tóxicos sobre la salud humana y el medio ambiente (Méndez-Hernández et al 2013; Zille et al 2005; Johannes y Majcherczyk 2000).

2.5. Procesos biológicos secuenciales para la eliminación de los colorantes sintéticos

Años de investigación sobre la degradación biológica de los colorantes sintéticos han dejado claro que la complejidad de los mismos impide que la aplicación de una sola estrategia sea suficiente para lograr un tratamiento de remoción exitoso. Por lo tanto, poco a poco la investigación se ha inclinado hacia el estudio de tratamientos acoplados en donde puedan aprovecharse los potenciales metabólicos de más de un solo tipo de microorganismos.

Entre los procesos secuenciales más estudiados se encuentra la degradación de colorantes azoicos en sistemas de tratamiento anaerobio – aerobio (O'Neill et al 2000a).

En estos casos, la decoloración reductiva del colorante ocurre durante la etapa anaerobia, en donde es degradado hacia la formación de aminas aromáticas; posteriormente, el

efluente decolorado es sometido a un tratamiento con lodos activos en donde las aminas aromáticas son eliminadas (O'Neill et al 2000a; Méndez-Paz et al 2005; Li et al 2010).

Otra estrategia en estudio, es la utilización de tratamientos acoplados enzimas ligninolíticas – lodos activados (Novotný et al 2011). En este caso, se propone la aplicación de oxidasas fúngicas para decolorar *específicamente* el efluente derivado del proceso de teñido; posteriormente el efluente decolorado puede ser mezclado con los efluentes de otras etapas del proceso y ser tratado en un sistema biológico con lodos activados (Novotný et al 2011).

3. Justificación

Se estima que la producción global de colorantes asciende a las 800 000 toneladas por año, que más de 10 000 colorantes distintos se encuentran comercialmente disponibles y que al menos el 10 % de éstos entra al medio ambiente de forma inalterada (Palmieri et al 2005).

Los efluentes coloreados no representan sólo un problema estético, en realidad representan un verdadero problema económico y de salud pública al ser los responsables de un sinnúmero de efectos adversos sobre los ecosistemas receptores. Asimismo, los colorantes sintéticos se han relacionado con diferentes padecimientos humanos, entre ellos: alergias, dermatitis por contacto y desarrollo de tumores (Raymundo et al. 2010; El Gaini et al. 2009). Diversos métodos fisicoquímicos (ej. la adsorción, fotodegradación, degradación electroquímica, etc.) han sido aplicados en la remoción de los colorantes textiles de las aguas residuales (El Gaini et al 2009; Vautier et al 2001; Ammar et al 2006). Sin embargo, estas tecnologías presentan desventajas importantes relacionadas principalmente con sus altos costos de inversión y operación, además de la generación de lodos y subproductos tóxicos que ocurre en algunos casos (Champagne y Ramsay 2010).

Por otro lado, los sistemas biológicos han probado ser una alternativa eficiente y de bajo costo para conseguir el tratamiento de las aguas residuales; no obstante, estudios previos han mostrado que los tratamientos biológicos convencionales son ineficientes en la remoción de los colorantes textiles lo que vuelve indispensable el estudio de nuevos tratamientos (Pagga y Brown 1986; Fischer-Colbrie et al 2005; Novotny et al 2011).

Una alternativa biológica prometedora es la aplicación de enzimas oxidativas (lacasas y peroxidasas) en la degradación de estos compuestos. De hecho, la literatura es extensa en cuanto al estudio de los factores que influyen los procesos de decoloración, particularmente aquellos catalizados por lacasas. Sin embargo, sólo algunos consideran el hecho de que estas enzimas no catalizan la oxidación de los colorantes hasta su mineralización, sino solo su bio-transformación en moléculas incoloras o menos coloreadas que también pueden exhibir efectos tóxicos sobre el medio ambiente. Por tanto, es esencial estudiar no solo la identidad de los metabolitos producidos durante los tratamientos

enzimáticos, sino también la mineralización de estas moléculas en un sistema de tratamiento apropiado.

Por lo anterior, en este trabajo se propuso estudiar la biodegradación de un efluente simulado de la industria textil contaminado con el colorante azul ácido 74 por medio de la aplicación de las enzimas oxidativas producidas por el hongo *Fomes* sp. EUM1, identificar los principales productos de la oxidación enzimática del colorante y estudiar un sistema biológico anaerobio como alternativa para complementar el tratamiento enzimático y lograr la degradación completa del colorante.

4. Hipótesis

Un tratamiento secuencial enzimas oxidativas – digestión anaerobia permitirá decolorar y destoxificar un efluente simulado de la industria textil contaminado con el colorante azul ácido 74.

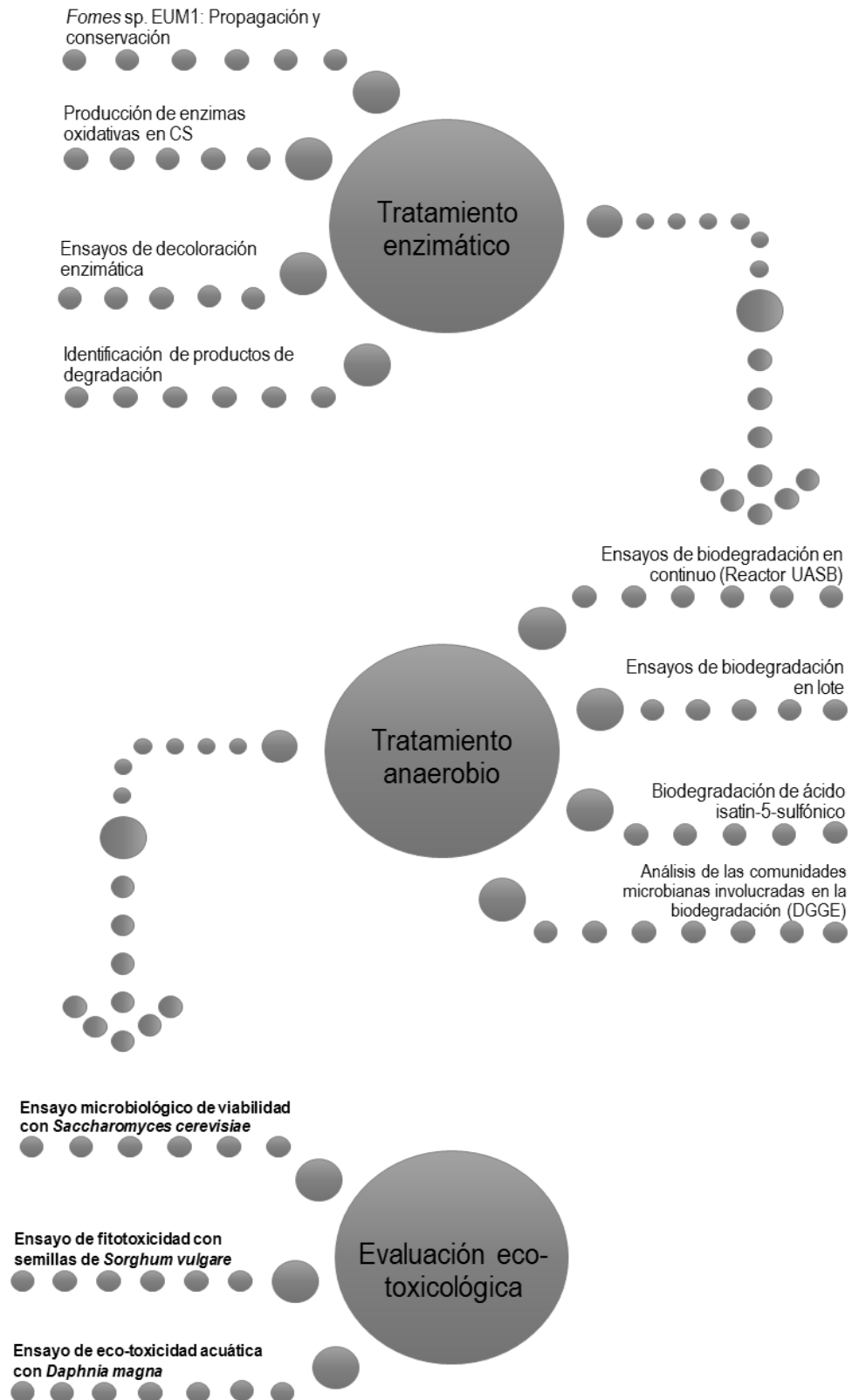
5. Objetivo General

Decolorar y destoxificar un efluente simulado de la industria textil contaminado con el colorante azul ácido 74 por medio de un tratamiento secuencial enzimas oxidativas – digestión anaerobia.

6. Objetivos Particulares

- Propagar y conservar a largo plazo el hongo ligninolítico *Fomes* sp. EUM1.
- Evaluar la producción de enzimas oxidativas (lacasas y peroxidasas) del hongo *Fomes* sp. EUM1 crecido en cultivo sólido (CS) sobre rastrojo de maíz.
- Evaluar la decoloración enzimática de un efluente simulado de la industria textil contaminado con azul ácido 74 empleando un extracto crudo enzimático (ECE) de *Fomes* sp. EUM1 y un producto comercial con actividad lacasa (Biolite®).
- Identificar los principales productos de la oxidación enzimática (con el ECE de *Fomes* sp. EUM1 y con una lacasa comercial) del colorante azul ácido 74 por medio de espectrometría de resonancia magnética nuclear de protón (RMN ¹H)
- Evaluar la efectividad de un tratamiento anaerobio para completar la biodegradación del efluente textil decolorado por vía enzimática.
- Estudiar las comunidades microbianas involucradas en la biodegradación anaerobia del efluente decolorado vía enzimática mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE).
- Realizar una evaluación eco-toxicológica del efluente simulado antes y después de ser sometido al tratamiento secuencial enzimas oxidativas – digestión anaerobia.

7. Esquema General de Trabajo



8. Metodología

8.1. Microorganismo y preparación del inóculo

Se trabajó con el hongo ligninolítico *Fomes* sp. EUM1 el cual fue aislado a partir de residuos de madera en el estado de Yucatán (Medina, 2003).

Para la preparación del inóculo, el hongo se cultivó en placas Petri que contenían agar, extracto de malta y extracto de levadura (extracto de malta 40 g l⁻¹, extracto de levadura 3 g l⁻¹, agar 15 g l⁻¹). Las placas se inocularon con un disco de agar con micelio (6 mm diámetro) y se incubaron a 35 °C durante 7 días. El micelio así obtenido se utilizó como inóculo durante los cultivos en medio sólido.

La conservación del hongo se realizó en cultivos en tubos con agar inclinado (agar extracto de malta y levadura) mantenidos a 4 °C.

8.2. Producción de enzimas oxidativas en cultivo sólido

Sustratos

Se realizaron cultivos en medio sólido para analizar la producción de enzimas oxidativas (lacasas y peroxidasas) del hongo *Fomes* sp. EUM1. Los sustratos utilizados para el cultivo del hongo fueron: rastrojo de maíz picado (RM) y salvado de trigo (ST). El rastrojo de maíz se tamizó y las partículas obtenidas de las mallas 6 (4.06 mm), 10 (2.52 mm) y 20 (0.61 mm) se mezclaron en proporciones iguales y se utilizaron como sustrato. El salvado de trigo fue adquirido en el mercado local donde se encuentra disponible bajo el nombre de “Salvado Natural”.

Condiciones de cultivo

Los cultivos en medio sólido se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 3 g de sustrato seco humedecido con 12 ml de agua destilada. Se evaluaron 4 medios de cultivo distintos:

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

4. Mezcla de RM (2.4 g) y ST (0.6 g) en proporción 80:20 (p/p) adicionada con G (10 g l⁻¹) y EL (5 g l⁻¹).

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

Todos los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave (121 °C, 15 psi, 25 min) y posteriormente se inocularon con 5 discos de agar con micelio (6 mm diámetro). La incubación se realizó a 35 °C durante 12 días. La cuantificación de la producción de enzimas se realizó diariamente en el extracto crudo enzimático (ECE) obtenido de cada cultivo.

Obtención del extracto crudo enzimático (ECE)

Para la extracción de las enzimas los matraces se colocaron en un baño de hielo, se agregaron 75 ml de agua destilada y el cultivo se agitó constantemente durante 30 minutos en una parrilla con agitación magnética. Posterior a esto, el contenido de los matraces se filtró a través de papel Whatman No. 40 y, para eliminar los sólidos suspendidos, la fracción líquida se centrifugó a 10,000 rpm durante 12 minutos a 4° C (Centrifuge, Eppendorf 5402). El sobrenadante se utilizó para la cuantificación de la actividad enzimática.

8.3. Determinaciones analíticas

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

Actividad lignina peroxidasa (LiP): La actividad LiP se determinó utilizando el colorante azure B como sustrato ($\epsilon_{651 \text{ nm}} = 48,800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Archibald, 1992). La mezcla de reacción contenía: 0.4 ml de buffer de tartrato de sodio (pH 3.0, 125 mM), 0.2 ml de azure B (0.160

mM), 0.2 ml de ECE y 0.2 ml de H_2O_2 (2 mM). La reacción inició con la adición del H_2O_2 y el cambio en la absorbancia se determinó durante 3 minutos a 651 nm a 25 °C (DU 640 Beckman). La actividad enzimática se expresó en unidades por gramo de sustrato seco inicial (U gss^{-1}), en donde una unidad de actividad enzimática (U) se definió como el decremento en la densidad óptica de 0.1 unidades min^{-1} .

Actividad manganeso peroxidasa (MnP): Se determinó por medio de la oxidación del rojo de fenol ($\epsilon_{610\text{nm}} = 22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La mezcla de reacción contenía: 50 μl de rojo de fenol (0.01%), 50 μl lactato de sodio (25 mM), 50 μl de MnSO_4 (100 μM), 50 μl albúmina de suero bovino (0.1 %), 50 μl H_2O_2 (100 μM) y 250 μl buffer de succinato de sodio (pH 4.5, 20 mM) y 550 μl de ECE en un volumen total de 1 ml. La reacción se llevó a cabo a 30 °C por 5 min y se detuvo agregando 40 μL de NaOH (2 N). La absorbancia se leyó a 610 nm (DU 640 Beckman) y la actividad enzimática se expresó en unidades por gramo de sustrato seco inicial (U gss^{-1}), en donde una unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μmol de rojo de fenol en un minuto (Kuwahara, et al. 1984).

Actividad peroxidasa tipo DyP (DyP): Se determinó utilizando el colorante Remazol Brilliant Blue R (RBBR) como sustrato ($\epsilon_{592\text{nm}} = 9000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Shin et al 1997). El ensayo se realizó en un buffer de acetatos (pH 4.0, 20 mM) a 25 °C. La mezcla de reacción contenía: 0.4 ml de RBBR (125 μM), 0.5 ml de ECE y 0.1 ml de H_2O_2 (1mM). La reacción se inició añadiendo el H_2O_2 y la actividad enzimática se calculó a partir del decremento en la absorbancia a 592 nm. La actividad enzimática se expresó en unidades por gramo de sustrato seco inicial (U gss^{-1}), en donde una unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima que decolora 1 μmol de RBBR por minuto.

8.4. Decoloración enzimática del efluente simulado de la industria textil

8.4.1. Preparación del efluente simulado

Puesto que la presencia de sales como el NaCl es muy común en los efluentes textiles, inicialmente se preparó una solución 0.05 M de NaCl empleando para ello agua destilada.

Posteriormente se disolvieron 100 mg l⁻¹ del colorante Azul ácido 74 (Sigma Aldrich) en la solución de NaCl preparada inicialmente. El pH del efluente simulado fue de 6.45 (sin realizar ningún ajuste).

8.4.2. Pruebas de decoloración

Para determinar la capacidad de decoloración de las enzimas oxidativas producidas por *Fomes* sp. EUM1, el hongo se cultivó nuevamente en los medios 2 y 4 (mejores medios para la producción de lacasas y peroxidasas tipo DyP, *ver resultados sección 9.1*) y en los días de máxima actividad enzimática (lacasa o peroxidasa tipo DyP) se obtuvo el ECE. Una alícuota de este extracto (el tamaño de la alícuota dependió de la actividad enzimática del ECE) se añadió al efluente simulado, el cual se colocó en incubación a 40 °C en un agitador orbital a 100 rpm por 8 h; el volumen total de la mezcla de reacción fue de 100 ml. La actividad lacasa y peroxidasa tipo DyP aplicada al inicio de los ensayos fue de 217 U l⁻¹ y 159 mU l⁻¹, respectivamente.

Para determinar la capacidad de decoloración de las peroxidasas tipo DyP desde un inicio se añadió H₂O₂ (2 mM, concentración final) a los ensayos con el ECE obtenido del cultivo del hongo en el Medio 4.

Adicionalmente se montaron experimentos utilizando un producto comercial con actividad lacasa (Biolite®). Los ensayos se realizaron en vasos de precipitado de 250 ml conteniendo el efluente simulado y la enzima (concentración final: 18 U l⁻¹), el volumen total de la mezcla de reacción fue de 100 ml. La incubación se realizó en las mismas condiciones que los ensayos anteriores. Como control se realizaron experimentos en ausencia del ECE y en presencia del mismo pero inactivado por calor.

Para evaluar la estabilidad de las enzimas ligninolíticas (lacasa y peroxidasa tipo DyP) la actividad enzimática se determinó al inicio y al final de cada ensayo.

En todos los casos el avance de la decoloración se monitoreó por espectrofotometría (Varian Cary 50 Conc). Inicialmente se realizó un barrido en el espectro visible (450 a 750 nm) para determinar la longitud de onda de máxima absorción del colorante (Azul ácido 74).

La absorbancia registrada a 609 nm se utilizó para calcular el porcentaje de decoloración del efluente utilizando la ecuación 1:

$$\% \text{ de Decoloración} = \left(\frac{A_i - A_f}{A_i} \right) 100 \quad (1)$$

En donde:

A_i = Absorbancia a 609 nm al inicio del ensayo (Longitud de onda de máxima absorción del Azul ácido 74)

A_f = Absorbancia a 609 nm en cada punto de muestreo

Con los resultados obtenidos se calculó la tasa inicial de decoloración, la cual se expresó en mg de colorante oxidado por litro por hora ($\text{mg l}^{-1} \text{h}^{-1}$).

8.4.3. Identificación de los productos de la oxidación enzimática del colorante Azul ácido 74

Inicialmente el efluente decolorado enzimáticamente (utilizando el ECE de *Fomes* sp. EUM1-Medio 2 o la lacasa comercial Biolite®) se congeló, descongeló y filtró para remover los polisacáridos precipitados. Posteriormente los filtrados se concentraron por liofilización (Labconco, Freezone 2.5) y los productos obtenidos se analizaron por resonancia magnética nuclear de protón (RMN ^1H). Los espectros de RMN se obtuvieron en un equipo Varian Mercury de 400 MHz (Varian, Inc., CA, USA) utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) o metanol como disolventes y los desplazamientos químicos se determinaron a partir de la resonancia del tetrametilsilano (TMS) utilizado como estándar interno (0 ppm). También se analizaron muestras de ácido isatin-5-sulfónico bajo las mismas condiciones.

8.5. Tratamiento anaerobio del efluente textil decolorado por vía enzimática

8.5.1. Caracterización inicial de los lodos granulares (inóculo)

Sólidos suspendidos: totales (SST), fijos (SSF) y volátiles (SSV): Se determinaron de acuerdo con métodos estándar (APHA 2005). Para ello se colocaron 30 ml del lodo a analizar en una cápsula de porcelana llevada previamente a peso constante. La cápsula se incubó en una estufa a 110 °C durante 24 h, se enfrió en desecador y se pesó; este procedimiento se repitió hasta que se registró un peso constante. Posteriormente la cápsula

se colocó en una mufla a 550 °C durante 30 min, se enfrió en desecador y se pesó. Finalmente la concentración de sólidos totales, fijos y volátiles se obtuvo de la siguiente manera:

$$\text{Sólidos totales (g l}^{-1}\text{)} = \frac{PCm(g) - PCv(g)}{\text{Volumen de lodo (l)}} \quad (2)$$

En donde:

PCm = Peso de la cápsula con la muestra de lodo

PCv = Peso de la cápsula vacía.

$$\text{Sólidos fijos (g l}^{-1}\text{)} = \frac{PCc(g) - PCv(g)}{\text{Volumen de lodo (l)}} \quad (3)$$

En donde:

PCc = Peso del crisol después de la calcinación (a 550 °C).

$$\text{Sólidos volátiles (g l}^{-1}\text{)} = \text{Sólidos totales (g l}^{-1}\text{)} - \text{Sólidos fijos (g l}^{-1}\text{)} \quad (4)$$

Velocidad de sedimentación: Se colocaron 500 ml de lodo granular en una probeta de 500 ml graduada en centímetros. Cada 10 segundos durante 1 minuto y luego cada minuto durante 5 minutos se midió la altura de la columna de lodo a través de la probeta. Se construyó una gráfica de altura de la columna de lodo (cm) contra el tiempo (seg) y se calculó la pendiente en la parte lineal de la curva. La velocidad de sedimentación del lodo se expresó en metros por hora ($m h^{-1}$).

8.5.2. Biodegradación anaerobia en continuo del efluente decolorado vía enzimática. Puesta en marcha del reactor UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*)

El tratamiento anaerobio del efluente decolorado vía enzimática (Biolite®) se llevó a cabo en un reactor tipo UASB (puesto que este sistema operó en un régimen continuo, en estos ensayos no se evaluó el tratamiento del efluente decolorado con el ECE de *Fomes sp.* EUM1; para el estudio de este efluente se utilizó la metodología descrita en la sección

8.5.4). Para ello se trabajó con un reactor de vidrio de 950 ml colocado en un cuarto con temperatura controlada (30 °C). El reactor se inoculó con 250 ml de lodo granular metanogénico obtenido de un reactor UASB industrial adaptado al tratamiento del agua residual generada en una empresa de productos alimenticios.

Inicialmente, el reactor se alimentó con medio mineral¹ durante 5 días a un TRH de 24 h y después de este periodo se inició la alimentación con el efluente textil decolorado por vía enzimática. El reactor se alimentó con una mezcla del efluente decolorado y agua residual municipal en proporción 1:4 (v/v), utilizando una bomba peristáltica (Bomba modular L/S, Masterflex) con manguera de silicón (Masterflex, 14). Las condiciones iniciales de operación fueron: TRH, 24 horas; temperatura, 30 ± 2 °C; pH 7; carga orgánica volumétrica, 0.8 g DQO l⁻¹d⁻¹. Una vez alcanzado el estado estacionario, se aumentó la carga orgánica volumétrica a 1 y 1.5 g DQO l⁻¹d⁻¹. Como variables de control se cuantificó periódicamente la producción de CH₄, la eliminación de la DQO, el pH y la alcalinidad en el efluente del reactor. El biogás generado se recolectó y cuantificó por medio de una columna de desplazamiento conectada a la tapa del reactor, esta columna contenía una solución salina saturada (NaCl 300 g l⁻¹, pH 2.0) y rojo de metilo como indicador de la disolución del CO₂. El análisis de la composición del biogás se realizó por cromatografía de gases en un equipo Gow-Mac con un detector de conductividad térmica utilizando una columna Carbosphere 80/100, las condiciones del análisis fueron: temperatura de la columna: 140 °C, temperatura del detector: 190 °C, temperatura del inyector: 170 °C, fase móvil: helio, presión 40 psi, flujo: 25 ml min⁻¹, polaridad, 120 mA. La determinación de la DQO se realizó por el método de reflujó cerrado con dicromato de potasio (APHA, 2005).

¹ Composición del *medio mineral* (g l⁻¹): NaH₂PO₄·H₂O, 0.703; K₂HPO₄, 0.6; NH₄Cl, 0.5; MgSO₄·7H₂O, 0.111; CaCl₂·2H₂O, 0.1, y 1 ml l⁻¹ de una solución de elementos traza preparada como sigue (mg l⁻¹): FeCl₂·4H₂O, 2; MnCl₂·4H₂O, 0.786; Na₂SeO₃, 0.1; H₃BO₃, 0.05; ZnCl₂, 0.05; (NH₄)₆Mo₇O₂, 0.05; AlCl₃, 0.05; NiCl₂·6H₂O, 0.05; CoCl₂·6H₂O, 0.07; CuCl₂·2H₂O, 0.05 y HCl 36 %, 0.5 ml

8.5.3. Estudio de las comunidades microbianas involucradas en la biodegradación del efluente decolorado mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)

El análisis de las comunidades microbianas se realizó en el lodo granular utilizado como inóculo durante el arranque del reactor UASB y del lodo obtenido al final de la operación del mismo (412 días). Para ello se tomaron muestras de 1.5 g de lodo las cuales se centrifugaron durante 10 minutos a 10,000 rpm para eliminar el exceso de agua. El sobrenadante se descartó y se tomaron 0.6 g de lodo para continuar con el procedimiento. La extracción del ADN se realizó utilizando un kit comercial para extracción de ADN de bacterias de suelo Ultra Clean™ Soil DNA isolation (MO BIO Laboratories, CA, USA). La efectividad de la extracción se evaluó mediante electroforesis (80 V, 45 min) en geles de agarosa al 1%. La cuantificación del ADN extraído y la pureza del mismo se determinaron en un espectrofotómetro para micromuestras (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) midiendo la absorbancia a 260 nm y la relación entre la absorbancia a 260 y a 280 nm, respectivamente.

Amplificación de las Regiones V2-V3 y V6-V8 del gen 16S del rDNA de arqueas y bacterias

La región V2-V3 de los genes de arqueas del 16S rDNA fue amplificada usando los iniciadores A109 (T)-f (5'-ACTGCTCAGTAACACGT-3') y 515-r (5'-ATCGTATTACCGCGGCTGCTGCTGGCAC-3') con grapa (Lane, 1991). La región V6-V8 de los genes bacterianos del rDNA 16S fue amplificada usando los iniciadores bacterianos 968-f (5'-GAACGCGAAGAACCTTACC-3') con grapa y 1401-r (5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3') (Nübel y col 1996). La grapa para DGGE consistió en una secuencia de 40 pb (5'-CGCCCGGGGCGCGCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG-3').

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (MultiGene TC020-24, Labnet), utilizando el kit comercial HotStar Taq Master Mix (QUIAGEN). La mezcla de reacción (50 µL de volumen final) consistió en: 25 µL de la solución Master Mix la cual contenía una mezcla de nucleótidos (concentración final: 10 mM por nucleótido), amortiguador de pH, MgCl₂ (concentración final: 25 mM) y Taq DNA polimerasa (concentración final: 5u/µL), 1µL de cada primer (10 mM), 1 µL de ADN del lodo y 22 µL de agua inyectable estéril. Las

condiciones de reacción para la amplificación de la región V6-V8 fueron: Activación de la Taq polimerasa: 95 °C durante 15 min; 30 ciclos con una desnaturalización a 94 °C, 45 seg; hibridación a 60 °C, 30 seg; elongación a 72 °C, 1.5 min y como ciclo final una elongación a 72 °C, 10 min (Nielsen et al 2004). Las condiciones de reacción para la amplificación de la región V2-V3 fueron: activación de la Taq polimerasa, 95 °C durante 15 min; 35 ciclos con una desnaturalización a 95 °C, 30 seg; hibridación a 53 °C, 40 seg; elongación a 72 °C, 1 min y como ciclo final una elongación a 72 °C, 7 min (García-Saucedo y col., 2008). El rendimiento y calidad de los productos de amplificación se verificó por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, la separación se realizó a 90 V durante 30 minutos.

Con la finalidad de aumentar la cantidad de los productos de amplificación, una vez verificada la obtención de los fragmentos deseados se procedió a realizar dos re-amplificaciones consecutivas utilizando como molde los productos de PCR obtenidos en cada amplificación previa. Los fragmentos re-amplificados se guardaron en congelación a -20 °C hasta su posterior uso.

Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)

Los fragmentos V6-V8 de bacteria y V2-V3 de arquea obtenidos anteriormente se analizaron por DGGE en geles de poliacrilamida al 6% utilizando una cámara de electroforesis para detección de mutaciones (DCode™ Universal Mutation Detection System, BIORAD). El ambiente desnaturalizante se creó mediante la combinación de una temperatura constante (60 °C) y un gradiente desnaturalizante formado por urea y formamida.

Inicialmente se prepararon las siguientes soluciones:

Acrilamida/Bis-acrilamida (37.5:1) al 40 %

Reactivo	Cantidad
Acrilamida	38.93 g
Bis-acrilamida	1.07 g
Agua desionizada	Aforar a 100 ml

La solución se filtró por gravedad a través de papel filtro Wathman No. 1 y se almacenó en la oscuridad a 4 °C por no más de 1 mes.

Buffer TAE 50x

Reactivo	Cantidad
Base Tris	121.0 g
Ácido acético glacial	28.55 g
EDTA 0.5 M, pH 8.0	50 ml
Agua desionizada	Aforar a 500 ml

Primeramente se preparó la solución de EDTA 0.5 M; para lograr la disolución completa del reactivo el pH se ajustó a 8.0 agregando poco a poco NaOH en hojuelas. El TAE 50x se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso.

Buffer de carga 2x

Reactivo	Cantidad
Azul de Bromofenol al 2 %	0.25 ml
Xileno cianol al 2 %	0.25 ml
Glicerol al 100 %	8 ml
Agua desionizada	1.5 ml

Solución desnaturizante 0 %

Reactivo	Cantidad
Acrilamida/Bis 40%	7.5 ml
Buffer TAE 50x	0.5 ml
Agua desionizada	42 ml

La solución se almacenó en la oscuridad a 4 °C durante no más de 1 mes.

Solución desnaturizante 100 %

Reactivo	Cantidad
Acrilamida/Bis 40%	7.5 ml
Buffer TAE 50x	0.5 ml
Formamida	20 ml
Urea	21 g
Agua desionizada	Aforar a 50 ml

La solución se almacenó en la oscuridad a 4 °C durante no más de 1 mes.

La separación de los fragmentos V6-V8 de bacteria y V2-V3 de arquea se realizó en un gradiente desnaturizante de 30 a 55% y de 40 a 55%, respectivamente.

Para la preparación del gradiente 30-55 % para bacteria se elaboraron por separado en tubos de plástico de 50 ml, 20 ml de la solución “low” (30 % desnaturizante) y 20 ml de la solución “high” (55 % desnaturizante) mezclando las soluciones 0 y 100% desnaturizante de la siguiente manera:

Solución “Low” – 30 % desnaturizante

Reactivo	Cantidad
Solución desnaturizante 0%	14 ml
Solución desnaturizante 100%	6 ml
Volumen final	20 ml

Solución “high” – 55 % desnaturizante

Reactivo	Cantidad
Solución desnaturizante 0%	6 ml
Solución desnaturizante 100%	14 ml
Volumen final	20 ml

De la misma forma, para la preparación del gradiente 40-55 % para arquea se elaboraron por separado las soluciones “low” (40 % desnaturizante) y “high” (55 % desnaturizante) mezclando las soluciones 0 y 100% desnaturizante de la siguiente manera:

Solución “Low” – 40 % desnaturizante

Reactivo	Cantidad
Solución desnaturizante 0%	12 ml
Solución desnaturizante 100%	8 ml
Volumen final	20 ml

Solución “high” – 55 % desnaturalizante

Reactivo	Cantidad
Solución desnaturalizante 0%	6 ml
Solución desnaturalizante 100%	14 ml
Volumen final	20 ml

Las soluciones “low” y “high” se prepararon en un baño de hielo y una vez que se encontraban frías se agregaron los catalizadores de polimerización: 20 μL de N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina (TEMED) y 77 μL de persulfato de amonio al 10% (APS). Las soluciones se vertieron en los compartimentos correspondientes del formador de gradiente (Gradient former, BIO-RAD) y se inició la carga del gel. Una vez polimerizado, el gel se colocó dentro de la cámara de electroforesis conteniendo 6 L de buffer de corrida (TAE 0.5x) previamente calentado a 60 °C y se procedió a la carga de las muestras. Las muestras se prepararon mezclando 40 μL del producto de PCR correspondiente y 40 μL del buffer de carga 2x. La electroforesis se llevó a cabo a 60 °C aplicando un voltaje de 180 V durante 5 min y posteriormente un voltaje de 85 V durante 16 h.

Al término de la electroforesis los geles se tiñeron por inmersión en una solución de GelRed 3x (Biotium) durante 2 h. El gel se retiró de la solución y se fotografió mediante un fotodocumentador Gel Pro 2200, Carestream.

8.5.4. Biodegradación anaerobia en lote del efluente decolorado con el ECE de *Fomes* sp. EUM1

El tratamiento anaerobio del efluente decolorado vía enzimática (ECE obtenido del cultivo del hongo *Fomes* sp. EUM1 en el medio 2) se llevó a cabo en reactores en lote utilizando como inóculo lodo granular obtenido del reactor UASB descrito en la sección 8.5.2. Los ensayos se realizaron en botellas serológicas de 60 ml inoculadas con 4.5 ± 0.19 g SV L⁻¹. Para la preparación de la alimentación de los reactores se utilizó el siguiente *medio mineral* (g l⁻¹): NaH₂PO₄·H₂O, 0.703; K₂HPO₄, 0.6; NH₄Cl, 0.5; MgSO₄·7H₂O, 0.111; CaCl₂·2H₂O, 0.1, y 1 ml l⁻¹ de una solución de elementos traza preparada como sigue (mg l⁻¹): FeCl₂·4H₂O, 2; MnCl₂·4H₂O, 0.786; Na₂SeO₃, 0.1; H₃BO₃, 0.05; ZnCl₂, 0.05; (NH₄)₆Mo₇O₂,

0.05; AlCl_3 , 0.05; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.05; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.07; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.05 y HCl 36 %, 0.5 ml (Durán et al 2008). El medio anterior se mezcló con el efluente decolorado para obtener diluciones del efluente con una DQO inicial de 300, 650 o 1,000 mg l^{-1} . Como control se utilizaron botellas conteniendo únicamente medio mineral e inóculo. Las botellas se sellaron con tapones de neopreno y aros de aluminio; se realizó un intercambio de atmósfera para eliminar el oxígeno molecular, utilizando para ello una corriente de nitrógeno aplicada durante 1 min. La incubación se realizó a 35 °C en condiciones estáticas (sin agitación). La recolección, cuantificación y análisis del biogás se realizó de acuerdo con la metodología descrita anteriormente. La producción neta de metano se calculó restando el volumen de metano producido en las botellas control de aquel producido en presencia del efluente decolorado. Las variables de respuesta fueron: la eficiencia de remoción de la DQO (ϵDQO) y la tasa específica de producción de metano ($q\text{CH}_4$).

8.5.5. Biodegradación anaerobia en lote del ácido isatin-5-sulfónico (AIS)

Los ensayos se realizaron en botellas serológicas de 60 ml de acuerdo con la metodología descrita en la sección 8.5.4. Como sustrato se trabajó con tres concentraciones de ácido isatin-5-sulfónico: 20, 50 y 100 mg l^{-1} adicionado como única fuente de carbono y energía. Como control se utilizaron botellas con medio mineral e inóculo en ausencia de sustrato. La cuantificación del biogás producido, la composición del mismo y la producción neta de metano se determinaron siguiendo la metodología antes descrita. La concentración residual de ácido isatin-5-sulfónico se cuantificó por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en un cromatógrafo Waters (Waters 600, Milford, MA, USA) acoplado a un detector de arreglo de diodos (Waters 2996, Milford, MA, USA). La separación de la muestra se realizó en una columna Econosphere C18 (4.0 mm X 250 mm) utilizando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo-agua (15/85 v/v) con un flujo de 0.5 ml min^{-1} . La detección de ácido isatin-5-sulfónico se realizó a 244 nm. Inicialmente se realizó una curva estándar en un intervalo de concentraciones entre 0 y 100 mg l^{-1} . Los datos experimentales se ajustaron por regresión lineal; con ello se obtuvo una ecuación a partir de la cual se interpolaban los resultados obtenidos en el análisis de las muestras problema. Para verificar posibles

pérdidas del compuesto debido a su absorción en el lodo, al final del ensayo se tomó una muestra de lodo de cada botella, el lodo se lavó 3 veces en un buffer de fosfatos (pH 7.0, 50 mM), se maceró en un mortero y se sonicó durante 10 min (Ultrasonic bath, Cole-Parmer 8892, Chicago, USA). El residuo se centrifugó durante 10 min a 10,000 rpm (Eppendorff 5402 centrifuge, USA), se filtró a través de una membrana de 0.45 μm y se analizó por HPLC. Las variables de respuesta evaluadas fueron: eficiencia de remoción de la DQO inicial (ϵDQO), eficiencia de la eliminación del ácido isatín-5-sulfónico (ϵAIS) y la tasa específica de producción de metano ($q\text{CH}_4$).

8.6. Evaluación eco-toxicológica del efluente textil sometido al tratamiento secuencial enzimático-anaerobio

Se evaluó el potencial ecotoxicológico del efluente simulado de la industria textil durante las diferentes etapas de su biodegradación. La evaluación se realizó mediante una batería de pruebas que incluyó los siguientes bioensayos:

- 1) Ensayo microbiológico de viabilidad con *Saccharomyces cerevisiae*
- 2) Ensayo de fitotoxicidad con semillas de *Sorghum vulgare*
- 3) Ensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna*

Las muestras analizadas fueron:

- Efluente simulado de la industria textil
- Efluente simulado decolorado vía enzimática (Biolite®)
- Efluente del reactor UASB
- Ácido isatín-5-sulfónico (la toxicidad de este compuesto se evaluó únicamente mediante el ensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna*)

8.6.1. Ensayo Microbiológico de Viabilidad con *Saccharomyces cerevisiae*

El ensayo se realizó siguiendo la metodología propuesta por Rumlova y Dolezalova (2012), empleando como organismo de prueba una levadura deshidratada (*Saccharomyces cerevisiae*) proveniente de la compañía Lesaffre, Francia.

Primeramente, se realizaron diluciones de la muestra a evaluar utilizando agua destilada; las concentraciones evaluadas fueron: 0 (control, agua destilada), 6.25, 12.5, 25, 50 y 100%. Luego, se colocaron 10 ml de cada dilución en tubos de vidrio de 50 ml, adicionando posteriormente 25 mg de la levadura deshidratada. La cantidad de levadura adicionada correspondió a la requerida para visualizar en el microscopio entre 50 y 100 células por campo.

La suspensión se homogeneizó y se incubó a 25 °C durante 1 h. Luego de este tiempo una gota de la suspensión se colocó en un portaobjetos y se tiñó con azul de metileno (0.01% en buffer de acetatos [50 mM, pH 4.6]). La cantidad de células vivas (sin color) y muertas (color azul) se registró inmediatamente en al menos 15 campos, utilizando para ello el software de análisis de imagen Image-Pro 6.3. Con los datos obtenidos se calculó la concentración letal media (CL₅₀) definida como la concentración de la muestra necesaria para una disminuir en un 50% el porcentaje de viabilidad de los organismos de prueba.

8.6.2. Ensayo de fitotoxicidad con semillas de *Sorghum vulgare*

El ensayo se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por Gomare et al (2009), evaluando los efectos fitotóxicos de las muestras *problema* en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas de sorgo (*Sorghum vulgare*) durante los primeros 5 días de crecimiento.

Para ello se realizaron 6 diluciones de cada solución problema (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 75 y 100%) empleando agua dura reconstituida².

Los ensayos se realizaron en placas Petri de 9.5 cm de diámetro que contenían una base de papel filtro (Whatman No. 1). Cada papel filtro se humedeció con 4 ml de la solución problema o con 4 ml de agua dura reconstituida, en el caso de los controles. Posteriormente se colocaron 10 semillas de sorgo uniformemente distribuidas en la superficie del papel. Las placas se guardaron en bolsas de plástico para evitar la pérdida de humedad y se incubaron durante 120 h en oscuridad a 23 ± 2 °C.

² Agua dura reconstituida (g l⁻¹): MgSO₄, 0.12; NaHCO₃, 0.192; KCl, 0.08. Mantener en agitación hasta disolución completa. Disolver por separado 0.12 g de CaSO₄.2H₂O y adicionar a la solución anterior. Aforar a 1 l con agua destilada.

Terminado el periodo de exposición, se procedió a cuantificar el efecto en la germinación y en la elongación de la radícula y la plúmula. En cada caso, se comparó el efecto generado en los organismos expuestos a la solución problema con la respuesta observada en los organismos control (expuestos únicamente al agua dura reconstituida). Con los datos obtenidos se realizó una curva dosis-respuesta a partir de la cual se calculó la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) para la germinación, para el crecimiento de la radícula y para el desarrollo de la plúmula.

8.6.3. Ensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna*

Esta prueba se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por la norma Norma Mexicana NMX-AA-087-1995-SCFI. Las condiciones del ensayo se describen en la **Tabla 8.1.**

Tabla 8.1. Condiciones del ensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna*

Tipo de prueba	Estática
Duración	48 h
Luminosidad	600 luxes - 1000 luxes
Fotoperiodo	16 h luz / 8 h oscuridad
Volumen de los recipientes de prueba (viales de vidrio)	25 ml
Volumen total (agua reconstituida más muestra)	15 ml
Edad de los organismos de prueba	Menos de 24 h
Número de réplicas por concentración	4
Número de organismos por réplica	5
Agua de dilución	Agua dura reconstituida
Temperatura	20 ± 2 °C
Alimentación	No
Respuesta evaluada	Inmovilidad

Los datos obtenidos se analizaron por el Método de Unidades Probabilísticas (Probit) para determinar la relación dosis-respuesta de las muestras sobre los organismos de ensayo. Los resultados se reportan en términos de la concentración letal media (CL₅₀) y su correspondiente intervalo de confianza.

8.7. Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron al menos por triplicado y en tiempos independientes. La comparación de medias se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA) o pruebas de *t*. La comparación múltiple de medias se realizó utilizando las pruebas de Duncan o Dunnett, según el caso. Todos los análisis se realizaron con una significancia (α) de 0.05. Las curvas estándar se realizaron al menos por triplicado y en todos los casos los coeficientes de regresión fueron mayores de 0.995. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software SPSS 18.0.

9. Resultados y discusión

9.1. Producción de enzimas

Debido a su bajo costo y alta productividad, en las últimas décadas el cultivo en medio sólido de hongos ha sido catalogado como un sistema eficiente para la producción de metabolitos de interés comercial. En este trabajo se estudió la producción de enzimas oxidativas (lacasas y peroxidasas) del hongo *Fomes* sp. EUM1 en cultivo sólido sobre rastrojo de maíz y se evaluó el efecto de suplementos adicionales (salvado de trigo, glucosa y extracto de levadura) en la producción de cada enzima; los resultados se muestran en la

Fig. 9.1.

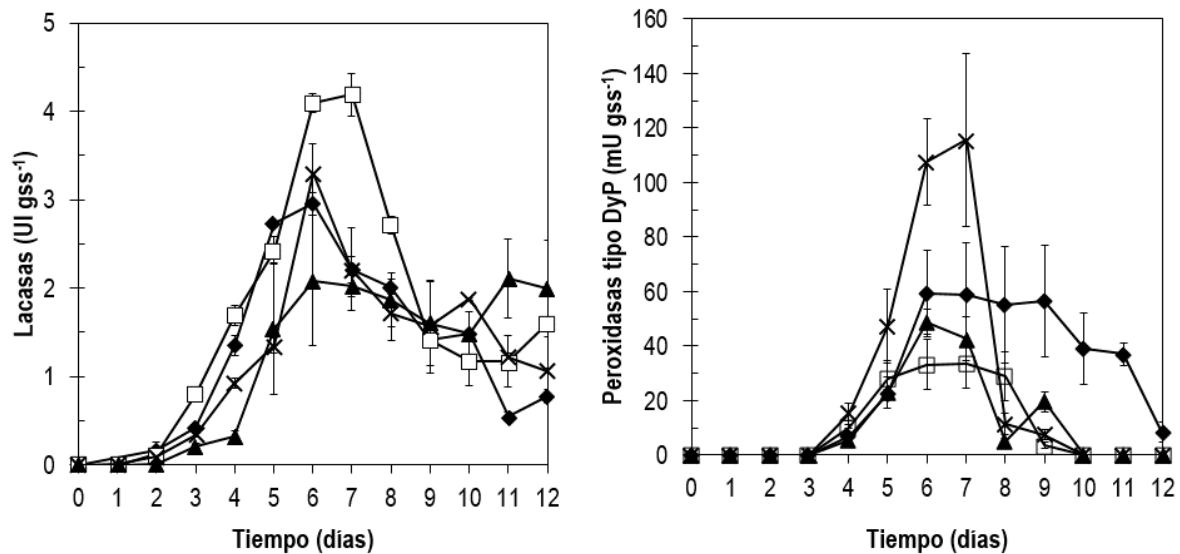


Fig. 9.1 Cinética de producción de lacasas y peroxidasas tipo DyP en cultivo sólido sobre diferentes medios. (◆) Rastrojo de maíz, (□) Rastrojo de maíz con salvado de trigo, (▲) Rastrojo de maíz, glucosa y extracto de levadura, (x) Rastrojo de maíz, salvado de trigo, glucosa y extracto de levadura.

La producción máxima de lacasas y peroxidasas tipo DyP sobre rastrojo de maíz (Medio 1) se registró 6 días después de la inoculación siendo de 2.9 ± 0.13 UI gss⁻¹ y 59.4 ± 15.4 mUI gss⁻¹, respectivamente. En ambos casos, la producción de enzimas aumentó paulatinamente hasta alcanzar un valor máximo y posteriormente comenzó a decaer. En ninguno de los medios de cultivo se registró actividad LiP ni MnP.

De forma interesante, la adición de salvado de trigo al rastrojo de maíz (Medio 2) ocasionó efectos *diferenciales* en la producción de cada enzima. Mientras que la producción de

lacasas aumentó en un 35 % (3.9 ± 0.12 UI gss⁻¹), la producción de peroxidasa tipo DyP disminuyó en más del 50 % (27.8 ± 6.7 mUI gss⁻¹).

Posteriormente, se evaluó la producción de enzimas en los Medios 1 y 2 adicionados con glucosa (10 g l⁻¹) y extracto de levadura (5 g l⁻¹).

Se ha reportado que en algunas cepas de hongos ligninolíticos la adición de una fuente de carbono de fácil asimilación resulta en una mayor producción de biomasa, lo que a su vez podría incrementar la producción de enzimas ligninolíticas (Mazumder et al. 2009; Pant et al. 2008). Además, también se ha observado que la modificación de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo y/o la adición de vitaminas, puede mejorar la producción de estas enzimas, en especial de las peroxidasa (Levin et al 2010).

Como puede observarse (**Fig. 9.1**), la adición de glucosa y extracto de levadura al rastrojo de maíz (Medio 3) resultó en un decremento del 28% en la producción de lacasas (2.1 ± 0.05 UI gss⁻¹), mientras que la producción de peroxidasa tipo DyP no se modificó significativamente con respecto a la obtenida en el Medio 1 (48.8 ± 4.4 mUI gss⁻¹). Por el contrario, la adición de estos elementos a la mezcla de rastrojo con salvado (Medio 4) dio lugar a un incremento del 80 % en la producción de peroxidasa (107 ± 15.8 mUI gss⁻¹) sin afectar la producción de lacasas (3.1 ± 0.37 UI gss⁻¹), con respecto a la producción en el Medio 1.

La producción de lacasas en cultivo sólido por hongos de pudrición blanca se ha reportado en numerosas ocasiones. En la **Tabla 9.1** se muestra una comparación entre la producción máxima de lacasas obtenida en *este trabajo* y la reportada previamente para otros hongos ligninolíticos.

Tabla 9.1. Producción máxima de lacasas en hongos de pudrición blanca crecidos en cultivo sólido sobre distintos residuos agroindustriales.

Cepa	Sustrato	Lacasa (U g ⁻¹)	Tiempo (días)	T (°C)	Referencia
<i>Pleurotus ostreatus</i> 3004	Paja de trigo	0.015	14	28	Vyas y Molitoris, 1995
<i>Pleurotus ostreatus</i> IE-8	Bagazo de caña	0.006	8	29.5	Membrillo et al 2008
<i>Pleurotus ostreatus</i> 2191	Salvado de trigo	0.084	NR	27	Elisashvili et al 2008
<i>Funalia trigii</i> IBB 146	Salvado de trigo	0.190	NR	27	Elisashvili et al 2008
<i>Fomes sclerodermeus</i> BAFC 2752	Salvado de trigo	270	28	NR	Papinutti et al 2003
<i>Pleurotus ostreatus</i> CCBAS477	Paja de trigo	1.36	21	28	Valásková y Baldrian 2006
<i>Trametes versicolor</i> CCBAS614	Paja de trigo	0.072	21	28	Valásková y Baldrian 2006
<i>Ganoderma lucidum</i> HAI 957	Tallos de maíz	3.23	7	25	Simonik et al 2010
<i>Fomes</i> sp. EUM1	Rastrojo de maíz-Salvado de trigo	3.9	6	35	En este trabajo

Tiempo: Indica el tiempo en el que se alcanzó la actividad máxima NR. No se reporta, T. Temperatura

Puede observarse que aunque la producción máxima de lacasas en *Fomes* sp. EUM1 (3.9 U gss⁻¹) mejora significativamente a la alcanzada por varias cepas de *Pleurotus ostreatus*, también se encuentra muy por debajo de la producción de la cepa de *Fomes sclerodermeus* BAFC 2752 creciendo sobre salvado de trigo (270 U gss⁻¹).

La producción de enzimas extracelulares en los hongos de pudrición blanca es un fenómeno muy diverso, que ha mostrado diferencias entre especies del mismo género e incluso entre diferentes cepas de la misma especie. Ejemplo de ello es el hecho de que la producción de enzimas ligninolíticas en *Phanerochaete chrysosporium* se encuentra asociada con el metabolismo secundario, mientras que en el hongo *Fomes sclerodermeus* la producción de estas mismas enzimas está asociada con el crecimiento (Papinutti et al 2003).

Entre los factores que afectan la producción de lacasas en los hongos de pudrición blanca se encuentran: el tipo de cultivo (cultivo en medio sólido o líquido), el tamaño de partícula del sustrato (en el caso del cultivo sólido), la naturaleza y concentración de la fuente de

carbono y nitrógeno, la presencia de inductores, el pH del medio, la temperatura y tiempo de incubación, la humedad, aireación, entre otros (Simonic et al. 2010; Membrillo et al. 2008; Levin et al. 2004; Sugano et al. 2001).

Por otro lado, la producción de peroxidasas tipo DyP se ha descrito con mayor frecuencia en cultivos en medio líquido utilizando cepas como: *Thanatephorus cucumeris* Dec 1, *Pleurotus ostreatus* NFFA, *Pleurotus ostreatus* ATCC MYA-2306, *Termitomyces albuminosus* ATCC 42010 o *Marasmius scorodonius* (CBS 137.86) (Kim et al 1995; Shin et al 1997; Johjima et al 2003; Palmieri et al 2005; Scheibner et al 2008). Los estudios sobre la producción de peroxidasas tipo DyP en cultivo sólido son escasos y aún continúa en estudio su papel fisiológico. La producción de estas enzimas en cultivo sólido se ha realizado principalmente con una cepa recombinante de *Aspergillus oryzae*. El primer reporte sobre la producción de peroxidasas tipo DyP por una cepa nativa en cultivo sólido se dio en 1995 (Sugano 2009). En este año, Vyas y Molitoris (1995) describieron la producción de una peroxidasa tipo DyP en el cultivo sólido de *Pleurotus ostreatus* 3004 sobre paja de trigo. Estos autores reportaron que la producción de dicha peroxidasa ocurría de forma paralela con la producción de lacasas, MnP y peroxidasas independientes de Mn, encontrándose que el tiempo de producción máxima era el mismo para las cuatro enzimas. Estos resultados coinciden con lo encontrado para *Fomes* sp. EUM1, ya que los perfiles de producción de lacasas y peroxidasas tipo DyP fueron muy similares alcanzando su valor máximo de producción al mismo tiempo o en tiempos muy cercanos. Por otra parte, en relación con los niveles de producción, el nivel máximo de peroxidasas tipo DyP encontrado en *Fomes* sp. EUM1 a los 6 días de cultivo (107 mU gss⁻¹) fue similar al encontrado en *Pleurotus ostreatus* 3004 (121 mU gss⁻¹) a los 7 días de incubación.

Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que la producción de peroxidasas tipo DyP en *Fomes* sp. EUM1 es dependiente de la composición del medio de cultivo y que aunque su producción ocurre de manera paralela a la producción de lacasas, la síntesis de cada enzima se encuentra regulada por mecanismos distintos.

9.2. Ensayos de Decoloración

La evaluación de las características de las enzimas aplicables en procesos biotecnológicos, en particular, la estabilidad y la eficiencia para catalizar la reacción de interés, es de vital importancia para el desarrollo de nuevos procesos.

En este trabajo se estudió el potencial de las enzimas ligninolíticas del hongo *Fomes* sp. EUM1 y de un producto comercial con actividad lacasa (Biolite®), para decolorar un efluente simulado de la industria textil contaminado con el colorante azul ácido 74. Para ello, se trabajó con los ECE producidos durante el cultivo del hongo en el Medio 2 (*mejor medio para la producción de lacasas*) y en el Medio 4 (*mejor medio para la producción de peroxidases tipo DyP*). Los resultados se muestran en la **Tabla 9.2**.

Tabla 9.2. Decoloración del efluente simulado utilizando el ECE obtenido del cultivo del hongo *Fomes* sp. EUM1 en los Medios 2 y 4.

	Extractos Crudos Enzimáticos		
	Medio 2	Medio 4 (con H ₂ O ₂)	Medio 4 (sin H ₂ O ₂)
Actividad lacasa (UI l ⁻¹)	217.0 ± 43.2	159.0 ± 9.6	159.0 ± 9.6
Actividad peroxidasa tipo DyP (UI l ⁻¹)	0.86 ± 0.10	3.67 ± 0.54	3.67 ± 0.54
% Decoloración total	98.2 ± 1.5	87.6 ± 2.6	87.8 ± 4.7
Tasa inicial de decoloración (mg l ⁻¹ h ⁻¹)	27.1 ± 4.35	14.9 ± 3.7	15.2 ± 2.4
T (h)	5	6	6

%D: Porcentaje de decoloración total, T: Tiempo requerido para obtener la máxima decoloración del efluente.

El ECE obtenido a partir del cultivo del hongo en el Medio 2 (*mejor medio para la producción de lacasas*) decoloró el efluente simulado en un 98.2 % en 5 h, con una tasa inicial de decoloración de 27.05 ± 4.34 mg l⁻¹ h⁻¹. Para determinar la contribución específica de las peroxidases tipo DyP también se estudió la decoloración del efluente utilizando el ECE obtenido del cultivo del hongo en el Medio 4 (*mejor medio para la producción de peroxidases tipo DyP*). Puesto que en este extracto *también* se contaba con actividad lacasa, los ensayos se realizaron en presencia y en ausencia de peróxido de hidrógeno³.

³ El peróxido de hidrógeno es un co-sustrato indispensable para el inicio del ciclo catalítico de las peroxidases tipo DyP.

Como puede observarse en la **Tabla 9.2**, la adición de peróxido de hidrógeno no modificó significativamente la tasa inicial de decoloración ni el porcentaje máximo de decoloración alcanzado en ausencia del mismo, lo que indicó que la decoloración observada se debió principalmente a la actividad de las *lacasas* presentes en el ECE.

Algunos reportes en la literatura señalan que otras especies de hongos de pudrición blanca también son capaces de decolorar el azul ácido 74, sin embargo, como puede observarse en la **Tabla 9.3**, las lacasas presentes en el extracto enzimático de *Fomes* sp. EUM1 (Medio 2) fueron capaces de decolorar el compuesto a mayor velocidad, utilizando una menor concentración de enzima (sin purificar) y además, trabajando en presencia de una concentración mayor del colorante.

Tabla 9.3. Decoloración del azul ácido 74 por lacasas de diferentes hongos de pudrición blanca

Microorganismo	AA 74 (mg l ⁻¹)	%D / Tiempo	Mecanismo	T (°C)	Ref.
<i>Fomes</i> sp. EUM1	100	98% / 5 h	ECE (217 U l ⁻¹)	40	<i>En este trabajo</i>
<i>Coriolus versicolor</i> f. <i>antarcticus</i>	23	6.8% / 1 h	ECE (130 U l ⁻¹)	TA	Levin et al 2004
<i>Fomes sclerodermeus</i>	23	2.3% / 1 h	ECE (400 UI l ⁻¹)	TA	Levin et al 2004
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	4.7	40.4% / 2 h	Lacasa purificada parcialmente (10 U l ⁻¹)	32	Sarnthima y Khammuang 2008
<i>P. cinnabarinus</i>	10	50% / 6 h	Lacasa pura (100 UI l ⁻¹)	24	Camarero et al 2005
<i>Fome lignosus</i>	9.2	0% / 1 h	Lacasa pura (600 U l ⁻¹)	24	Hu et al 2009
<i>Trametes versicolor</i>	16.8	70% / 3 h	Lacasa pura (150 UI l ⁻¹)	23	Champagne y Ramsey 2010
<i>Coprinopsis cinerea</i>	69.1	<2% / 3 h	Lacasa pura (50 U l ⁻¹)	TA	Pan et al 2014

AA 74: Azul ácido 74; %D: Porcentaje máximo de decoloración; T: Temperatura de incubación; TA: Incubación a temperatura ambiente; Ref.: Referencia.

Además de la aplicación de extractos crudos, la decoloración del azul ácido 74 también se ha estudiado empleando enzimas purificadas; en tal caso, nuevamente las lacasas de *Fomes* sp. EUM1 mostraron características interesantes, pues compitieron favorablemente con los resultados observados en trabajos previos (**Tabla 9.3**).

La amplia especificidad de sustrato de las lacasas, junto con el hecho de que éstas utilizan O_2 como aceptor final de electrones en lugar de peróxido de hidrógeno como lo hacen las peroxidasa, las convierte en enzimas muy atractivas para su utilización en sistemas biotecnológicos.

Los resultados obtenidos bajo las condiciones experimentales descritas, mostraron que la decoloración alcanzada en el presente trabajo es mayor que la conseguida en reportes previos. Debido a que la oxidación mediada por lacasas depende tanto de la diferencia del potencial redox entre la enzima y el sustrato, como de las condiciones ambientales (pH, temperatura, agitación, etc.) es probable que estos resultados se deban a que las condiciones de trabajo aplicadas favorecieron el potencial catalítico de las lacasas de *Fomes* sp. EUM1, será necesaria la caracterización del potencial redox de estas enzimas para determinar si se trata de lacasas de alto potencial de óxido/reducción.

De acuerdo con Madigan et al (2004), para formar reacciones completas de oxidación/reducción la sustancia reducida de un par redox cuyo potencial de reducción es más negativo, cede electrones a la sustancia oxidada de una pareja cuyo potencial sea más positivo. Sin embargo, los potenciales de reducción pueden alterarse debido a factores como el pH y la fuerza iónica (Reinhammar y Vänngård 1971; Bonomo et al 2001); es decir, el potencial redox de una enzima puede disminuir si las condiciones fisicoquímicas de reacción son desfavorables en este sentido (Hu et al 2009; Klonowska et al 2005; Kumar et al 2003; Klonowska et al 2005).

El potencial de reducción (E° , en condiciones estándar) del azul ácido 74 es de -0.125 V (Reipa et al 2014), mientras que se ha reportado que el potencial de reducción de las lacasas fúngicas se encuentra entre 0.5 y 0.8 V (Johannes y Majcherczyk 2000); por tanto, entre mayor sea el potencial de reducción de la lacasa, mayor será su tendencia a aceptar los electrones provenientes del colorante reducido.

Por otro lado, la acción conjunta de las lacasas y de ciertos compuestos de bajo peso molecular (denominados mediadores redox) puede ampliar o permitir la oxidación de compuestos que por sí mismos, no son sustrato directo de las lacasas (Johannes y

Majcherczyk 2000). Por lo anterior, los sistemas lacasa/mediador han sido ampliamente estudiados en años recientes (Hu et al 2009). (Tabla 9.4).

Tabla 9.4. Decoloración del azul ácido 74 por sistemas lacasa/mediador.

Microorganismo	AA 74 [mg l ⁻¹]	%D / Tiempo	Mecanismo	T (°C)	Ref.
<i>P. cinnabarinus</i>	10	50% / 6 h	Lacasa pura (100 UI l ⁻¹) + ABTS (25 µM)	24	Camarero et al 2005)
<i>P. cinnabarinus</i>	10	100% / 5 min	Lacasa pura (100 UI l ⁻¹) + Siringaldehído (25 µM)	24	Camarero et al 2005)
<i>Fome lignosus</i>	9.2	80 % / 1 h	Lacasa pura (600 U l ⁻¹)+ Fenol (200 µM)	24	Hu et al 2009
<i>Coprinopsis cinerea</i>	69.1	40% / 2 h	Lacasa pura (50 U l ⁻¹) + ABTS (20 µM)	TA	Pan et al 2014
<i>Coprinopsis cinerea</i>	69.1	75% / 1.3 h	Lacasa pura (50 U l ⁻¹) + ABTS (200 µM)	TA	Pan et al 2014

AA 74: Azul ácido 74; %D: Porcentaje máximo de decoloración; T: Temperatura de incubación; TA: Incubación a temperatura ambiente; Ref.: Referencia.

Al respecto, la elección del mediador apropiado juega un papel clave en la aplicabilidad y efectividad de los sistemas lacasa/mediador. A la fecha se han descrito más de 100 posibles mediadores, aunque los más comúnmente utilizados son el 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS) y el 1-hidroxibenzotriazol (HBT). Sin embargo, la desventaja más relevante de los mediadores realmente eficientes es su alto costo o su elevada toxicidad (Johannes y Majcherczyk 2000; Hu et al 2009; Khelifi et al 2010). No obstante, se ha demostrado que existen compuestos producidos por los hongos durante su crecimiento o liberados durante la degradación de sustratos lignocelulósicos que también pueden actuar como mediadores en la oxidación de compuestos recalcitrantes (Johannes y Majcherczyk 2000).

Entre los compuestos naturales que pueden actuar como mediadores se encuentran algunos derivados del fenol como el ácido 4-hidroxibenzóico y el 4-hidroxibenzil alcohol. Ambos compuestos pueden ser sintetizados por los hongos ligninolíticos durante su crecimiento y además, también se derivan de la degradación microbiana de la lignocelulosa.

Asimismo, ciertos aminoácidos y sus derivados también pueden actuar como mediadores, ejemplo de ellos son la metionina, cisteína, tirosina y el glutatión reducido, los cuales han probado su eficiencia al incrementar la oxidación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en sistemas lacasa/mediador (Johannes y Majcherczyk 2000).

Por lo anterior, vale la pena considerar que es probable que una parte de la decoloración observada con los extractos crudos de *Fomes* sp. EUM1 se deba igualmente a la acción de un sistema lacasa/mediador de origen natural.



Una vez que se estudió la acción de las lacasas de *Fomes* sp. EUM1, se procedió a también se evaluar la decoloración del efluente simulado utilizando una lacasa comercial (Biolite®) a una concentración de 18 U l⁻¹ de efluente. Bajo estas condiciones se registró una decoloración del 97.9 % en 1.3 h (150.7 ± 25.5 mg l⁻¹ h⁻¹).

Puesto que es común la presencia de mediadores de óxido/reducción en formulaciones comerciales (Soares et al 2001), es de esperarse que esta rápida decoloración se haya debido a la acción de alguno de estos compuestos.

9.2.1. Estabilidad de las lacasas y peroxidasas tipo DyP de *Fomes* sp. EUM1 ante la temperatura y fuerza iónica durante los ensayos de decoloración

Además de la diferencia entre el potencial de reducción de la enzima y su sustrato, la capacidad de un biocatalizador para degradar compuestos recalcitrantes también depende de las condiciones del tratamiento (Zille et al 2004). Debido a que la fuerza iónica (causada por la concentración de sales) es uno de los principales factores que afectan este desempeño y a que los efluentes textiles se caracterizan por la presencia de sales, principalmente NaCl o Na₂SO₄ (Zilly et al 2011), se procedió a evaluar la estabilidad de las lacasas y peroxidasas tipo DyP de *Fomes* sp. EUM1 (producidas en los Medios 2 y 4), durante la decoloración del azul ácido 74 en presencia de NaCl; los resultados se muestran en la **Tabla 9.5**.

Tabla 9.5. Estabilidad de las lacasas y peroxidasas tipo DyP de *Fomes* sp. EUM1 ante la temperatura (40°C) y fuerza iónica (NaCl, 0.05 M) durante los ensayos de decoloración.

	Extractos Crudos Enzimáticos		
	Medio 2	Medio 4 (con H ₂ O ₂)	Medio 4 (sin H ₂ O ₂)
Actividad lacasa (UI l ⁻¹)			
Inicial	217.0 ± 43.2 a	159.0 ± 9.6 a	159.0 ± 9.6 a
Final	190.1 ± 4.1 a	180.7 ± 14.5 a	178.4 ± 0.01 a
Actividad peroxidasa tipo DyP (UI l ⁻¹)			
Inicial	0.86 ± 0.10 b	3.67 ± 0.54 b	3.67 ± 0.54 b
Final	1.0 ± 0.3 b	3.70 ± 1.2 b	3.08 ± 0.3 b

La actividad enzimática final se determinó luego de 8 h de incubación a 40 °C en presencia de NaCl 0.05 M. Los valores seguidos por la misma letra dentro de la misma columna no difieren significativamente.

Como puede observarse, tanto las lacasas como las peroxidasas de tipo DyP conservaron su actividad luego de 8 h de incubación en presencia de NaCl (0.05 M), sin diferencia con respecto al valor inicial para estas enzimas.

La influencia de la fuerza iónica sobre la actividad enzimática depende principalmente del tiempo de exposición y la naturaleza y concentración de la sal aplicada (ej. cloruros o sulfatos) (Bonomo et al 2001; Zilly et al 2011). Por ejemplo, se sabe que incluso a bajas concentraciones el NaCl ocasiona una inhibición mixta que afecta negativamente los parámetros cinéticos K_m y V_{max} , es decir, es capaz de modificar tanto la afinidad de la enzima por su sustrato como la etapa catalítica en sí (Zilly et al 2011).

El aumento en la concentración de especies cargadas puede ocasionar diversas alteraciones en el sitio de reconocimiento enzima-sustrato, entre los más importantes se encuentran:

- Modificación de cargas en la superficie de la proteína con la consiguiente afectación de la afinidad enzima-sustrato, en especial cuando se trata de un sustrato cargado.
- Modificaciones ligeras en el pK_a de los aminoácidos involucrados en la interacción con el sustrato.
- Cambios conformacionales locales que pueden modificar la exposición de los aminoácidos involucrados en la interacción con el sustrato y por tanto, modificaciones en la habilidad de éstos para interactuar con el mismo.

Además, la fuerza iónica pueda influir sobre el potencial redox de los sitios de Cu Tipo I de las lacasas fúngicas (Bonomo et al 2001).

La inhibición de la actividad enzimática por presencia de NaCl se ha reportado en lacasas de varios hongos, entre ellos *Ganoderma lucidum*, *Trametes* sp., *Pleurotus ostreatus* y *Rigidoporus lignosus*. Al respecto, Zilly et al (2011) evaluaron el efecto de diferentes concentraciones de NaCl (0–0.5 M) sobre la actividad lacasa de *Ganoderma lucidum* y encontraron una inhibición del 20 % al exponer a la enzima a 0.05 M de NaCl. Además, observaron una inhibición del 45 % en la decoloración del RBBR al realizar el ensayo en presencia de este compuesto (0.05 M). De forma similar, Maalej-Kammoun et al (2009) observaron que la presencia de una concentración 0.01 M de NaCl inhibía casi en un 50 % la decoloración del verde de malaquita mediada por lacasas crudas de *Trametes* sp. Por su parte, Bonomo et al (2001) observaron que la lacasa PoxD de *Rigidoporus lignosus* perdía totalmente su capacidad para reconocer al 2,6-dimetoxifenol (DMP) como sustrato (y por tanto su capacidad para oxidarlo) cuando se le exponía a una concentración de NaCl (0.1 M).

Por otro lado, la inactivación enzimática por calor es otro factor relevante en la búsqueda de catalizadores biológicos con aplicación biotecnológica. Aunque la exposición a elevadas temperaturas no afecta la disposición geométrica del núcleo de Cu de las lacasas, sí

ocasiona la transición de la estructura proteica hacia una conformación desordenada que inevitablemente conlleva a la pérdida de su capacidad catalítica (Meldgaardl y Svendsen 1994; Bonomo et al 2001).

Como puede observarse en las **Tablas 9.3 y 9.4**, la mayoría de los estudios sobre la degradación enzimática de colorantes sintéticos se han realizado a temperatura ambiente, sin embargo, se sabe que los efluentes textiles se descargan frecuentemente a temperaturas elevadas (típicamente a 40 °C, debido a las aguas de enjuague y a las temperaturas de hasta 90 °C que se utilizan en varias etapas del proceso de teñido) (Koparal et al 2007). Por lo tanto, en este trabajo se estudió la estabilidad de las lacasas y peroxidasas tipo DyP de *Fomes* sp. EUM1 durante la decoloración del efluente simulado a una temperatura de 40 °C (**Tabla 9.5**).

Como puede notarse, tanto las lacasas como las peroxidasas tipo DyP fueron capaces de mantener el 100 % de su actividad enzimática después de una exposición de 8 h a 40 °C y en presencia de NaCl (0.05 M), lo que muestra su elevada estabilidad bajo estas condiciones. Además, esta es la primera vez que se reporta la estabilidad de las peroxidasas tipo DyP en presencia de una temperatura de 40 °C y NaCl.

9.2.2. Identificación de los productos de la oxidación enzimática del Azul ácido 74

Una vez que se obtuvo la máxima decoloración del efluente simulado, con el ECE de *Fomes* sp. EUM1 (Medio 2) o con la lacasa comercial, los efluentes decolorados se analizaron por RMN ^1H , los resultados se muestran en la **Tablas 9.6**.

Tabla 9.6 Análisis por espectroscopía de RMN ^1H del efluente simulado decolorado por vía enzimática.

Protón	Azul ácido 74		Ácido Isatin-5-sulfónico		Efluente decolorado vía enzimática			
	δ (ppm)	J (Hz)	δ (ppm)	J (Hz)	ECE (Medio 2)		Producto comercial Biolite®	
	δ (ppm)	J (Hz)	δ (ppm)	J (Hz)	δ (ppm)	J (Hz)	δ (ppm)	J (Hz)
1	10.70 s	-	11.10 s	-	11.20 s	-	-	-
7	7.288 <i>d</i>	8.4	6.864 <i>d</i>	8.2	6.867 <i>d</i>	8.2	6.994 <i>d</i>	8.0
6	7.791 <i>dd</i>	8.4	7.808 <i>dd</i>	8.4; 2.0	7.807 <i>dd</i>	8.4; 1.6	8.034 <i>dd</i>	8.4; 1.6
4	7.844 s	-	7.595 <i>d</i>	2.0	7.593 <i>d</i>	1.6	7.944 <i>d</i>	1.2

J: Constante de acoplamiento, δ : Desplazamiento químico, s: singulete, *d*: doblete, *dd*: doble doblete, ECE: Extracto crudo enzimático obtenido a partir del cultivo de *Fomes* sp. EUM1 en el Medio 2

El espectro de RMN del efluente decolorado vía enzimática (con el ECE obtenido del cultivo del hongo en el Medio 2) presentó tres señales en campo bajo (7.59, 7.80 y 6.86 ppm) y una en campo alto (11.20 ppm). Se observó un patrón complejo de desdoblamiento spin-spin correspondiente con la presencia de enlaces carbono-carbono en un anillo aromático. El desdoblamiento de la señal a 7.59 ppm en un doblete se debió al acoplamiento spin-spin entre el protón 6 y el protón 4 ($J = 1.5$ Hz) (**Fig 9.2**). La multiplicidad de la señal a 7.80 ppm (doble doblete) se debió al acoplamiento entre los protones 6 y 7 ubicados en posición *orto* ($J = 8.4$ Hz) y entre los protones 6 y 4 en posición *meta* ($J = 1.5$ Hz). El desdoblamiento en un doblete a 6.86 ppm fue consistente con el protón 7 debido a un acoplamiento spin-spin entre este protón y el protón 6 en posición *orto* ($J = 8.5$ Hz). Además de estas señales, también se observó un singulete a 11.20 ppm, el cual indicó la presencia de un grupo imino (-NH).

De forma similar, el espectro de RMN del efluente decolorado con el producto comercial Biolite® mostró tres señales a campo bajo (6.994, 8.034, 7.944 ppm), las cuales presentaron constantes de acoplamiento coincidentes con las antes descritas (**Tabla 9.6**).

De acuerdo con estos resultados, ambos espectros correspondieron con la estructura del ácido isatin-5-sulfónico, sugiriendo la formación de este compuesto como principal producto de la oxidación enzimática del azul ácido 74.

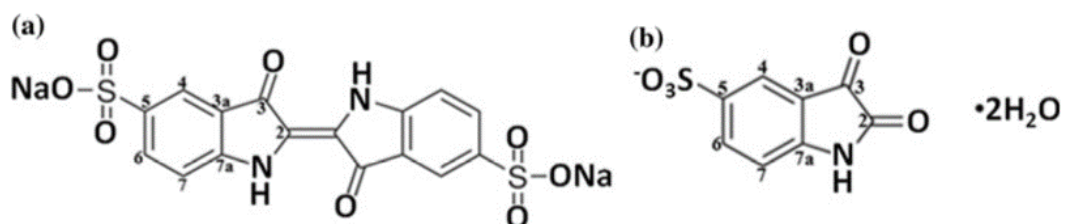


Fig. 9.2 Estructura química del Azul ácido 74 (a) y del Ácido isatin-5-sulfónico (b).



Las enzimas ligninolíticas han probado ser una alternativa idónea para el tratamiento de efluentes textiles e incluso para aguas contaminadas con otros tipos de contaminantes (Pant and Adholeya 2009; Bollag et al. 2003). Sin embargo, a pesar de la alta eficiencia del ECE de *Fomes* sp. EUM1 para decolorar el efluente simulado, las enzimas aplicadas no consiguieron la completa mineralización del colorante, puesto que se identificó el ácido isatín-5-sulfónico como producto de oxidación.

Debido a la similitud estructural entre el azul ácido 74 y el azul índigo, es probable que la generación del ácido isatín-5-sulfónico sea análoga a la generación de isatina observada como parte de la oxidación enzimática del azul índigo (Fig. 9.3).

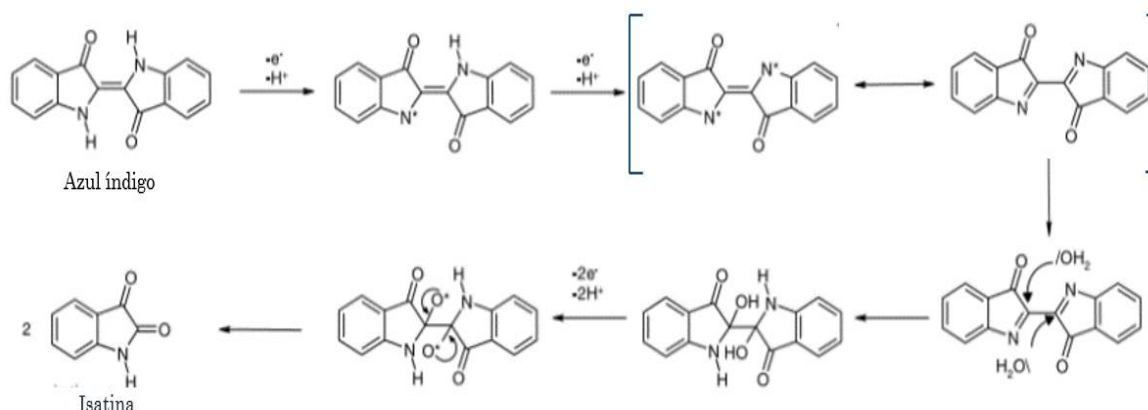


Fig. 9.3 Posible mecanismo de degradación del azul índigo por una lacasa de *Trametes hirsuta* (Campos et al 2001).

Tanto la reducción de una molécula de O_2 a agua como la oxidación de una molécula de azul índigo a isatina requiere de cuatro electrones. Por lo tanto, la detección de isatina en presencia de azul índigo como único donador de electrones y de lacasa como catalizador, sugiere que la enzima es responsable de la oxidación del azul índigo hasta isatina (Campos et al 2011). De forma similar se explicaría la oxidación del azul ácido 74 hasta ácido isatín-5-sulfónico.

Aunque la información toxicológica del ácido isatín-5-sulfónico es escasa, sobre todo aquella relacionada con su toxicidad aguda (Sigma-Adrich, 2011), se sabe que la isatina es un compuesto que exhibe una variedad de efectos biológicos de importancia médica, entre ellos actividad antimicrobiana, antiinflamatoria y efectos antitumorales (Rabelo et al 2014).

No obstante, la presencia de compuestos orgánicos residuales en los efluentes tratados representa otro tipo de riesgos.

De acuerdo con reportes previos, los productos obtenidos de la oxidación enzimática de diferentes compuestos, entre ellos los colorantes sintéticos, pueden sufrir reacciones subsecuentes que incluyen el acoplamiento entre ellos mismos o con moléculas aún sin reaccionar, lo que genera sub-productos acoplados que ocasionan un nuevo oscurecimiento de la solución y/o representan nuevos riesgos para el medio ambiente (Johannes y Majcherczyk 2000; Zille et al 2005).

Por otra parte, en las últimas décadas se ha incrementado la aplicación del ozono como tratamiento terciario de efluentes. A diferencia del cloro, el ozono es capaz de remover color, sabor, olor e incrementar la biodegradabilidad de algunos compuestos orgánicos si se aplica a concentraciones elevadas (ej. 45 mg O₃ mg⁻¹ de contaminante). Sin embargo, en la práctica, la dosis de ozono que se emplea es menor a 1 mg mg⁻¹ de carbono orgánico total, lo que conduce a la formación de sub-productos variados. Ejemplo de ello es la formación de iminas poliaromáticas, azobenzenos, benzidinas etc., como producto de la reacción del ozono con compuestos como la anilina (Chan y Larson 1991).

La formación de compuestos acoplados, así como la formación de sub-productos tóxicos después de la aplicación de tratamientos terciarios, representa otro riesgo para la salud humana y el medio ambiente. Por lo tanto, es importante conseguir la eliminación de cualquier intermediario producido durante la oxidación enzimática de los colorantes sintéticos o de cualquier otro contaminante.

9.3. Tratamiento anaerobio del efluente textil decolorado por vía enzimática

De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos de decoloración enzimática, las oxidasas de *Fomes* sp. EUM1 y la lacasa comercial Biolite® fueron capaces de catalizar la oxidación del colorante hasta la formación de ácido isatín-5-sulfónico. Con la finalidad de eliminar este compuesto y completar la degradación, el efluente decolorado fue sometido a un tratamiento subsecuente mediante un sistema anaerobio.

9.3.1. Biodegradación anaerobia en continuo del efluente decolorado vía enzimática con la lacasa comercial (Biolite®)

Se estudió la degradación del efluente decolorado con Biolite® en un reactor anaerobio tipo UASB inoculado con un lodo granular metanogénico proveniente de un reactor UASB industrial (operando en una industria de alimentos).

Los sólidos totales (ST) y volátiles (SV) en el reactor al inicio de la serie de experimentos fueron: 21.3 g de ST y 19.3 g de SV por litro de reactor. La velocidad de sedimentación del lodo fue de 13 m h⁻¹.

El reactor operó en continuo durante 412 días y la evolución del mismo se dividió en las siguientes etapas.

ETAPA I: Puesta en marcha

Durante el arranque se trabajó con una carga orgánica específica de 0.042 kg DQO kg⁻¹ SV d⁻¹ y una carga orgánica volumétrica de 0.8 kg DQO m⁻³ d⁻¹.

Como puede observarse en la **Fig. 9.4**, durante los primeros días de operación se observó una marcada disminución en la eficiencia del sistema. El porcentaje de reducción de la DQO fue del 28 % con una tasa de eliminación de 0.22 kg m⁻³ d⁻¹. El pH en el efluente del reactor fue de 7.51 ± 0.24.

En cuanto a la obtención de metano, en esta etapa se registró una producción promedio de 32.4 l CH₄ m⁻³ d⁻¹ con un rendimiento de 147.1 l CH₄ kg⁻¹ DQO removido (**Fig. 9.5**).

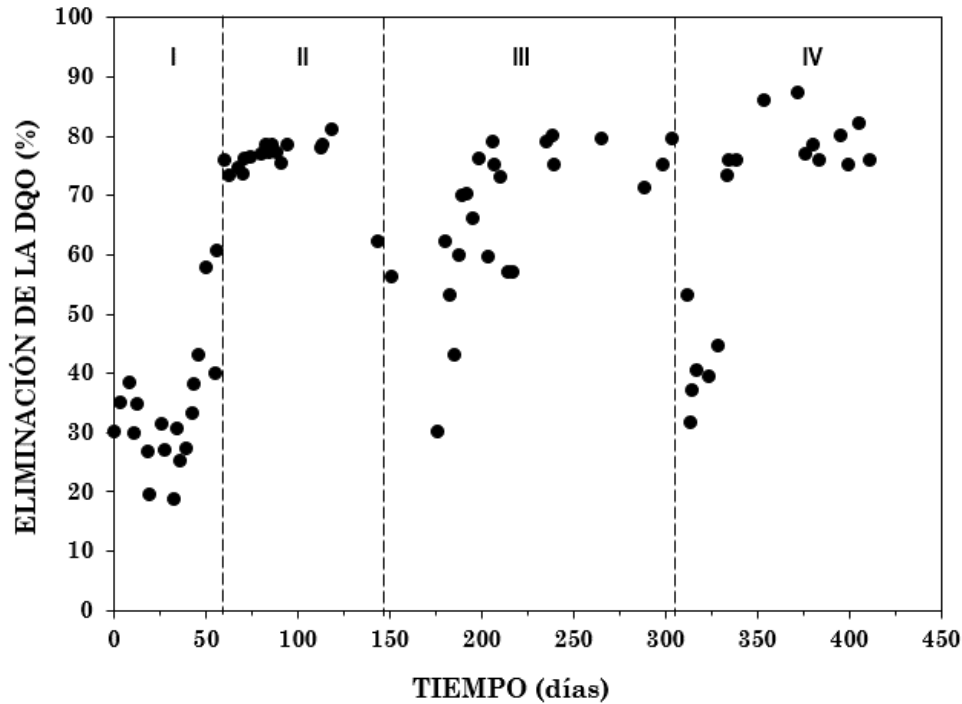


Fig. 9.4 Porcentaje de reducción de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) en el reactor UASB alimentado con el efluente decolorado vía enzimática (Biolite®).

Como es bien sabido, el primer paso en la degradación biológica de compuestos recalcitrantes es el establecimiento de una etapa de *aclimatación*; en esta etapa los microorganismos ajustan su fisiología en respuesta a la alteración de las condiciones ambientales. Los cambios que resultan de la aclimatación ocurren dentro del periodo de vida del organismo y no son heredables, aunque se ha propuesto que la capacidad de hacer estos cambios bien podría transmitirse vía genética (Buddemeier et al 1997).

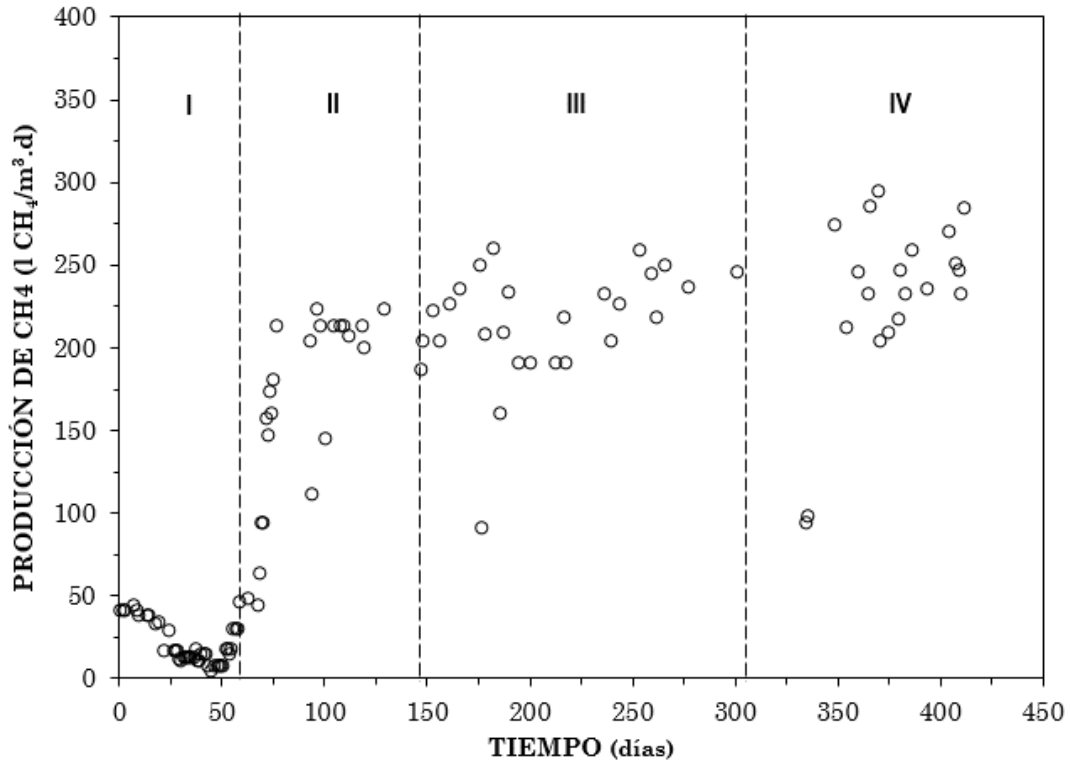


Fig. 9.5 Producción de metano durante el tratamiento anaerobio del efluente decolorado.

Se han descrito diversos fenómenos que ocurren durante la fase de aclimatación, entre los más relevantes se encuentran la *selección* y *multiplicación* de microorganismos especializados y el establecimiento de alteraciones metabólicas que favorezcan la supervivencia de los microorganismos. Estas alteraciones se encuentran relacionadas frecuentemente con la regulación en la síntesis de ciertas enzimas o incluso con la aparición de mutaciones (Moreno-Andrade y Buitrón, 2004).

Por otro lado, la duración de la fase de aclimatación no solo depende de los factores que afectan directamente el crecimiento microbiano sino también de aquellos que lo afectan de forma indirecta (*ej.*, factores que afectan la agregación bacteriana). La etapa de aclimatación puede durar entre 6 semanas y 12 meses dependiendo del sustrato a degradar y de la capacidad del inóculo para responder a las modificaciones ambientales (Yan et al 1997; Veeresh et al 2005).

En este trabajo, la Etapa I correspondió a la fase de aclimatación del inóculo, pues aunque durante los primeros días se observó una baja eficiencia, a partir de los 40 días el

funcionamiento mejoró significativamente hasta alcanzar un 77 % de remoción de la DQO. La aclimatación del inóculo tomó aproximadamente 2 meses.

ETAPA II

En esta etapa el reactor continuó siendo alimentado bajo las mismas condiciones que en la etapa anterior y se mantuvo así hasta que se consiguió el *estado estacionario*⁴. Bajo estas condiciones, la reducción en la DQO se mantuvo en 76.8 ± 2 % con una tasa de eliminación de la DQO de $0.66 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ y una producción de metano de $158.4 \text{ l CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. El rendimiento en la producción de metano fue de $257.3 \text{ l CH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ DQO removido}$.

ETAPA III

Una vez alcanzado el estado estacionario se procedió a aumentar la carga orgánica volumétrica (COV) en un 25 %, ajustando la tasa de alimentación a $1 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$.

Como puede apreciarse en la **Fig. 9.3**, el aumento en la carga orgánica ocasionó una desestabilización inmediata con una disminución en la eliminación de la DQO de 77 a 30 %. No obstante, a partir del día 178 el sistema comenzó a mostrar recuperación, y al día 199 la eficiencia ya se encontraba en un 77 %. A partir de este momento el funcionamiento se mantuvo estable con una eficiencia del 77.0 ± 3.4 % y una tasa de degradación de la DQO de $0.77 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$.

La modificación en la COV también alteró la producción de biogás. Sin embargo, a partir del día 178 también se observó una recuperación, alcanzando de nuevo el estado estacionario hacia el día 200. En este momento la producción de metano fue de $233.4 \text{ l CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ con un rendimiento de $303.3 \text{ l CH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ DQO removido}$.

ETAPA IV

A los 304 días de operación se realizó una nueva modificación en la tasa de carga; la alimentación se ajustó a $1.5 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$.

⁴ El sistema se consideró en *estado estacionario* cuando la variación en la eficiencia de eliminación de la DQO fue menor al 10 %.

De forma similar a lo observado a la etapa anterior, también se registró un periodo de desestabilización. Sin embargo, en este caso la recuperación del estado estacionario tomó solo 30 días, en comparación con los más de 2 meses que tomó en la Etapa III.

Una vez alcanzado el estado estacionario, la eficiencia de eliminación de la DQO fue de $78.3 \pm 5 \%$, con una tasa de degradación de $1.2 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$.



Desde hace varios años, los procesos anaerobios se convirtieron en la alternativa de elección para el tratamiento de efluentes de alta carga. La ventaja principal de los procesos anaerobios con respecto a los aerobios se fundamenta en la transformación de la materia orgánica a través de una tecnología de bajo consumo energético, lo que trae como consecuencia los aspectos prácticos siguientes:

- En los procesos anaerobios se consume mucho menos energía externa, fundamentalmente eléctrica, que en los aerobios.
- En los procesos anaerobios solo se generan del 10 al 30 % de los lodos que se producen en los aerobios, lo que disminuye los costos de la disposición final de éstos.
- Por cada kg. de DQO eliminado por el metabolismo bacteriano, la vía aerobia (lodos activados) requerirá 1 kwh de energía eléctrica para el equipo de aireación. Por el contrario, la vía anaerobia producirá el equivalente a 3 kwh, como energía química acumulada en forma de metano.

(O'neill et al 2000; Montalvo y Guerrero, 2008)

Existen varios tipos de reactores anaerobios que ya se aplican a escala industrial: entre ellos, el filtro anaerobio con carbón activado, el reactor de circulación interna, el reactor de lecho fluidizado, el reactor de lecho granular expandido, entre otros. Sin embargo, desde su introducción en 1980, los reactores UASB han atraído considerable atención en todo el mundo. Hasta 1996, se reportaba que de 900 reactores anaerobios industriales, el 67 % correspondía a reactores UASB. Más recientemente, se reportó que de 1330 instalaciones

de tratamiento, al menos 80 plantas se dedican al tratamiento de efluentes de la industria química y petroquímica y entre éstas, el 30 % corresponden a reactores UASB (Vaareh et al 2005).

El éxito de la tecnología UASB reside en su habilidad para *retener* altas concentraciones de biomasa al interior del reactor; esto implica que el tiempo de residencia de lodos es casi independiente del tiempo de residencia hidráulico y que por tanto, el sistema puede operar a tiempos de residencia hidráulica cortos.

La retención de la biomasa dentro del reactor se relaciona con la capacidad de los microorganismos para agregarse y formar flóculos o gránulos cuyas propiedades de sedimentación disminuyen drásticamente su riesgo a sufrir *lavado del reactor*. Por otro lado, la turbulencia natural causada por el flujo ascendente del influente y por la producción de biogás ayuda a mantener un contacto apropiado entre la biomasa y los contaminantes, además de que favorece la continuidad del proceso de granulación (Schmidt y Ahring 1995; Vaareh et al 2005).

Con respecto a los efluentes textiles, tanto los tratamientos aerobios (lodos activados) como los anaerobios se han estudiado para su aplicación en la degradación de colorantes. En el caso de los procesos aerobios, se ha visto que durante el tratamiento, del 10 al 30 % de los colorantes queda adsorbido en la biomasa, mientras que el resto se descarga inalterado (O'Neill et al 2000).

Por otro lado, aunque algunos estudios han mostrado que la degradación anaerobia es más rápida que la aerobia (lodos activados), ésta sigue siendo más lenta que la decoloración enzimática (Fischer-Colbrie et al 2005). Ejemplo de ello, es la degradación del azul ácido 74; mientras que la *decoloración vía anaerobia* de 150 mg l⁻¹ del compuesto toma 18 días (Fischer-Colbrie et al 2005), en este trabajo la *decoloración enzimática* de 100 mg l⁻¹ tomó sólo 5 h (con el ECE de *Fomes* sp. EUM1).

A pesar de ello, se ha demostrado que los consorcios anaerobios son capaces de degradar por completo compuestos como el ácido antranílico y el ácido isatín-5-sulfónico (Razo-Flores et al 1999; Fischer-Colbrie et al 2005), este último identificado aquí como el principal producto de la degradación enzimática del azul ácido 74. Por lo tanto, la capacidad de los

sistemas anaerobios para degradar estos compuestos, aunada a su elevada eficiencia para remover altas cargas orgánicas (Montalvo y Guerrero, 2008), los convierte en una alternativa prometedora para complementar la degradación enzimática de colorantes sintéticos en efluentes textiles.

De acuerdo, con los resultados obtenidos en este trabajo, el tratamiento del efluente decolorado en el reactor UASB puede realizarse con una eficiencia cercana al 80 %; sin embargo, uno de los inconvenientes observados durante la operación del reactor fueron los largos periodos de recuperación (>2 meses) observados tras las modificaciones en la tasa de carga. Aunque los reactores UASB han sido definidos como una tecnología robusta en cuanto a su capacidad para resistir a choques de carga (*loading shocks*) (Vaareh et al 2005), es claro que esta capacidad depende de la naturaleza de los sustratos en la alimentación (Tay et al 2001).

Como estrategia para amortiguar los efectos tóxicos de ciertos efluentes (durante el proceso de degradación anaerobia), se ha propuesto la adición de *co-sustratos*, compuestos fácilmente asimilables cuyas funciones principales son:

- Favorecer el crecimiento microbiano y por consiguiente, la tasa de reacción, y
- disminuir el efecto tóxico de compuestos inhibitorios (Tay et al 2001).

Por lo tanto, una estrategia para reducir los tiempos de recuperación observados durante el tratamiento anaerobio del efluente decolorado podría ser la mezcla del mismo con un residuo o efluente de mayor biodegradabilidad.

9.3.2. Análisis de las comunidades microbianas involucradas en la biodegradación del efluente decolorado

Con la finalidad de comparar la estructura del consorcio microbiano inoculado durante el arranque del reactor con aquel obtenido al final de la operación del mismo (412 días), se realizó un análisis de los perfiles poblacionales en cada muestra con base en la resolución de los fragmentos V2-V3 y V6-V8 del gen 16S del rDNA de arqueas y bacterias, respectivamente, en geles de DGGE.

En la **Fig. 9.6** se muestra el perfil de bandas obtenido durante el análisis por DGGE de las poblaciones de bacterias.

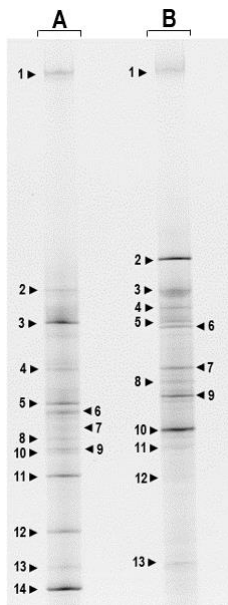


Fig 9.6. Perfiles de bandas de DGGE correspondientes a la amplificación de la región V6-V8 del gen 16S rDNA de bacterias. A) Perfil de bandas en el *lodo inoculado* durante el arranque del reactor UASB. B) Perfil de bandas en el *lodo aclimatado* obtenido al final de la operación del reactor UASB (412 días).

Los patrones de bandas en los geles de DGGE reflejaron las poblaciones dominantes en cada muestra. Al comparar los perfiles entre el *lodo inoculado* y el *lodo aclimatado*, se hizo evidente la desaparición de varias bandas y la aparición de bandas nuevas tanto en el análisis poblacional de bacterias como en el de arqueas (**Fig. 9.7**). Este fenómeno sugiere que el efluente decolorado ejerció una presión de selección sobre las poblaciones del *lodo inoculado*, alterando su dinámica poblacional.

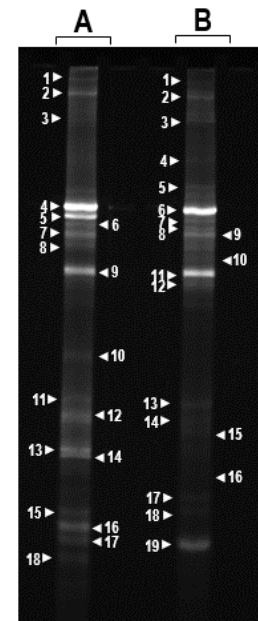


Fig 9.7. Perfiles de bandas de DGGE correspondientes a la amplificación de la región V2-V3 del gen 16S rDNA de arqueas. A) Perfil de bandas en el lodo inoculado durante el arranque del reactor UASB. B) Perfil de bandas en el lodo aclimatado obtenido al final de la operación del reactor UASB (412 días).

Debido a que la técnica de DGGE permite la separación de fragmentos de ADN (*del mismo tamaño*) cuyas secuencias de nucleótidos difieren hasta en *una sola base nitrogenada* (Muyzer y Smalla 1998), puede sugerirse que la modificación en los patrones de bandas indicó además, una modificación en las especies de bacterias y arqueas presentes en cada comunidad.

Se ha reportado que uno de los mecanismos mediante los cuales ocurre la aclimatación a nuevos compuestos es la modificación de las poblaciones involucradas, es decir, puede ocurrir un crecimiento acelerado de un cierto tipo de microorganismos cuya capacidad para sobrevivir en las nuevas condiciones ambientales sea mayor que el de otros (Vashon et al 1982).

La modificación de las estructuras poblacionales a causa de alteraciones en las condiciones ambientales, se ha observado mayormente durante la exposición de los microorganismos a compuestos muy recalcitrantes o tóxicos para la actividad microbiana. Rosenkranz et al (2013) observaron que el incremento en la concentración de fenol de 800 a 1200 mg l⁻¹ causa efectos drásticos en la estructura de las poblaciones microbianas expuestas, lo que sugiere la especialización de la comunidad a través de la selección y enriquecimiento de los

filotipos mejor adaptados. Además, estos autores también observaron que el umbral de concentración en el que se presenta el cambio poblacional es muy similar a aquel en el que se presentan las alteraciones funcionales, lo que sugiere una correlación entre los rendimientos de degradación y el cambio en la estructura del consorcio.

En el presente trabajo, la *aclimatación* de los microorganismos durante la Etapa I pudo ser causada precisamente por la modificación de las poblaciones microbianas (*ver sección 9.3.1*), lo que a su vez aumentó la eficiencia del consorcio para degradar el efluente durante las etapas subsiguientes de operación.

Por otro lado, gracias al avance en el estudio de los consorcios microbianos complejos, recientemente se ha propuesto una estrategia para mejorar la eficiencia de degradación de compuestos recalcitrantes. Esta estrategia, denominada *bio-enriquecimiento* consiste en la adición de microorganismos específicos a determinado sistema para aumentar o mejorar la actividad degradativa deseada o incluso para reducir los periodos de recuperación luego de la exposición de los microorganismos a eventos tóxicos transitorios (Schauer-Gimenez et al 2010; Cavaleiro et al 2010).

Como puede observarse, el primer paso en la aplicación de la estrategia de bio-enriquecimiento implica la *identificación* de los microorganismos responsables del proceso de interés, por lo tanto, para aplicar esta estrategia en la mejora de la degradación del efluente decolorado será necesario continuar con la identificación de los principales microorganismos involucrados en dicho proceso.

9.3.3. Biodegradación anaerobia en lote del efluente decolorado con el ECE de *Fomes* sp. EUM1

Los resultados anteriores mostraron la capacidad del sistema anaerobio para conseguir la degradación en continuo del efluente decolorado con el producto Biolite®. Ahora, para comprobar si este tratamiento era igualmente eficiente para degradar el efluente decolorado con el ECE de *Fomes* sp. EUM1, se estudió la degradación del mismo utilizando reactores en lote inoculados con el lodo obtenido al final de la operación del reactor UASB. Los resultados se muestran en la **Tabla 9.7**.

Tabla 9.7. Eficiencias de remoción y tasas específicas de producción de metano registradas durante el tratamiento anaerobio en lote del efluente decolorado con el ECE obtenido del cultivo de *Fomes* sp. EUM1 en el Medio 2.

	Efluente decolorado: DQO inicial (mg l ⁻¹)		
	300	650	1000
DQO _ε (%)	87.8 ± 3.4 a	85.5 ± 0.6 a	85.8 ± 1.2 a
q _{CH₄} (gDQO-CH ₄ g ⁻¹ SV d ⁻¹)	0.0260 ± 0.0066 a	0.0423 ± 0.0078 b	0.0701 ± 0.0030 c
% CH ₄ en el biogás	78.2 ± 9 a	75 ± 3 a	72.5 ± 5 a

q_{CH₄}: tasa específica de producción de metano, DQO_ε: eficiencia de remoción de la DQO inicial. Los valores seguidos por la misma letra dentro del mismo renglón no difieren significativamente.

La DQO del efluente decolorado con el ECE de *Fomes* sp. EUM1 fue de 3.5 g l⁻¹. Este efluente se diluyó con medio mineral (*metodología sección 8.5.4*) para conseguir soluciones con una DQO de 300, 650 y 1000 mg l⁻¹. Como puede observarse la modificación en la concentración inicial de DQO no afectó significativamente la eficiencia de remoción de la DQO inicial (DQO_ε), siendo en promedio de 86 ± 1.5 % a los 8 días. Además, el aumento en la DQO inicial tampoco ocasionó alteraciones en la producción y composición del biogás, pues no se observó diferencia significativa en la composición del biogás obtenido bajo las diferentes condiciones. El porcentaje de metano registrado fue de 78.2, 75 y 72.5 % al trabajar con una DQO inicial de 300, 650 y 1000 mg l⁻¹, respectivamente. Además, no se observó retardo en el tiempo de inicio de producción de metano y en todos los casos la máxima eficiencia de remoción de la DQO inicial se registró a los 8 días. Por otro lado, la tasa específica de producción de metano (q_{CH₄}) aumentó de 0.0260 a 0.0701 g DQO-CH₄ g⁻¹

SV d⁻¹ cuando la concentración inicial de DQO aumentó de 300 a 1000 mg l⁻¹; estos datos indican que no se presentó inhibición metabólica en la biomasa al aumentar la concentración de DQO inicial.

9.3.4. Biodegradación anaerobia en lote del ácido isatín-5-sulfónico

Finalmente, con el objetivo de determinar si el ácido isatín-5-sulfónico, (*identificado como producto de la oxidación del azul ácido 74*), podía ser degradado durante el tratamiento anaerobio, se realizaron pruebas específicas de degradación utilizando este compuesto como única fuente de carbono y energía. Los ensayos se realizaron en lote y las variables respuesta fueron: el efecto de diferentes concentraciones del ácido isatín-5-sulfónico sobre la eficiencia de remoción del mismo, la eficiencia de remoción de la DQO inicial y la tasa específica de producción de metano. Los resultados se presentan en la **Tabla 9.8**.

Tabla 9.8. Eficiencias de remoción y tasas específicas de producción de metano durante los ensayos de biodegradación anaerobia en lote del ácido isatín-5-sulfónico bajo condiciones metanogénicas

	Ácido isatín-5-sulfónico (mg l ⁻¹)		
	20	50	100
DQO _ε (%)	71.5 ± 10.6	<10	<10
AISe (%)	86.2 ± 3.5 a	57.7 ± 1.9 b	35.5 ± 11.3 c
q _{CH₄} (g DQO-CH ₄ g ⁻¹ SV d ⁻¹)	0.0019 ± 0.0004	ND	ND

DQO_ε: eficiencia de remoción de la DQO inicial, AISe: eficiencia de remoción del ácido isatín-5-sulfónico, q_{CH₄} tasa específica de producción de metano, ND: No se determinó. Los valores seguidos por la misma letra dentro del mismo renglón no difieren significativamente.

Como puede observarse, al trabajar con una concentración de ácido isatín-5-sulfónico de 20 mg l⁻¹, la eficiencia de remoción del compuesto fue superior al 85 % a los 10 días, mientras que la eficiencia de eliminación de la DQO fue del 71.5 ± 10.6 % con producción de metano como evidencia de mineralización. En este caso el porcentaje de metano en el biogás fue de 68 ± 11 %. Sin embargo, a concentraciones de 50 y 100 mg l⁻¹, las eficiencias de remoción fueron de 57.7 ± 1.9 y 35.5 ± 11.3 %, respectivamente, con una proporción de CO₂ en el biogás superior al 90 %. Lo que sugiere que el aumento en la concentración inicial del ácido isatín-5-sulfónico puede ocasionar una inhibición en el metabolismo microbiano.

Es importante mencionar, que a diferencia de los ensayos expuestos en la sección anterior, (sección 9.3.3) en este caso se alimentó el ácido isatín-5-sulfónico como única fuente de carbono y energía; por el contrario, al alimentar el efluente decolorado con el ECE de *Fomes* sp. EUM1 como sustrato, la DQO inicial corresponde no solo a los productos de degradación del azul ácido 74 (ej. ácido isatín-5-sulfónico) sino también a los componentes del ECE agregado durante el proceso de decoloración. En ese caso, el ECE pudiera haber actuado como *co-sustrato* de la biodegradación anaerobia y por tanto, menguar los efectos tóxicos del ácido isatín-5-sulfónico sobre la biomasa.

En cuanto a la ruta de degradación del ácido isatín-5-sulfónico en condiciones anaerobias, se ha propuesto que el paso inicial podría ser su conversión a benzoato (Kobayashi et al 1989). Posteriormente tanto los microorganismos anaerobios estrictos como los anaerobios facultativos podrían utilizar un metabolismo reductivo para romper el anillo aromático teniendo al benzoil-CoA como intermediario central (Fuchs 2008).

En el caso del azul ácido 74, se ha descrito que su degradación bajo condiciones anaerobias procede vía la formación de isatín-5-sulfonato (*al igual que con lacasas fúngicas*) y que posteriormente éste es transformado a 4-amino-3-bencensulfonato, el cual es transportado al interior celular para completar su mineralización (Fischer-Colbrie et al 2005).

9.4. Evaluación eco-toxicológica del efluente textil sometido al tratamiento secuencial enzimático-anaerobio

El potencial eco-toxicológico del efluente simulado, antes y después de su paso por el tratamiento secuencial (enzimas oxidativas – digestión anaerobia), se evaluó aplicando los siguientes bioensayos:

- Ensayo microbiológico de viabilidad con *Saccharomyces cerevisiae*
- Ensayo de fitotoxicidad con semillas de *Sorghum vulgare*
- Ensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna*

Las muestras analizadas fueron: el efluente simulado antes de cualquier tratamiento, el efluente simulado decolorado vía enzimática con la lacasa comercial y el efluente del reactor UASB. En todos los ensayos una concentración del 100 % del efluente simulado equivale a 100 mg l⁻¹ de azul ácido 74 y 2.9 g l⁻¹ de NaCl; en el efluente decolorado esta misma concentración (100 %) corresponde a 100 mg l⁻¹ de los productos de oxidación del colorante (asumiendo que todo el colorante haya sido degradado) y una concentración desconocida de otros compuestos agregados durante el tratamiento con el ECE de *Fomes* sp, EUM1 o con la lacasa comercial. En el caso del efluente del reactor UASB, una concentración del 100 % corresponde a una muestra del efluente del reactor sin ningún tratamiento posterior.

9.4.1. Ensayo Microbiológico de Viabilidad con *Saccharomyces cerevisiae*

El término *viabilidad* se utiliza para expresar la habilidad de las células para crecer, reproducirse e interactuar con su alrededor inmediato, y se entiende generalmente, como la relación entre el número de células vivas y muertas (Rumlova y Dolezalova, 2012). El ensayo de viabilidad con células de *S. cerevisiae* se basa en la habilidad del azul de metileno para atravesar la membrana celular de las células muertas (o muy debilitadas) y teñir el contenido intracelular. Por el contrario, la membrana celular de las células vivas es impermeable al azul de metileno y por lo tanto, el material intracelular permanece incoloro (Rumlova y Dolezalova, 2012).

Con la finalidad de evaluar la toxicidad del efluente simulado a su paso por el tratamiento secuencial, se evaluó el efecto de éste, del efluente decolorado y del efluente del reactor UASB sobre la viabilidad de las células de *S. cerevisiae*. Como control se utilizaron células

de la levadura en contacto con agua destilada. Para la realización del análisis estadístico, los datos de viabilidad obtenidos para cada muestra se compararon mediante un análisis de varianza (ANOVA) y una vez rechazada la hipótesis nula se procedió a realizar una comparación múltiple de medias mediante la prueba de Dunnett⁵. Los resultados se muestran en la Fig. 9.7.

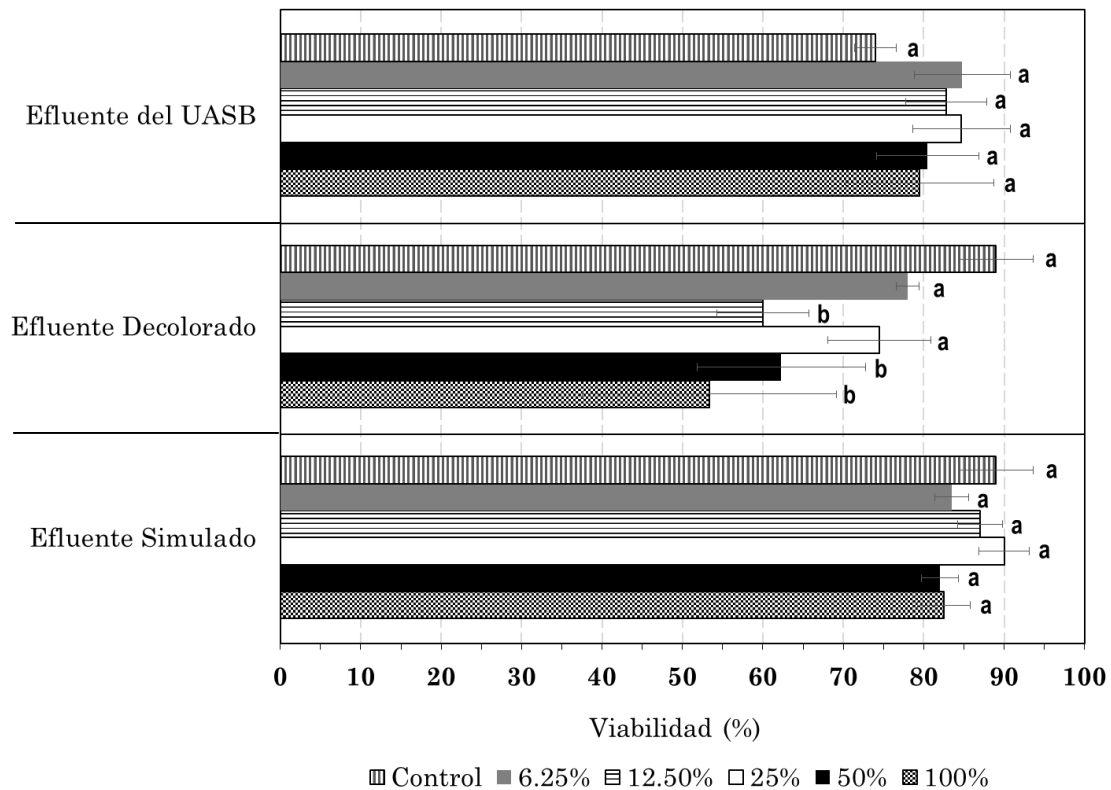


Fig. 9.7 Viabilidad de las células de *Saccharomyces cerevisiae* durante el ensayo microbiológico de viabilidad. Las barras seguidas por la misma letra dentro del mismo conjunto (Conjuntos: efluente simulado, efluente decolorado o efluente del UASB) corresponden a porcentajes de viabilidad que no difieren significativamente con respecto al control correspondiente.

Como puede observarse, las células expuestas al efluente simulado presentaron porcentajes de viabilidad superiores al 80 % en todas las concentraciones evaluadas (6.25, 12.5, 25, 50 y 100 %). En ningún caso se encontraron diferencias significativas con respecto al control, lo que indicó la ausencia de toxicidad en esta muestra.

⁵ La prueba de Dunnett se utiliza cuando se desea comparar cada una de las *medias* de los tratamientos contra la *media* del *control*.

Por el contrario, las células expuestas al efluente decolorado presentaron los menores porcentajes de viabilidad. Al comparar estos valores con la viabilidad registrada en los controles respectivos, se encontró que la viabilidad de las células en contacto con el efluente decolorado diluido al 50 % o sin diluir (100 %) fue significativamente menor que la observada en los controles; la inhibición de la viabilidad al contacto con el efluente decolorado sin diluir fue del 40 %. Por lo tanto, la decoloración del efluente simulado usando el producto comercial Biolite® aumentó la toxicidad del efluente.

Finalmente, también se evaluó la toxicidad del efluente del reactor UASB; como puede observarse, en este caso no se observaron diferencias significativas entre la viabilidad de las levaduras expuestas al efluente del reactor y la viabilidad de las células control, por lo que esta muestra se consideró no tóxica para el organismo de prueba.

Con la finalidad de determinar si existían diferencias entre los valores de viabilidad obtenidos al exponer al microorganismo a la máxima concentración (100%) de cada muestra, se realizó un análisis de estos datos mediante una comparación múltiple de medias por el método de Duncan. Los resultados se muestran en la **Tabla 9.9**.

Tabla 9.9 Viabilidad de las células de *Saccharomyces cerevisiae* expuestas a los diferentes efluentes *sin diluir* (100 %) durante el ensayo microbiológico de viabilidad.

Muestra	Viabilidad (%)
Control	81.5 ± 8.9 a
Efluente simulado	82.5 ± 3.3 a
Efluente decolorado	53.4 ± 15.7 b
Efluente del reactor UASB	79.5 ± 9.2 a

Se muestran los porcentajes de viabilidad de las células de *Saccharomyces cerevisiae* expuestas a la máxima concentración de cada muestra. Los valores seguidos por la misma letra dentro de la misma columna no difieren significativamente.

Como puede observarse, no se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de viabilidad de las células expuestas al efluente simulado o al efluente del reactor UASB, siendo de 82.5 ± 3.3 y 79.5 ± 9.2 %, respectivamente. Por el contrario, la viabilidad de las células en contacto con el efluente decolorado fue de 53.4 ± 15.7 %, lo que indicó una inhibición del 35 %.

De acuerdo con estos resultados el tratamiento anaerobio fue efectivo para eliminar la toxicidad del efluente originada durante el proceso de decoloración enzimática.

A continuación se muestran algunas fotografías de las células de *Saccharomyces cerevisiae* expuestas a los diferentes efluentes durante el ensayo de viabilidad (**Fig. 9.8**).

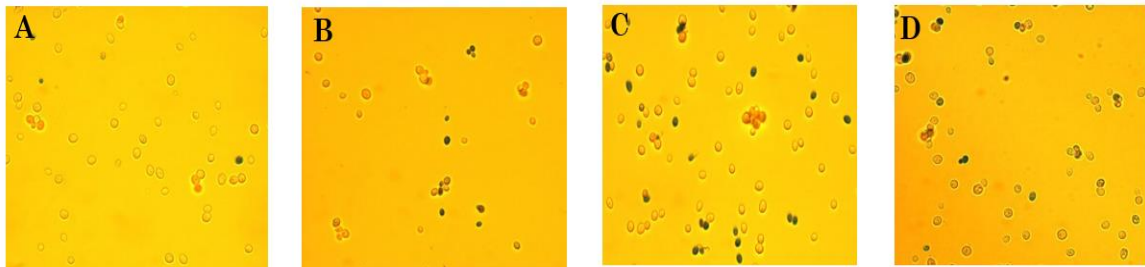


Fig. 9.8 Fotografías de las células de *Saccharomyces cerevisiae* expuestas durante 1 h a la máxima concentración de cada muestra (100 %). A) Control (agua destilada) B) Efluente simulado antes de cualquier tratamiento, C) Efluente decolorado vía enzimática, F) Efluente del reactor UASB.

9.4.2. Ensayo de fitotoxicidad con semillas de *Sorghum vulgare*

Considerando que con frecuencia los efluentes contaminados se vierten a los cuerpos de agua mismos que en ocasiones se utilizan como agua de riego (Osma et al 2010; Gomare et al 2009), se realizó un ensayo de fitotoxicidad empleando como modelo de estudio semillas de sorgo (*Sorghum vulgare*). Como variables de respuesta se determinaron los porcentajes de germinación de las semillas y la elongación de la radícula y la plúmula en las plántulas expuestas a los diferentes efluentes. Para la realización del análisis estadístico, los datos obtenidos se compararon mediante un análisis de varianza (ANOVA) y una vez rechazada la hipótesis nula se procedió a realizar una comparación múltiple de medias mediante la prueba de Dunnett.

En la **Fig. 9.9** se presentan los resultados correspondientes al análisis de la germinación de las semillas.

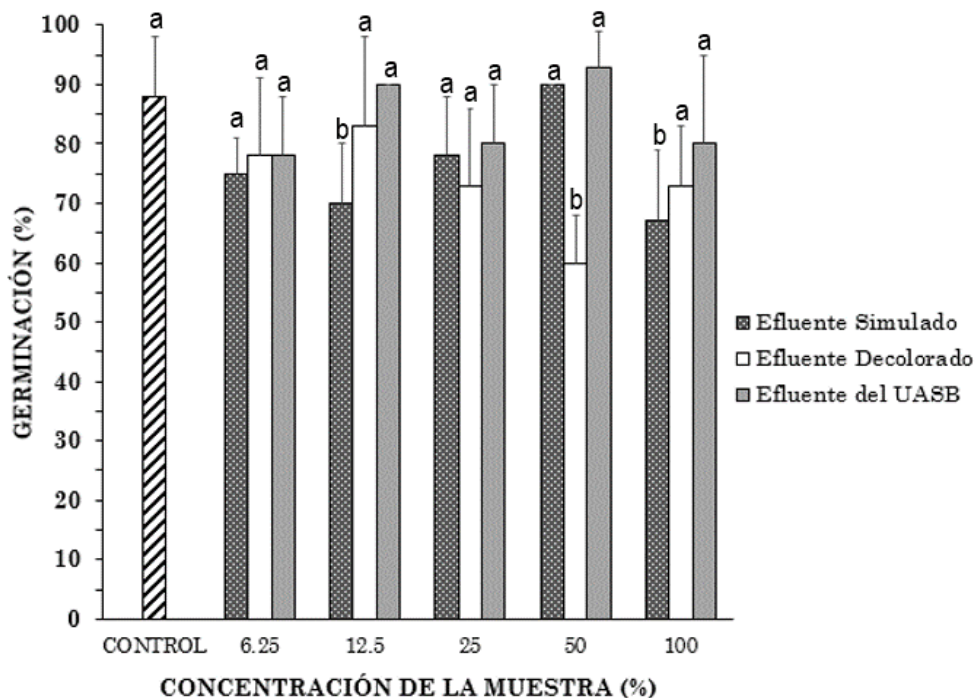


Fig. 9.9 Porcentaje de germinación de las semillas expuestas a diferentes concentraciones de los efluentes evaluados. Las barras seguidas por la misma letra dentro del mismo conjunto (Conjuntos: efluente simulado, efluente decolorado o efluente del UASB) corresponden a porcentajes de germinación que no difieren significativamente con respecto al control.

El porcentaje de germinación en las semillas control fue de $88 \pm 10 \%$ y como puede observarse, el efluente simulado a las concentraciones de 12.5 y 100 % inhibió significativamente la germinación de las semillas de acuerdo con la prueba de Dunnett. En estos casos los porcentajes de germinación obtenidos fueron: 70 ± 10 y $67 \pm 12\%$, respectivamente; lo que correspondió a una inhibición del 21 y 24%, en cada caso.

Los porcentajes de germinación registrados en las semillas expuestas al efluente decolorado y al efluente del reactor, *sin diluir*, fueron: 73 ± 10 y $81 \pm 15\%$, respectivamente. En este caso, solo la dilución 50 % del efluente decolorado afectó negativamente la germinación de las semillas.

Estos resultados mostraron que el efluente simulado ejerce efectos tóxicos sobre las semillas de *S. vulgare* inhibiendo su germinación, sin embargo, dichos efectos son eliminados durante el paso del efluente por el tratamiento secuencial enzimático – anaerobio.

Con respecto al crecimiento de las plántulas, en la **Fig. 9.10**, se presentan los resultados obtenidos de las mediciones de la longitud de la raíz a los 5 días de crecimiento.

La longitud de la raíz en las plántulas control fue de 4.4 ± 0.8 cm; de forma similar a lo encontrado durante el ensayo microbiológico de viabilidad, ni el efluente simulado, ni el del reactor UASB, ejercieron efectos inhibitorios. La longitud de la raíz de las plántulas expuestas a estos efluentes (*sin diluir*) fueron, 3.6 ± 0.6 y 4.1 ± 0.2 cm, respectivamente.

Por el contrario, el efluente decolorado sí afectó negativamente el desarrollo de esta estructura; además, se observó que la inhibición estuvo relacionado directamente con el aumento en la concentración de la muestra (efluente decolorado). La longitud de la raíz en estas plántulas fue de 1.7 ± 0.3 cm lo que significó una inhibición del 62 %.

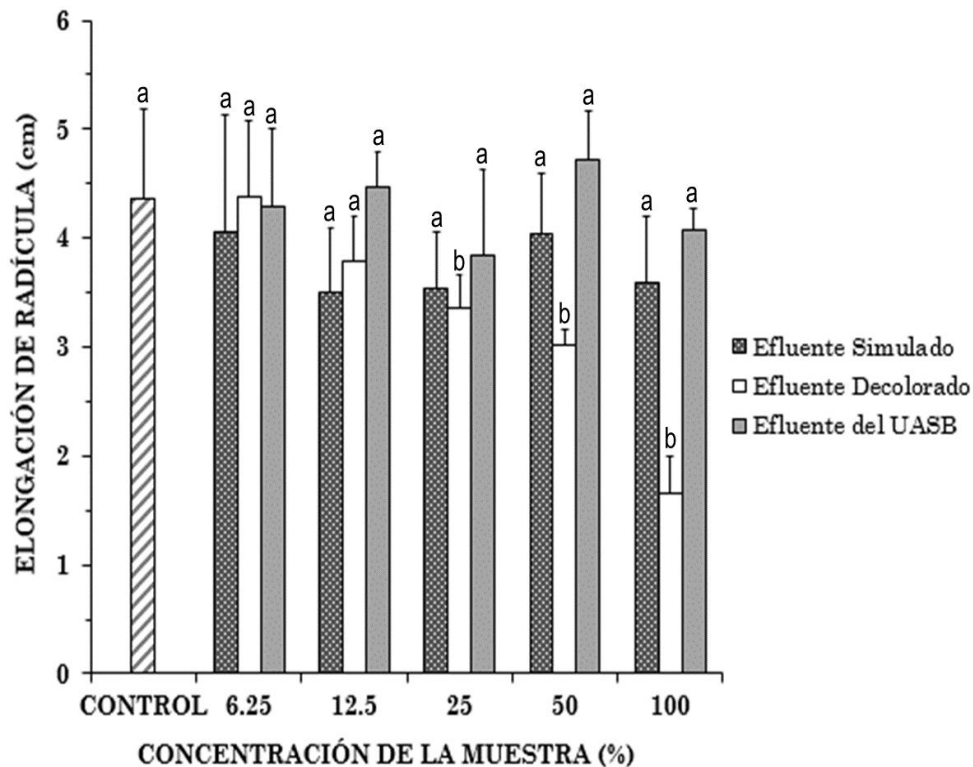


Fig. 9.10 Elongación de la radícula de las semillas expuestas a las diferentes concentraciones de las muestras evaluadas. Las barras seguidas por la misma letra dentro del mismo conjunto (Conjuntos: efluente simulado, efluente decolorado o efluente del UASB) corresponden a valores de elongación de la radícula que no difieren significativamente con respecto al control.

En cuanto a la plúmula (**Fig. 9.11**), la longitud de esta estructura en las plántulas control fue de 5.9 ± 1.3 cm. La exposición al efluente simulado en sus diferentes concentraciones, no afectó significativamente su crecimiento; la longitud registrada en presencia del efluente sin diluir (100 %) fue de 4.4 ± 0.5 cm.

Por el contrario, de manera similar a lo observado durante la medición radicular, también se encontró una inhibición del crecimiento de la plúmula causado por el contacto con efluente decolorado. Aunque a bajas concentraciones (6.25 y 12.5%) dicho efluente no afectó el crecimiento de la plúmula, a partir de la concentración 25 % sí se observó una inhibición significativa del crecimiento. Con las concentraciones 25, 50 y 100 %, la longitud de la plúmula fue de 4.5 ± 0.9 , 3.3 ± 0.2 y 2.0 ± 0.2 cm, respectivamente.

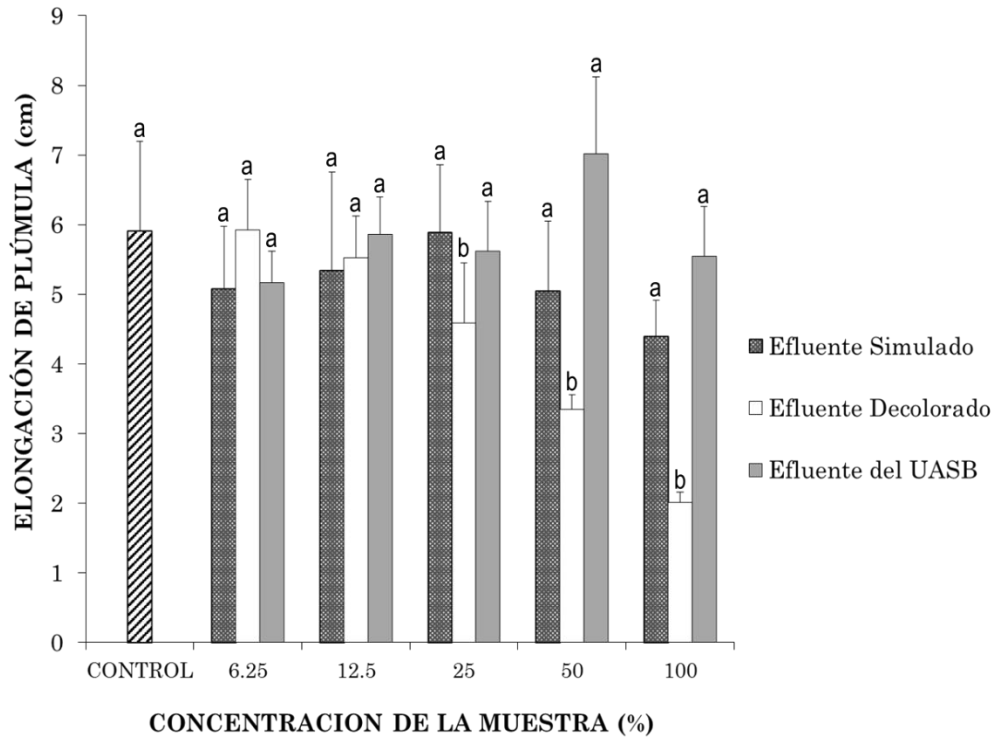


Fig. 9.11 Elongación de la plúmula en las semillas expuestas a los diferentes efluentes. Las barras seguidas por la misma letra dentro del mismo conjunto (Conjuntos: efluente simulado, efluente decolorado o efluente del UASB) corresponden a valores de elongación de la plúmula que no difieren significativamente con respecto al control.

Por lo tanto, la exposición de las semillas al efluente decolorado diluido al 50% o sin diluir (100%), ocasiona inhibiciones en el crecimiento de la plúmula superiores al 50 %.

Finalmente, la exposición de las semillas al efluente del reactor UASB no afectó significativamente el crecimiento de la estructura, pues la longitud promedio de la plúmula fue de 5.6 ± 1.7 cm después del contacto con el efluente sin diluir (100 %).

Puesto que únicamente el efluente decolorado resultó inhibitorio para el crecimiento de las plántulas (determinado como elongación de radícula y plúmula), los datos obtenidos de estos ensayos se utilizaron para calcular la concentración inhibitoria 50 (CI50)⁶ de este efluente para las variables elongación de radícula y elongación de plúmula. Así, la CI50 para la elongación de la radícula fue de 79 %, mientras que la CI50 para el crecimiento de la plúmula fue de 71 %.

⁶ La concentración inhibitoria 50 (CI50) se definió como la concentración del *efluente en estudio* requerida para inhibir en un 50 % el crecimiento de la radícula o de la plúmula de las plántulas expuestas.

Debido a que ni el efluente simulado y ni el efluente del reactor UASB ocasionaron inhibición del crecimiento, en estos casos no fue posible calcular las CI50.

Finalmente, se realizó un análisis comparativo de los efectos causados por la máxima concentración (100%) de cada efluente sobre la germinación y el crecimiento de las plántulas expuestas. Para ello se tomaron únicamente los resultados obtenidos al aplicar los efluentes sin diluir y se compararon entre sí mediante la prueba de Duncan, los resultados se presentan en la **Tabla 9.10**.

Tabla 9.10 Análisis comparativo de los efectos causados por la máxima concentración (100%) de cada efluente sobre la germinación y el crecimiento de las plántulas expuestas.

Muestra	Germinación (%)	Elongación de la radícula (cm)	Elongación de la plúmula (cm)
Control	88 ± 10 a	4.4 ± 0.8 a	5.9 ± 1.3 a
Efluente simulado	67 ± 12 a	3.6 ± 0.6 a	4.4 ± 0.5 a
Efluente decolorado	73 ± 10 a	1.7 ± 0.3 b	2.0 ± 0.2 b
Efluente del reactor UASB	81 ± 15 a	4.1 ± 0.2 a	5.6 ± 1.7 a

Los valores seguidos por la misma letra dentro de la misma columna no difieren significativamente.

Como puede observarse mediante la comparación de medias utilizando el método de Duncan no se observaron diferencias significativas entre los porcentajes de germinación obtenidos al exponer a las semillas a la máxima concentración (100 %) de cada efluente. Sin embargo, en el caso de la afectación del crecimiento de estructuras (radícula y plúmula), el análisis estadístico corroboró el hecho de que el efluente decolorado aplicado en su máxima concentración (es decir, *sin diluir*) es el único que afecta significativamente la elongación de la radícula y la plúmula de las plántulas expuestas.

9.4.3. Ensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna*

Se evaluó la toxicidad de los diferentes efluentes (efluente simulado, efluente decolorado con Biolite®, efluente del reactor UASB) utilizando un organismo acuático de alta sensibilidad, el micro-crustáceo de agua dulce *Daphnia magna*.

Estos ensayos se realizaron de acuerdo con la norma NMX-AA-087-1995-SCFI calculando en cada caso la correspondiente concentración letal 50 (CL50)⁷ en bioensayos de 48 h. Los resultados se presentan en la **Tabla 9.11**.

Tabla 9.11 Datos de toxicidad aguda calculados durante los bioensayos con *Daphnia magna*.

	CL50 (%)	Intervalo de confianza al 95%
Efluente Simulado	31.4 a	20.9 – 47.1% a
Efluente Decolorado	29.7 a	20.0 – 32.4% a
Efluente del UASB	63.3 b	53.1 – 77.3% b
Producto comercial Biolite®	24.3 a	13.0 – 39.4% a
Ácido isatín-5-sulfónico	ND	ND
NaCl 0.05 M	ND	ND

CL50: Concentración inhibitoria 50. ND. No se pudo determinar (no tóxico bajo las condiciones probadas). Los valores seguidos por la misma letra dentro de la misma columna no difieren significativamente

Para clasificar el nivel de toxicidad representado por los valores de CL50 calculados, se utilizó la clasificación de Coleman y Qureshi (1985) considerando 5 niveles de toxicidad: *no tóxico*, *ligeramente tóxico*, *tóxico*, *bastante tóxico*, *muy tóxico* (**Tabla 9.12**).

Como puede observarse, la CL50 del efluente simulado fue de 31.4% con un intervalo de confianza entre 20.9 y 47.1 %; de acuerdo con la clasificación anterior estos valores catalogan al efluente simulado como “*muy tóxico*” pues aunque la CL50 pertenece a la categoría de “*bastante tóxico*” el límite inferior del intervalo de confianza se posiciona dentro del rango correspondiente a la categoría de máxima toxicidad. Además, se realizó un ensayo control para determinar si la concentración de NaCl (0.05 M) presente en el efluente

⁷ La concentración letal 50 (CL50) se definió como la concentración del *efluente* que originó un efecto letal en el 50 % de los organismos expuestos.

simulado podía ejercer efectos tóxicos sobre los organismos de prueba, sin embargo, no se registró mortalidad a las 48 h de exposición.

Tabla 9.12 Intervalos de cálculo para la determinación del nivel de toxicidad en los ensayos con *Daphnia magna*.

Resultado de la prueba (CL50)	Categoría
<25%	Muy tóxico
26-50%	Bastante tóxico
51-75%	Tóxico
76-100%	Ligeramente tóxico
>100%	No tóxico

Coleman y Qureshi (1985)

En cuanto al efluente decolorado, no se observó diferencia significativa entre la toxicidad de éste y del efluente simulado; la CL50 del efluente decolorado fue de 29.7 % con un intervalo de confianza de 20.0 a 32.4% (*muy tóxico*).

Finalmente, el efluente del reactor UASB presentó una CL50 de 63.3% con un intervalo de confianza de 53.1 – 77.3 %. Como puede observarse en la **Tabla 9.11**, el tratamiento anaerobio del efluente decolorado permitió reducir la toxicidad en un 50 %. No obstante, de acuerdo con la clasificación utilizada, el tratamiento anaerobio no consiguió la destoxificación total del efluente simulado, pues los parámetros de toxicidad del efluente del reactor UASB lo catalogaron como “tóxico”.

Para establecer si el aumento en la toxicidad del efluente decolorado se debió a la generación del ácido isatín-5-sulfónico o a la toxicidad inherente al producto comercial (Biolite®), se procedió a estudiar específicamente la toxicidad del compuesto y de una solución del producto comercial Biolite® (a la misma concentración utilizada durante los ensayos de decoloración) (**Tabla 9.11**).

Como puede observarse, el ácido isatín-5-sulfónico no causó efectos tóxicos en los organismos de prueba en un intervalo de concentraciones entre 0 y 1 g l⁻¹, por lo que no se pudo determinar la CL50. Por otra parte, los parámetros de toxicidad obtenidos para el producto comercial Biolite® no mostraron diferencias significativas en comparación con los

del efluente decolorado con dicho producto. De acuerdo con estos resultados, la toxicidad del efluente decolorado no pudo atribuirse a la formación del ácido isatín-5-sulfónico, sino a la toxicidad misma del producto comercial Biolite®.



La degradación de colorantes sintéticos por oxidasas fúngicas se ha estudiado durante más de 20 años, sin embargo, la evaluación simultánea de la toxicidad de los productos de degradación es un tema relativamente reciente.

En repetidas ocasiones se ha observado que la decoloración de los tintes sintéticos no es garantía de destoxificación (Champagne y Ramsay 2010; Ramsay y Nguyen 2002; Abadulla et al 2000). Al respecto, Champagne y Ramsay (2010) observaron que la decoloración de los colorantes antraquinónicos azul disperso 3 (0.072 mM) y azul reactivo 19 (0.036 mM) utilizando lacasas libres o inmovilizadas aumenta la toxicidad de ambos colorantes. Utilizando las enzimas libres la toxicidad de los compuestos aumentó en un 33 % y en un 60%, respectivamente, mientras que usando las lacasas inmovilizadas la toxicidad aumentó en un 40% en el caso del azul disperso 3 y casi se triplicó después de la decoloración del azul reactivo 19. De manera similar, Ramsay y Nguyen (2002) encontraron que la decoloración del negro reactivo 5 (30-55 mg l⁻¹) utilizando cultivos de *Trametes versicolor*, no modifica su perfil de toxicidad siendo *moderadamente tóxico* (según la clasificación de Coleman y Qureshi 1985); sin embargo, después de la decoloración del rojo congo (30-55 mg l⁻¹) bajo las mismas condiciones, se observó un incremento significativo en la toxicidad pasando de ser *moderadamente tóxico* a *muy tóxico*, de acuerdo con la misma clasificación. Por otra parte, una práctica generalizada durante la realización de ensayos de toxicidad ha sido la utilización de *un solo tipo de organismos* como indicador absoluto de toxicidad, y en ocasiones, la selección del mismo no se ha justificado adecuadamente (Gomare et al 2009; Maalej-Kammoun et al 2009; Abadulla et al 2000). Por lo anterior, en este trabajo se seleccionaron organismos correspondientes a diferentes niveles tróficos (*Saccharomyces cerevisiae*, *Sorghum vulgare* y *Daphnia magna*), para evaluar la toxicidad del efluente simulado antes y después de su paso por el tratamiento propuesto.

Aunque los tres bioensayos arrojaron resultados similares, lo más llamativo fue la toxicidad asociada con la utilización del producto comercial Biolite®.

Como se mencionó anteriormente (sección 9.2) una estrategia para mejorar la tasa de decoloración de las lacasas o incluso permitir la oxidación de compuestos que por sí mismos no son sustrato de estas enzimas, es la adición de mediadores redox; sin embargo, se ha visto que la adición de mediadores redox en especial aquellos de origen sintético poseen una elevada toxicidad (Khlifi et al 2010). Debido a que se sospecha de la presencia de un mediador redox en el producto comercial Biolite®, es probable que el aumento en la toxicidad del producto sea debida a ello.

Una alternativa a la utilización de mediadores sintéticos consiste en el aprovechamiento de compuestos naturales que pueden actuar como mediadores redox. Al respecto, se ha probado que diferentes compuestos, entre ellos la acetosiringona (compuesto fenólico encontrado principalmente en las plantas), pueden actuar eficazmente como mediadores de las lacasas sin aumentar la toxicidad de los efluentes (Khlifi et al 2010). Además, en un trabajo previo sobre la decoloración del azul ácido 74 utilizando un ECE de *Fomes* sp. EUM1, se encontró que la toxicidad del efluente decolorado con el ECE del hongo era significativamente menor a la del mismo efluente pero decolorado con el producto comercial Biolite® (Méndez-Hernández et al 2010).

Finalmente, es importante resaltar que el tratamiento anaerobio resultó ser una estrategia eficaz no solo para eliminar los productos de la oxidación enzimática del colorante sino también para disminuir su toxicidad.

10. Resumen de Resultados

10.1. Producción de oxidasas (lacasas y peroxidasas) de *Fomes* sp. EUM1 en cultivo sólido.

- La máxima producción de lacasas (3.9 UI gss^{-1}) se observó a los 6 días en el Medio 2 (Rastrojo de maíz con salvado de trigo)
- La máxima producción de peroxidasas tipo DyP (107 mU gss^{-1}) se registró a los 6 días en el Medio 4 (Rastrojo de maíz, salvado de trigo, glucosa y extracto de levadura).
- Los resultados sugieren que la producción de estas enzimas se encuentra regulada por mecanismos distintos.

10.2. Pruebas de decoloración enzimática

- El extracto crudo enzimático obtenido del Medio 2 consiguió una decoloración del 98 % en 5 h (azul ácido 74, 100 mg l^{-1}), la tasa inicial de decoloración fue de $27.1 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$.
- Bajo las condiciones probadas no se comprobó la participación de las peroxidasas tipo DyP en la decoloración del azul ácido 74.
- Las características más importantes de las lacasas de *Fomes* sp. EUM1 fueron: su alta tasa de decoloración, alta estabilidad bajo condiciones adversas de temperatura y fuerza iónica e independencia de la adición de cofactores o mediadores de óxido-reducción externos (pues en ningún caso se adicionaron cofactores ni mediadores redox).
- La decoloración del efluente simulado (azul ácido 74, 100 mg l^{-1}) con una lacasa comercial (Biolite®) se consiguió en 1.3 h.
- El análisis por RMN ^1H del efluente decolorado reveló la presencia de ácido isatín-5-sulfónico (AIS) como principal producto de la degradación enzimática del colorante, ya sea usando el ECE de *Fomes* sp. EUM1 o la lacasa comercial Biolite®.

10.3. Tratamiento anaerobio del efluente decolorado

- El efluente decolorado con la lacasa comercial fue sometido a un tratamiento anaerobio en continuo en un reactor UASB (COV: 1 kg DQO m⁻³ d⁻¹). El sistema presentó una eficiencia del 77 % y una tasa de degradación de la DQO de 0.77 kg m⁻³ d⁻¹. Bajo estas condiciones la producción de metano fue de 233.4 l CH₄ m⁻³ d⁻¹ con un rendimiento de 303.3 l CH₄ kg⁻¹ DQO removido.
- El análisis por DGGE de la estructura del *lodo inoculado* durante la puesta en marcha del reactor UASB y del *lodo aclimatado* obtenido a los 412 días de operación, mostró la desaparición de varias bandas y la aparición de bandas nuevas tanto en el análisis poblacional de arqueas como en el de bacterias. Este fenómeno sugiere que el efluente decolorado ejerció una presión de selección sobre las poblaciones del *lodo inoculado*, alterando su dinámica poblacional.
- La exposición del *lodo inoculado* al efluente decolorado afectó las poblaciones microbianas presentes lo que probablemente favoreció la aclimatación de los microorganismos al efluente decolorado y su eficiencia para degradarlo.
- Para comprobar si el tratamiento anaerobio era igualmente eficiente para degradar el efluente decolorado con el extracto enzimático de *Fomes* sp. EUM1, el efluente decolorado con dicho extracto fue sometido a un tratamiento anaerobio en lote utilizando como inóculo el lodo obtenido al final de la operación del reactor UASB. El sistema presentó una eficiencia para remover la DQO inicial del 86 ± 1.5 % a los 8 días utilizando concentraciones crecientes de DQO inicial (300, 650 y 1000 mg l⁻¹). El porcentaje de metano registrado fue de 78.2, 75 y 72.5 % al trabajar con una DQO inicial de 300, 650 y 1000 mg l⁻¹, respectivamente, estos datos indicaron que no se presentó inhibición metabólica de la biomasa al tratar el efluente decolorado con el ECE de *Fomes* sp. EUM1.
- Con el objetivo de determinar si el ácido isatín-5-sulfónico, (*identificado como producto de la oxidación del azul ácido 74*), podía ser degradado por el lodo obtenido del reactor UASB, se realizaron pruebas específicas de degradación en lote utilizando este compuesto como única fuente de carbono y energía. Al trabajar con

una concentración del compuesto de 20 mg l⁻¹, la eficiencia de remoción del mismo fue superior al 85 % a los 10 días, con una eficiencia de eliminación de la DQO de 71.5 ± 10.6 % con producción de metano como evidencia de mineralización; el porcentaje de metano en el biogás fue de 68 ± 11 %. Sin embargo, a concentraciones de 50 y 100 mg l⁻¹, las eficiencias de remoción fueron de 57.7 ± 1.9 y 35.5 ± 11.3 %, respectivamente, con una proporción de CO₂ en el biogás superior al 90 %. Lo que sugirió que el aumento en la concentración inicial del ácido isatín-5-sulfónico ocasionó una inhibición en el metabolismo de la biomasa.

10.4. Evaluación del potencial eco-toxicológico del efluente simulado a su paso por el tratamiento secuencial

- Los tres ensayos (*viabilidad con Saccharomyces cerevisiae*, *fitotoxicidad con semillas de sorgo* y *ensayo de toxicidad aguda con Daphnia magna*) revelaron que la decoloración enzimática con la lacasa comercial no disminuye la toxicidad del efluente, sino que la incrementa.
- El ácido isatín-5-sulfónico no ejerció efectos de toxicidad aguda en un intervalo de concentraciones entre 0 y 1 g l⁻¹
- El producto comercial (Biolite®) mostró los mismos efectos tóxicos que el efluente decolorado; la toxicidad del producto comercial puede deberse a la presencia de mediadores redox.
- El tratamiento anaerobio del efluente simulado permitió disminuir su toxicidad en un 50%

11. Conclusiones

Se consiguió la decoloración y destoxificación del efluente simulado de la industria textil utilizando un tratamiento secuencial enzimas oxidativas – digestión anaerobia.

- El uso de las enzimas oxidativas del hongo *Fomes* sp. EUM1, particularmente las lacasas, mostró ser una estrategia eficiente para mediar la decoloración del efluente simulado.
 - Se demostró la capacidad de un sistema anaerobio para complementar el tratamiento del efluente decolorado, consiguiendo la mineralización el ácido isatín-5-sulfónico (*producto de la oxidación enzimática del colorante*).
 - La aclimatación del lodo granular a la degradación del efluente decolorado puede estar relacionada con una *modificación* en las poblaciones microbianas presentes en el inóculo.
 - El tratamiento secuencial enzimas oxidativas – digestión anaerobia del efluente simulado dio lugar a la formación de intermediarios menos tóxicos para los organismos de prueba: *Saccharomyces cerevisiae*, *Sorghum vulgare* y *Daphnia magna* en pruebas de toxicidad aguda.
-

12. Perspectivas

- Identificar los genes de lacasas del hongo *Fomes* sp. EUM1.
 - Evaluar la producción de una lacasa del hongo *Fomes* sp. EUM1 en un sistema de expresión heteróloga.
 - Evaluar la toxicidad crónica del efluente tratado por el sistema secuencial enzimas oxidativas – digestión anaerobia.
 - Identificar los microorganismos involucrados en la degradación anaerobia del efluente decolorado mediante el análisis de las secuencias de las bandas más representativas obtenidas en los geles de DGGE.
 - Probar la técnica de bio-enriquecimiento para mejorar la degradación del efluente decolorado en el reactor UASB.
 - Probar la eficiencia del sistema secuencial enzimas oxidativas – digestión anaerobia para el tratamiento de un efluente real de la industria textil.
-

13. Referencias

Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K. H., Cavaco-Paulo, A., & Gübitz, G. M. (2000). Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 3357-3362.

Ait-Aïssa, S., Pandard, P., Magaud, H., Arrigo, A. P., Thybaud, E., & Porcher, J. M. (2003). Evaluation of an in vitro hsp70 induction test for toxicity assessment of complex mixtures: comparison with chemical analyses and ecotoxicity tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **54**: 92-104.

Ali, N., Hameed, A., Ahmed, S., & Khan, A. G. (2008). Decolorization of structurally different textile dyes by *Aspergillus niger* SA1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **24**: 1067-1072.

Ammar, S., Abdelhedi, R., Flox, C., Arias, C., & Brillas, E. (2006). Electrochemical degradation of the dye indigo carmine at boron-doped diamond anode for wastewaters remediation. *Environmental Chemistry Letters*, **4**: 229-233.

Anjaneyulu, Y., Chary, N. S., & Raj, D. S. S. (2005). Decolourization of industrial effluents—available methods and emerging technologies—a review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, **4**: 245-273.

APHA, AWWA, WPCF (2005) Standard methods for the examination of water and wastewater. In: Eaton AD, Clesceri AE, Rice EW, Greenberg AE (eds) *American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation*, 21st edn. Washington, DC, pp. 214-217.

Archibald, F. S. (1992). A new assay for lignin-type peroxidase employing the dye Azure B. *Applied Environmental Microbiology*, **58**: 3110–3116.

Bonomo, R. P., Cennamo, G., Purrello, R., Santoro, A. M., & Zappala, R. (2001). Comparison of three fungal laccases from *Rigidoporus lignosus* and *Pleurotus ostreatus*:

correlation between conformation changes and catalytic activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **83**: 67-75.

Bourbonnais, R., Pice, M. G., Freiermuth, B., Bodie E. & Borneman, S. (1997). Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Applied Environmental Microbiology*, **63**: 4627-4632.

Buddemeier, R. W., Fautin, D. G., & Ware, J. R. (1997). Acclimation, adaptation and algal symbiosis in reef-building scleractinian corals. In *Proceedings of the Sixth International Conference on Coelenterate Biology*, pp. 3-10.

Cavaleiro, A. J., Sousa, D. Z., & Alves, M. M. (2010). Methane production from oleate: Assessing the bioaugmentation potential of *Syntrophomonas zehnderi*. *Water Research*, **44**: 4940-4947.

Champagne, P. P., & Ramsay, J. A. (2010). Dye decolorization and detoxification by laccase immobilized on porous glass beads. *Bioresource Technology*, **101**: 2230-2235.

Cole, J. R., Chai, B., Marsh, T. L., Farris, R. J., Wang, Q., Kulam, S. A., & Tiedje, J. M. (2003). The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Research*, **31**: 442-443.

Coleman, R. N., & Qureshi, A. A. (1985). Microtox® and *Spirillum volutans* tests for assessing toxicity of environmental samples. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, **35**: 443-451.

Combes, R. D., & Haveland-Smith, R. B. (1982). A review of the genotoxicity of food, drug and cosmetic colours and other azo, triphenylmethane and xanthene dyes. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, **98**: 101-243.

COVENIN. Norma Venezolana 1283-90. (1990). Colorantes textiles. Definiciones y clasificación (1ª revisión). *Comisión Venezolana de Normas Industriales Ministerio de Fomento*, pp. 1-3.

- Cripps, C., Bumpus, J. A., & Aust, S. D. (1990). Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**: 1114-1118.
- Dias, A. A., Bezerra, R. M., Lemos, P. M., & Pereira, A. N. (2003). In vivo and laccase-catalysed decolourization of xenobiotic azo dyes by a basidiomycetous fungus: characterization of its ligninolytic system. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **19**: 969-975.
- Doğan, D., & Türkdemir, H. (2005). Electrochemical oxidation of textile dye indigo. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **80**: 916-923.
- Durán, U., Monroy, O., Gómez, J., & Ramírez, F. (2008). Biological wastewater treatment for removal resins in UASB reactor: influence of oxygen. *Water Science & Technology*, **57**: 1047-1052.
- Dutka, B. J., Nyholm, N., & Petersen, J. (1983). Comparison of several microbiological toxicity screening tests. *Water Research*, **17**: 1363-1368.
- El Gaini, L., Lakraimi, M., Sebbar, E., Meghea, A., & Bakasse, M. (2009). Removal of Acid Blue 74 dye from water to Mg-Al-CO₃- calcined layered double hydroxides. *Journal of Hazardous Materials*, **161**: 627-632.
- Faraco, V., Piscitelli, A., Sannia, G., & Giardina, P. (2007). Identification of a new member of the dye-decolorizing peroxidase family from *Pleurotus ostreatus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **23**: 889-893.
- Farré, M., & Barceló, D. (2003). Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, **22**: 299-310.
- Ferreira, E. S., Hulme, A. N., McNab, H., & Quye, A. (2004). The natural constituents of historical textile dyes. *Chemical Society Reviews*, **33**: 329-336.
- Fischer-Colbrie, G., Maier, J., Robra, K. H., & Guebitz, G. M. (2005). Degradation of indigo carmine dye by an anaerobic mixed population. In: Lichtfouse E, Schwarzbauer J, Robert D

(eds) *Environmental chemistry: green chemistry and pollutants in ecosystems*, 1st edn. Springer, Berlin, pp 289–294.

García-Saucedo, C., Fernández, F.J., Buitrón, G., Cuervo-López, FM & Gómez, J (2008). Effect of loading rate on TOC consumption efficiency in a sulfate reducing process: sulfide effect in batch culture. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **83**: 1648-1657.

Gaunt, I. F., Grasso, P., Kiss, I. S., & Gangolli, S. D. (1969). Short-term toxicity study on indigo carmine in the pig. *Food and Cosmetics Toxicology*, **7**: 17-24.

Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S., & Sannia, G. (2010). Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **67**: 369-385.

Gomare, S. S., Tamboli, D. P., Kagalkar, A. N., & Govindwar, S. P. (2009). Eco-friendly biodegradation of a reactive textile dye Golden Yellow HER by *Brevibacillus laterosporus* MTCC 2298. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **63**: 582-586.

Hooson, J., Gaunt, I. F., Kiss, I. S., Grasso, P., & Butterworth, K. R. (1975). Long-term toxicity of indigo carmine in mice. *Food and Cosmetics Toxicology*, **13**: 167-176.

Hu, M. R., Chao, Y. P., Zhang, G. Q., Xue, Z. Q., & Qian, S. (2009). Laccase-mediator system in the decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **36**: 45-51.

Jadhav, J. P., Kalyani, D. C., Telke, A. A., Phugare, S. S., & Govindwar, S. P. (2010). Evaluation of the efficacy of a bacterial consortium for the removal of color, reduction of heavy metals, and toxicity from textile dye effluent. *Bioresource Technology*, **101**: 165-173.

Johannes, C., & Majcherczyk, A. (2000). Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 524-528.

- Kagalkar, A. N., Jagtap, U. B., Jadhav, J. P., Govindwar, S. P., & Bapat, V. A. (2010). Studies on phytoremediation potentiality of *Typhonium flagelliforme* for the degradation of Brilliant Blue R. *Planta*, **232**: 271-285.
- Kapanen, A., & Itävaara, M. (2001). Ecotoxicity tests for compost applications. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **49**: 1-16.
- Khelifi, R., Belbahri, L., Woodward, S., Ellouz, M., Dhouib, A., Sayadi, S., & Mechichi, T. (2010). Decolourization and detoxification of textile industry wastewater by the laccase-mediator system. *Journal of Hazardous Materials*, **175**: 802-808.
- Kim, S. J., & Shoda, M. (1999). Purification and characterization of a novel peroxidase from *Geotrichum candidum* Dec 1 involved in decolorization of dyes. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**: 1029-1035.
- Klonowska, A., Gaudin, C., Asso, M., Fournel, A., Réglier, M., & Tron, T. (2005). LAC3, a new low redox potential laccase from *Trametes* sp. strain C30 obtained as a recombinant protein in yeast. *Enzyme and Microbial Technology*, **36**: 34-41.
- Koparal, A. S., Yavuz, Y., Gürel, C., & Ögütveren, Ü. B. (2007). Electrochemical degradation and toxicity reduction of CI Basic Red 29 solution and textile wastewater by using diamond anode. *Journal of Hazardous Materials*, **145**: 100-108.
- Kumar, S. V., Phale, P. S., Durani, S., & Wangikar, P. P. (2003). Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnology and Bioengineering*, **83**: 386-394.
- Kuwahara, M., Glenn, J. K., Morgan, M. A., & Gold, M. H. (1984). Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Federation of European Biochemical Societies*, **169**: 247-250.
-

- Levin, L., Malignani, E., & Ramos, A. M. (2010). Effect of nitrogen sources and vitamins on ligninolytic enzyme production by some white-rot fungi. Dye decolorization by selected culture filtrates. *Bioresource Technology*, **101**: 4554-4563.
- Li, Z., Zhang, X., Lin, J., Han, S., & Lei, L. (2010). Azo dye treatment with simultaneous electricity production in an anaerobic-aerobic sequential reactor and microbial fuel cell coupled system. *Bioresource Technology*, **101**: 4440-4445.
- Luongo, L. A., & Zhang, X. J. (2010). Toxicity of carbon nanotubes to the activated sludge process. *Journal of Hazardous Materials*, **178**: 356-362.
- Maalej-Kammoun, M., Zouari-Mechichi, H., Belbahri, L., Woodward, S., & Mechichi, T. (2009). Malachite green decolourization and detoxification by the laccase from a newly isolated strain of *Trametes* sp. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **63**: 600-606.
- Majcherczyk, A., Johannes, C., & Hüttermann, A. (1999). Oxidation of aromatic alcohols by laccase from *Trametes versicolor* mediated by the 2, 2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) cation radical and dication. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **51**: 267-276.
- Manu, B., & Chaudhari, S. (2003). Decolorization of indigo and azo dyes in semicontinuous reactors with long hydraulic retention time. *Process Biochemistry*, **38**: 1213-1221.
- Medina, R. E. (2003). Caracterización de lacasas producidas por un hongo termofílico silvestre aislado a partir de desechos lignocelulósicos. Tesis de Maestría. *Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa*. México, D.F.
- Membrillo, I., Sánchez, C., Meneses, M., Favela, E., & Loera, O. (2008). Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains. *Bioresource Technology*, **99**: 7842-7847.
-

- Méndez-Hernández (2010). Decoloración del índigo carmín por medio de una estrategia basada en el cultivo sólido de *Fomes* sp. EUM1. Tesis de Maestría. *Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa*. México, D.F.
- Méndez-Hernández, J. E., Ramírez-Vives, F., Solís-Oba, M., Solís-Oba, A., Sobrino-Figueroa, A. S., & Loera, O. (2013). Detoxification and mineralization of Acid Blue 74: study of an alternative secondary treatment to improve the enzymatic decolourization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **29**: 805-814.
- Méndez-Paz, D., Omil, F., & Lema, J. M. (2005). Anaerobic treatment of azo dye Acid Orange 7 under fed-batch and continuous conditions. *Water Research*, **39**: 771-778.
- Montalvo & Guerrero (2008) Tratamiento Anaerobio de Residuos. Ed. *Universidad Técnica*. pp. 13-16.
- Morrison, R., & Boyd, R. (1998). Química Orgánica. 5a Edición. *Pearson Addison Wesley*. México. pp. 964.
- Murugesan, K., Nam, I. H., Kim, Y. M., & Chang, Y. S. (2007). Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid state culture. *Enzyme and Microbial Technology*, **40**: 1662-1672.
- Muyzer, G., & Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, **73**: 127-141.
- Nielsen, HB., Mladenovska, Z., Westermann, P & Ahring, BK (2004). Comparison of two-stage thermophilic (68°C/55°C) anaerobic digestion with one-stage thermophilic (55°C) digestion of cattle manure. *Biotechnology and Bioengineering*, **86**: 291- 300.
- NMX-AA-087-1995-SCFI Análisis de agua – evaluación de toxicidad aguda con *Daphnia magna* Status (Crustacea – Cladocera) – Método de prueba. *Secretaría de Comercio y Fomento Industrial*.
-

- Novotný, Č., Svobodová, K., Benada, O., Kofroňová, O., Heissenberger, A., & Fuchs, W. (2011). Potential of combined fungal and bacterial treatment for color removal in textile wastewater. *Bioresource Technology*, **102**: 879-888.
- Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, Rl., Ludwig, W & Backhaus, H (1996). Sequence heterogeneities of genes encoding 16 rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*, **178**: 5636-5643.
- O'Neill, C., Hawkes, F. R., Hawkes, D. L., Esteves, S., & Wilcox, S. J. (2000a). Anaerobic-aerobic biotreatment of simulated textile effluent containing varied ratios of starch and azo dye. *Water Research*, **34**: 2355-2361.
- O'Neill, C., Lopez, A., Esteves, S., Hawkes, F. R., Hawkes, D. L., & Wilcox, S. (2000b). Azo-dye degradation in an anaerobic-aerobic treatment system operating on simulated textile effluent. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **53**: 249-254.
- Osma, J. F., Toca-Herrera, J. L., & Rodríguez-Couto, S. (2010). Biodegradation of a simulated textile effluent by immobilised-coated laccase in laboratory-scale reactors. *Applied Catalysis A: General*, **373**: 147-153.
- Pagga, U., & Brown, O. (1986). The degradation of dyestuffs: part II behaviour of dyestuffs in aerobic biodegradation tests. *Chemosphere*, **15**: 479-491.
- Palmieri, G., Cennamo, G., & Sannia, G. (2005). Remazol Brilliant Blue R decolourisation by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system. *Enzyme and Microbial Technology*, **36**: 17-24.
- Papinutti, V. L., Diorio, L. A., & Forchiassin, F. (2003). Production of laccase and manganese peroxidase by *Fomes sclerodermeus* grown on wheat bran. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **30**: 157-160.
-

- Podgornik, H., Poljanšek, I., & Perdih, A. (2001). Transformation of Indigo carmine by *Phanerochaete chrysosporium* ligninolytic enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, **29**: 166-172.
- Ramírez, P., & Mendoza A. (2008). Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México. SEMARNAT, INE, (2008). Pp. 5, 99-114.
- Ramsay, J. A., & Nguyen, T. (2002). Decoloration of textile dyes by *Trametes versicolor* and its effect on dye toxicity. *Biotechnology Letters*, **24**: 1757-1761.
- Raymundo, A. S., Zanarotto, R., Belisário, M., Pereira, M. D. G., Ribeiro, J. N., & Ribeiro, A. V. F. N. (2010). Evaluation of sugar-cane bagasse as bioadsorbent in the textile wastewater treatment contaminated with carcinogenic congo red dye. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **53**: 931-938.
- Reinhammar, B. R., & Vänngård, T. I. (1971). The Electron-Accepting Sites in Rhus vernicifera Lacase as Studied by Anaerobic Oxidation-Reduction Titrations. *European Journal of Biochemistry*, **18**: 463-468.
- Reipa, V., Shanklin, J., & Vilker, V. (2004). Substrate binding and the presence of ferredoxin affect the redox properties of the soluble plant Δ^9 -18: 0-acyl carrier protein desaturase. *Chemical Communications*, **21**: 2406-2407.
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., & Nigam, P. (2001). Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology*, **77**: 247-255.
- Rodríguez, Couto, S. (2009). Dye removal by immobilised fungi. *Biotechnology Advances*, **27**: 227-235.
-

- Rumlova, L., & Dolezalova, J. (2012). A new biological test utilising the yeast *Saccharomyces cerevisiae* for the rapid detection of toxic substances in water. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **33**: 459-464.
- Sayed, S., & de Zeeuw, W. (1988). The performance of a continuously operated flocculent sludge UASB reactor with slaughterhouse wastewater. *Biological Wastes*, **24**: 199-212.
- Schauer-Gimenez, A. E., Zitomer, D. H., Maki, J. S., & Struble, C. A. (2010). Bioaugmentation for improved recovery of anaerobic digesters after toxicant exposure. *Water Research*, **44**: 3555-3564.
- Shin, K., Oh, I., & Kim, C. (1997). Production and Purification of Remazol Brilliant Blue R Decolorizing Peroxidase from the Culture Filtrate of *Pleurotus ostreatus*. *Applied and environmental microbiology*, **63**: 1744-1748.
- Spurgeon, D. J., Jones, O. A., Dorne, J. L., Svendsen, C., Swain, S., & Stürzenbaum, S. R. (2010). Systems toxicology approaches for understanding the joint effects of environmental chemical mixtures. *Science of the Total Environment*, **408**: 3725-3734.
- Stolz, A. (2001). Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **56**: 69-80.
- Sugano, Y (2009). DyP-type peroxidases comprise a novel heme peroxidase family. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **66**: 1387-1403.
- Sugano, Y., Sasaki, K., & Shoda, M. (1999). cDNA cloning and genetic analysis of a novel decolorizing enzyme, peroxidase gene dyp from *Geotrichum candidum* Dec 1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **87**: 411-417.
- Sun, S., Guo, Z., Yang, R., Sheng, Z., & Cao, P. (2014). Study on the triphenyl tetrazolium chloride–dehydrogenase activity (TTC-DHA) method in determination of bioactivity for treating tomato paste wastewater. *African Journal of Biotechnology*, **11**: 7055-7062.
-

- Tay, J. H., He, Y. X., & Yan, Y. G. (2001). Improved anaerobic degradation of phenol with supplemental glucose. *Journal of Environmental Engineering*, **127**: 38-45.
- Vaithanomsat, P., Apiwatanapiwat, W., Petchoy, O., & Chedchant, J. (2010). Production of ligninolytic enzymes by white-rot fungus *Datronia* sp. KAPI0039 and their application for reactive dye removal. *International Journal of Chemical Engineering*, **2010**: 1-6.
- Vashon, R. D., Jones, W. J., & Payne, A. G. (1982). The effect of water hardness on nitrotriacetate removal and microbial acclimation in activated sludge. *Water Research*, **16**: 1429-1432.
- Vautier, M., Guillard, Ch., & Herrmann, J. M. (2001) Photocatalytic degradation of dyes in water: case study of indigo and of Acid Blue 74. *Journal of Catalysis*, **201**: 46–59.
- Veeresh, G. S., Kumar, P., & Mehrotra, I. (2005). Treatment of phenol and cresols in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) process: a review. *Water Research*, **39**: 154-170.
- Volpi Ghirardini, A., Girardini, M., Marchetto, D., & Pantani, C. (2009). Microtox® solid phase test: Effect of diluent used in toxicity test. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **72**: 851-861.
- Wambuguh, D., & Chianelli, R. R. (2008). Indigo dye waste recovery from blue denim textile effluent: a by-product synergy approach. *New Journal of Chemistry*, **32**: 2189-2194.
- Wong, Y., & Yu, J. (1999). Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Water Research*, **33**: 3512-3520.
- Yan, Y. G., & Tay, J. H. (1997). Characterisation of the granulation process during UASB start-up. *Water Research*, **31**: 1573-1580.
- Yang, Q., Wang, J., Wang, H., Chen, X., Ren, S., Li, X., Xu, Y., Zhang H., & Li, X. (2012). Evolution of the microbial community in a full-scale printing and dyeing wastewater treatment system. *Bioresource Technology*, **117**: 155-163.
-

Zille, A., Górnacka, B., Rehorek, A., & Cavaco-Paulo, A. (2005). Degradation of azo dyes by *Trametes villosa* laccase over long periods of oxidative conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**: 6711-6718.

SCIENTIFIC ARTICLE

Detoxification and mineralization of Acid Blue 74: study of an alternative secondary treatment to improve the enzymatic decolourization. *World J Microbiol Biotechnol* (2013) 29:805–814. DOI [10.1007/s11274-012-1235-7](https://doi.org/10.1007/s11274-012-1235-7)



RESEARCH STAY

Group of Environmental Engineering and Bioprocesses
Dept. of Chemical Engineering-School of Engineering
Universidad de Santiago de Compostela

CONTINUOUS REMOVAL OF NONYLPHENOL BY A TWO-STEP MEMBRANE BIOREACTOR UNDER ENVIRONMENTAL CONDITIONS

1. Introduction

Nonylphenol ethoxylates (NPnEO) are one of the most widely used nonionic surfactants for industrial and domestic purposes. Due to its extensive use NPnEO reach sewage treatment works in substantial amounts where they are incompletely degraded to nonylphenol (Ahel et al 1994, Soares et al 2008). Hence, this compound is mainly introduced into the environment by municipal or industrial wastewater discharges and sewage treatment plant effluents (Planas et al 2002). The occurrence of nonylphenol has been reported around the world in different aquatic environments and also in drinking water (Junghanns et al 2005; Li et al 2007; Chen et al 2013). In fact, there have been reported nonylphenol concentrations in water from below detection levels to significantly high concentrations (up to 644 $\mu\text{g l}^{-1}$) (Vazquez-Duhalt et al 2005).

Recently, scientific interest has increasingly focused on this compound, because of its ability to disturb the hormonal homeostasis of different organisms. The harmful effects of nonylphenol are mainly related to its capability to initiate proliferation in breast tumor cells, to affect the normal development of males and their reproductive systems and also to cause high prenatal exposure levels due to its capability to partition between maternal and fetal compartments (Soto et al 1991; Chen et al 2008).

Secondary biological treatment of wastewater significantly reduces the concentration of nonylphenol. However, it is known that 60-65% of the nonylphenolic compounds entering sewage treatment works will pass through unchanged and will be discharged to the environment (Jones et al 2007).

In light of the above observations, several treatment technologies, such as UV treatment, ozonation, electrochemical degradation, Fenton treatment, filtration techniques, etc., have been used to remove nonylphenol from wastewaters. Nevertheless, these technologies might suffer from several drawbacks such as, costly infrastructure requirements, high operating expenses or even the generation of toxic reaction products (Maletz et al 2013; Kim et al

2005; Kitis et al 1999; Soares et al 2008). Furthermore, it has been estimated that upgrading a medium sewage treatment works from a standard activated sludge treatment to an advanced treatment works (equipped with activated carbon filters, UV treatment and ozonation), would increase the capital costs by 38%, increasing more than 6 times the operating costs (Jones et al 2007).

One promising biological alternative is the use of white rot fungi (WRF) since their ligninolytic enzymes (including peroxidases and laccases) have been used to oxidize a wide range of recalcitrant compounds. In this way, it has been demonstrated the capability of laccases and versatile peroxidases (VP) to remove nonylphenol from water (Catapane et al 2013; Taboada-Puig). In fact, the literature is extensive on studies of the factors influencing the oxidation process by free enzymes, but only a few reports have tried to overcome the limitations related to the use of enzymatic systems, particularly those related to the non-reusability and to the deactivation of the biocatalysts (Lloret et al 2012).

Hence, in this work it was studied the performance of a two-step membrane bioreactor as an alternative to achieve the continuous removal of nonylphenol from water. The reactor was based on the utilization of a versatile peroxidase (VP) produced by the anamorph R1 of *Bjerkandera* sp. This enzyme is a hybrid between Mn-peroxidase (MnP) and lignin peroxidase (LiP) that combines the catalytic properties of the above two peroxidases. During its catalytic cycle, the VP oxidizes Mn^{2+} to Mn^{3+} . The Mn^{3+} produced is a strong oxidizer (1.54 V) that can form complexes with different organic acids (chelates) to enhance its stability, in this way, the Mn^{3+} complexes can act as a stable and efficient diffusing oxidizers which can degrade a wide range of organic compounds (Pozdnyakova et al 2010; Martínez et al 2002). The two-step bioreactor used in this work takes advantage of this feature of the VP catalytic cycle since its configuration was based on the separation of the global process into two stages: enzymatic stage, where the Mn^{3+} production takes place, and the oxidation stage, where the Mn^{3+} produced oxidizes the target compound, e.g. nonylphenol. Also, the bioreactor is equipped with an ultrafiltration membrane which allows the separation of the enzyme from the Mn^{3+} complex. In this way, the complex can be used to achieve the pollutant oxidation while the enzyme is recovered, recirculated and reused continuously.

The production and use of Mn^{3+} complexes has been reported successfully for other biotechnological applications, e.g. Grabski et al (1998) demonstrated the feasibility of use a two-stage immobilized MnP bioreactor for the production of Mn^{3+} and its application to chlorophenol degradation. Later, Sasaki et al (2001) developed a new pulp biobleaching method based on a thermally discontinuous two-stage reactor system using a Mn-peroxidase as biocatalyst for Mn^{3+} -chelates production. More recently, Taboada-Puig et al (2011a) studied this reactor configuration for the removal of different environmental pollutants.

Although the two-step bioreactor has been used to analyze the removal of different pollutants, its application to nonylphenol degradation is still absent; moreover, its efficiency has been tested only on synthetic effluents so it is important to evaluate its performance working with real sewage treatment plant effluents in order to implement a practical application. Therefore, the objective of this work was to evaluate the continuous removal of nonylphenol by a two-step membrane bioreactor under real conditions, namely environmental concentrations of nonylphenol and, a real sewage treatment plant (STP) effluent as the matrix to formulate the bioreactor feeding.

2. Materials and methods

Chemicals and enzyme

Nonylphenol and 2,6-dimethoxyphenol were obtained from Sigma-Aldrich. All solvents were HPLC grade. Versatile peroxidase was obtained from submerged cultures of the anamorph R1 of *Bjerkandera* sp. and grown as described by Taboada-Puig et al (2013).

Analytical methods

Enzyme assay

Manganese-dependent VP activity was measured by monitoring the oxidation of 2,6-dimethoxyphenol (DMP) at 468 nm. The test was performed in a sodium malonate buffer (pH 4.5, 50 mM) at 30 °C in the presence of 0.1 mM $MnSO_4$ and 0.4 mM H_2O_2 . One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that transforms 1 μ mol substrate/min (Mester et al 1995).

Determination of Mn³⁺-malonate complex

The Mn³⁺-malonate complex was determined spectrophotometrically at 270 nm. To calculate the concentration, a molar extinction coefficient of $\epsilon_{270} = 11.59 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ was used (Wariishi et al 1992).

Experimental setup

The reactor feeding (containing a specific nonylphenol concentration) was prepared by diluting a concentrated nonylphenol stock solution (1 g l^{-1} in methanol) in an appropriate amount of distilled water or in a real STP effluent; in all cases, 5% of methanol was added to improve nonylphenol solubility.

Batch assays

Oxidation of nonylphenol was carried out in jacketed glass bioreactors (200 ml working volume) with temperature control and a magnetic stirring device. The temperature was maintained at 30°C by the circulation of temperature-controlled water. The reaction mixture consisted of nonylphenol (3 mg l^{-1}), VP activity (100 U L^{-1}), sodium malonate (12.5 mM, pH 4.5) and MnSO₄ (1.25 mM). To maintain the catalytic cycle H₂O₂ was continuously added to the reactors at a feeding rate of 25 $\mu\text{M}/\text{min}$.

Samples were withdrawn periodically during 8 h and analyzed for nonylphenol concentration, enzyme activity and Mn³⁺-malonate complex concentration. Samples (1 ml) for nonylphenol quantification were first acidified to pH 2 with HCl (5 M) and then extracted twice with 1 ml of ethyl acetate. The ethyl acetate fractions were combined, dried over anhydrous sodium sulfate, and concentrated with a nitrogen flow to dryness. The solvent-free residues were re-suspended in ethyl acetate, derivatized using N-methyl-N-(tertbutyldimethylsilyl) trifluoroacetamide (MTBSTFA) and analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) as previously described Rodríguez et al (2003).

To avoid the oxidation of DMP by the Mn³⁺ during the enzyme activity quantification, 1-ml samples taken from the reactors were first dialyzed through a PD-10 desalting column

(Amersham Biosciences) with sodium malonate (12.5 mM, pH 4.5) as the mobile phase. The manganese-dependent VP activity was measured on the dialyzed sample as previously described.

Nonylphenol removal in the two-step membrane bioreactor

The reactor configuration consisted of two glass reactors coupled into a continuous system (Fig. 1). The enzymatic production of the Mn^{3+} -complex was performed in the first reactor (enzymatic reactor), which consisted in a stirred tank (working volume of 265 ml) coupled to a 10 kDa cut-off ultrafiltration membrane (Prep/Scale-TFF Millipore). The membrane allowed the separation of the enzyme and its recirculation into the bioreactor. The suitability of the selected membrane was assessed by recirculating a buffered solution of VP through the membrane; no loss of enzyme activity was determined in the permeate. In order to maintain an enzyme activity concentration above 100 U L^{-1} in the enzymatic reactor, VP was added in two pulses, one at the beginning of the assay and the other one an hour later. Addition of cofactors was carried out in continuous mode at a hydraulic retention time (HRT) of 50 minutes. The operational conditions were: H_2O_2 feed rate, $25 \mu\text{M}/\text{min}$, sodium malonate feed rate, $250 \mu\text{M}/\text{min}$ and MnSO_4 feed rate, $25 \mu\text{M}/\text{min}$. Temperature was maintained at $30 \text{ }^\circ\text{C}$ by circulation of thermostated water.

The Mn^{3+} -malonate complex produced in the enzymatic reactor was conducted to a second reactor (oxidation reactor) in order to achieve the removal of nonylphenol. The oxidation reactor consisted in a stirred tank (working volume of 200 ml) also operated in a continuous mode. The HRT was 18.5 minutes and the operational parameters were: Mn^{3+} -malonate complex feed rate, $9.2 \mu\text{M}/\text{min}$ and nonylphenol feed rate, $9.72 \text{ mg l}^{-1}\cdot\text{h}$.

All the solutions were fed into the reactors by independent variable-speed peristaltic pumps equipped with silicon or Teflon interconnecting tubing. The tubing for the nonylphenol feeding was saturated with the compound before starting the assays.

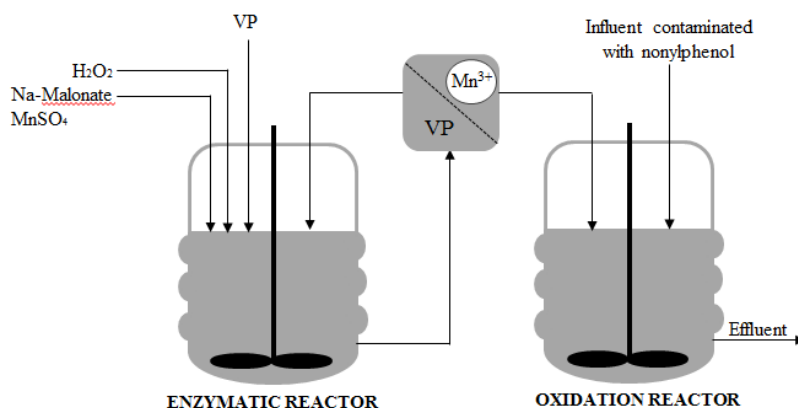


Fig. 1 Scheme of the two-step membrane bioreactor.

In a preliminary assay the oxidation reactor was fed with a synthetic wastewater containing 6 mg l⁻¹ of nonylphenol, later the nonylphenol concentration in the influent was reduced to 1 mg l⁻¹ and then to 100 µg l⁻¹. The nonylphenol removal in the oxidation reactor, was also studied at different HRT by varying the compound feeding rate. The feeding rate values tested were: 0.16, 0.66 and 1.50 mg l⁻¹·h, corresponding to HRT values of 18.5, 6.8 and 3.6 minutes, respectively. In all cases the operational conditions in the enzymatic reactor were maintained constant and the Mn³⁺-malonate feeding rate in the oxidation reactor was 9.8 µM/min.

To assess the influence of the utilization of a real STP effluent into the nonylphenol removal, a new experiment was performed using a real STP effluent (obtained from a STP located in O'Milladoiro, Spain) as the matrix to formulate the reactor feeding.

Operational conditions on both, enzymatic and oxidation reactors were maintained as previously described and the nonylphenol concentration in the influent was 100 µg l⁻¹.

Samples from the enzymatic reactor were collected at convenient times to determine enzyme activity and Mn³⁺-malonate complex concentration, similarly, samples from the oxidation reactor were collected to determine the Mn³⁺-malonate complex and the residual nonylphenol concentration. Nonylphenol was extracted from aqueous samples by solid phase extraction (SPE) cartridges (OASIS HLB cartridges, Water closet, Milford, MA, USA), derivatized using N-methyl-N-(tertbutyldimethylsilyl) trifluoroacetamide (MTBSTFA) and then analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) according to Rodríguez et al

(2003). The enzyme activity and the Mn^{3+} -malonate complex were quantified following the previously described methods.

3. Results

Batch removal of nonylphenol by free VP

As a preliminary experiment we assessed the potential of free VP to remove nonylphenol in batch reactors. Profiles of nonylphenol removal, Mn^{3+} -malonate production and enzyme activity are shown in Fig. 2.

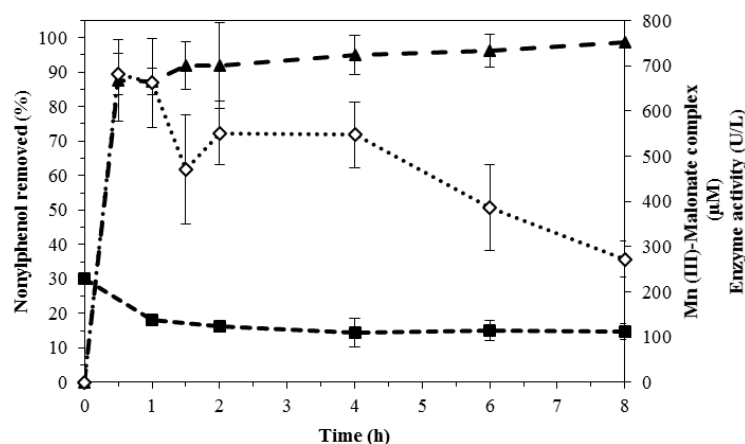


Fig. 2 Profiles of nonylphenol removal (▲), production of Mn^{3+} -malonate complex (◇) and enzyme activity (■) during batch oxidation of nonylphenol by free VP.

As can be observed $90 \pm 12\%$ of total nonylphenol was removed during the first 30 minutes of operation and at the end of 8 hours 99% was removed. The initial rate of nonylphenol degradation was $2.2 \pm 0.3 \text{ mg l}^{-1}\cdot\text{h}$. Mn^{3+} -malonate complex rapidly increased during the first hour, reaching a maximum value of $682 \mu\text{M}$ in 30 min. Regarding VP activity, during the first hour the enzyme activity decreased from 230 U L^{-1} to 139 U L^{-1} , nevertheless, no significant differences were observed in the enzyme activity during the rest of the operation time.

Nonylphenol removal in a two-step membrane bioreactor

In view of a practical application, the free VP was applied to nonylphenol biodegradation in a continuous two-step membrane bioreactor. In a first assay, the reactor performance was

tested working with a synthetic wastewater containing 6 mg l^{-1} of nonylphenol, the nonylphenol feeding rate was $9.72 \text{ mg l}^{-1}\cdot\text{h}$. Time course of Mn^{3+} -malonate production and enzyme activity in the enzymatic reactor are shown in Fig. 3A.

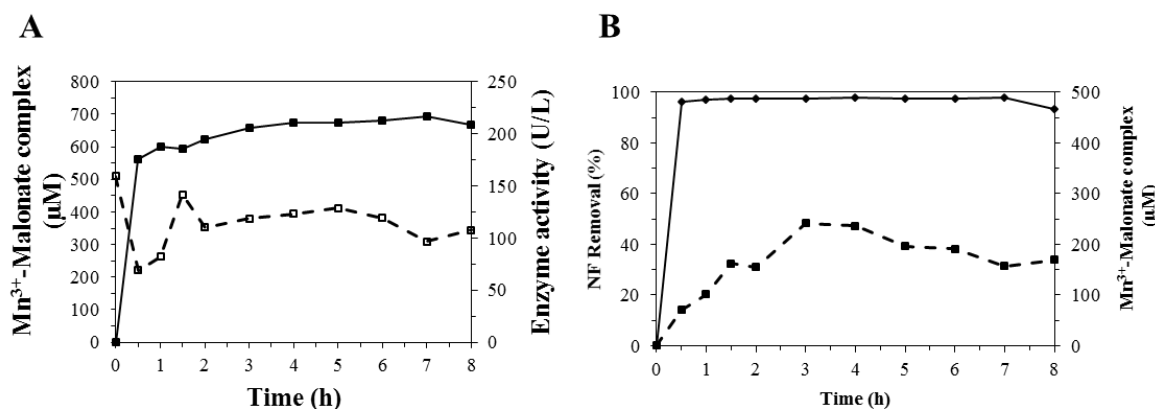


Fig. 3 Continuous removal of nonylphenol by the two-step membrane bioreactor working with synthetic wastewater containing 6 mg l^{-1} of nonylphenol. **A)** Enzyme activity (\square) and Mn^{3+} -malonate production (\blacksquare) in the enzymatic reactor. **B)** Mn^{3+} -malonate concentration (\blacksquare) and nonylphenol removal (\blacktriangle) in the oxidation reactor.

Mn^{3+} -malonate production reached a stable value of $678 \pm 9 \mu\text{M}$ during the steady state operation of the enzymatic reactor, whereas the enzyme activity remained without significant changes (around 100 U L^{-1}) during the 8 h of experimentation. The Mn^{3+} -malonate complex produced in the enzymatic reactor was continuously fed into the oxidation reactor in order to achieve the oxidation of nonylphenol. Results of the performance of the oxidation reactor are shown in Fig. 3B. As can be observed, the system was capable to remove more than 95% of the nonylphenol at an elimination rate of $9.43 \text{ mg l}^{-1}\cdot\text{h}$ showing the potential of this reactor configuration for the continuous removal of the compound.

With the aim of evaluate the nonylphenol removal at lower concentrations, in the next experiment, the nonylphenol level in the contaminated stream was reduced to 1 mg l^{-1} giving to a feeding rate of $1.62 \text{ mg l}^{-1}\cdot\text{h}$ in the oxidation reactor; the operational conditions in the enzymatic reactor where maintained constant. Results are shown in Fig. 4.

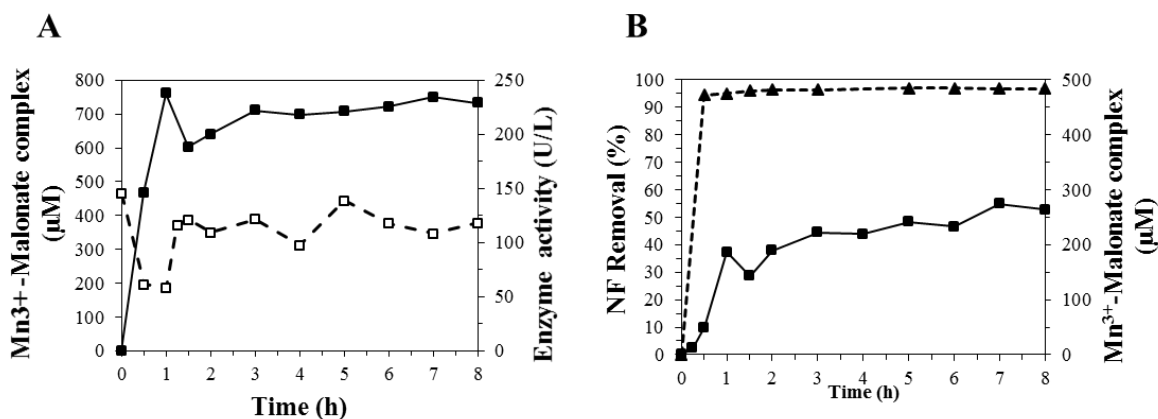


Fig. 4 Continuous removal of nonylphenol by the two-step membrane bioreactor working with synthetic wastewater containing 1 mg l⁻¹ of NF. **A)** Enzyme activity (□) and Mn³⁺-malonate production (■) in the enzymatic reactor. **B)** Mn³⁺-malonate concentration (■) and nonylphenol removal (▲) in the oxidation reactor.

Similarly to the previous experiment, the Mn³⁺-malonate complex production on the enzymatic reactor was $728.2 \pm 18.3 \mu\text{M}$ and the enzyme activity remained around 100 U L⁻¹ (Fig. 4A), moreover, the nonylphenol removal in the oxidation reactor was more than 95% giving to an elimination rate of 1.5 mg l⁻¹·h. during the steady state period (Fig. 4B).

Due to the slow biodegradation of nonylphenol under aerobic conditions this compound has been found in effluents from sewage treatment plants, treating municipal and industrial effluents, at concentrations from 0.2 μg l⁻¹ to 398 μg l⁻¹ (Soares et al 2008; Solé et al 2000). This issue was further examined by modifying the nonylphenol concentration in the reactor feeding stream according to those values and also by using a real sewage treatment plant effluent as the matrix to formulate the reactor feeding. Thus, in the next experiment the nonylphenol concentration in the feeding influent was adjusted to 100 μg l⁻¹ and the nonylphenol feeding rate in the oxidation reactor to 0.16 mg l⁻¹·h. As can be seen on Table 2, under those conditions the nonylphenol removal was 100%. So, in order to enhance the reactor efficiency, the ratio between the Mn³⁺-malonate consumed and the nonylphenol fed into the oxidation reactor was analyzed. It was found that the molar consumption of the Mn³⁺-malonate complex during the nonylphenol oxidation was very low, suggesting that the complex feeding rate was exceeding to that required to achieve the oxidation reaction.

Therefore, to take advantage of the high levels of Mn^{3+} produced in the enzymatic reactor, the nonylphenol feeding rate into the oxidation reaction was increased to $0.66 \text{ mg l}^{-1}\cdot\text{h}$ without modifying the operational conditions of the enzymatic reactor. As can be seen on Table 2, again the nonylphenol removal efficiency was 100%. So that, after two hours of stable operation, the nonylphenol feeding rate was increased again, now to $1.50 \text{ mg l}^{-1}\cdot\text{h}$. Due to the increase in the nonylphenol feeding rate, the Mn^{3+} -malonate concentration in the oxidation reactor was significantly diluted, however, this issue did not affect the system efficiency, since the nonylphenol removal was almost complete (99%), with an elimination rate of $1.49 \text{ mg l}^{-1}\cdot\text{h}$. On the other hand, the results showed that the nonylphenol removal by the two-stage membrane bioreactor was not affected by the utilization of a real STP effluent.

Table 1. Continuous removal of nonylphenol by the two-step membrane bioreactor working with a real sewage treatment plant effluent.

NP in the influent ($\mu\text{g l}^{-1}$)	NP in R2 ($\mu\text{g l}^{-1}$)	HRT (min)	Mn^{3+} -malonate complex in R2 (μM)	Elimination rate ($\text{mg l}^{-1}\cdot\text{h}$)	Removal efficiency (%)
100	50	18.5	135	0.16	99.5
100	72.5	6.6	67	0.66	99.5
100	90	3.6	32	1.49	99.2

NF: Nonylphenol, R2: Oxidation Reactor

4. Discussion

Endocrine disrupting chemicals account for a significant amount of the chemicals that humans are exposed to on a daily basis (Rogers et al 2013). Since the discovery of the adverse effects of these pollutants on wildlife and human health, different efforts have been studied for their removal, among them, the use of white-rot fungi and their enzymes have been promising alternatives. However, until now the potential of this enzymes has not yet found a real application, as the main drawbacks related to the application of enzymatic systems are the consumption and the destabilization of the biocatalysts during the process (Taboada et al 2011b).

Hence in this work the proposed strategy to achieve the removal of nonylphenol was analyzed by means of a reactor with a different configuration, a two-step membrane bioreactor. This reactor combines the advantages of an enzymatic membrane bioreactor with

those related to the utilization of a chemical oxidant to achieve the removal of the target pollutants. In this way, the degradation process can be divided into two independent processes, the first one related to the enzymatic production of the chemical oxidant, namely the Mn^{3+} ion (enzymatic reactor) and the second one corresponding to the oxidation of the pollutant by the Mn^{3+} ions (oxidation reactor).

Having two independent reactors represents a significant advantage from the practical point of view, since the operational conditions in each reactor can be optimized independently (Sasaki et al 2001). On the other hand, since the oxidation by Mn^{3+} is chemical in nature, the working parameters in the oxidation reactor do not have to be compatible with an active enzyme, which makes possible the utilization of high temperatures, adverse pH levels and even organic solvents to enhance the degradation process (Grabski et al 2000).

Regarding the performance of the reactors, our results in batch experiments are well comparable with those obtained with laccases from *Trametes versicolor* or with MnP from *Phanerochaete chrysosporium*, where 60 and 100% removal, respectively, was reported for nonylphenol at an initial concentration of 0.23 mM (50.68 mg l^{-1}) within 1 h (Tsutsumi et al 2001) and are better than those previously reported working with laccases of *Cerrena unicolor*, *Clavariopsis aquatic* or *Marasmius quercophilus* where 40, 22 and 37% removal, respectively, was reported for nonylphenol at concentrations of 50 μM (11 mg l^{-1}), 203 μM (44.7 mg l^{-1}) and 1.13 M (250 mg l^{-1}), respectively (Songulashvily et al 2012; Junghanns et al 2005; Farnet et al 2011). However, our removal values were inferior to those obtained with free VP from *Bjerkandera adusta*, where 100% removal was obtained at a nonylphenol concentration of 10 mg l^{-1} within 10 min (Taboada et al 2011a).

Generally, it is difficult to compare the results obtained in the two-step membrane bioreactor with those in literature as this methodology is applied for the first time to the degradation of nonylphenol, besides that, there are only few studies dealing with the continuous elimination of nonylphenol in enzymatic reactors and also working with real STP effluents containing environmental concentrations of the pollutant. However, our results are well comparable with those obtained in a fluidized bed reactor with cross-linked laccase aggregates (CLEAs) as the biocatalyst, where 90% removal from a 5 mg l^{-1} solution was reported for nonylphenol at

a residence time of 50 min (Cabana et al 2007b), or with those obtained in a packed-bed bioreactor inoculated with a mixed bacterial culture and treating a saturated solution of nonylphenol where a removal rate of 43 mg l⁻¹·d was observed (Soares et al 2006).

On the other hand, our results are better than those previously reported working with *Pseudomonas* sp, where the highest rate of degradation of nonylphenol was found to be 4.4 mg l⁻¹·d (Soares et al 2003) compared to 35.8 mg l⁻¹·d obtained in our system.

Substrate concentration often has great influence on the reaction rate, because of that, the relationship between substrate concentration and reaction rate is usually studied in bioremediation design (Lu et al 2008). As can be observed most research work on nonylphenol degradation has been done working with concentrations of the compound above the environmental ones, this is an important disadvantage since the application of new technologies depends on its performance over real conditions. Hence in this work we analyze the removal of the compound working with different concentrations among the most reported in literature and also utilizing a real sewage treatment plant effluent to simulate real polluted water.

5. Conclusions

In the present study, we report the nonylphenol degradation by a two-step membrane bioreactor with VP of *Bjerkandera* sp. as the biocatalyst. The results showed that nonylphenol was readily removed under the tested conditions giving to a removal rate of 1.49 mg l⁻¹·h working at an HRT of 3.6 min.

To the best of our knowledge, this is the first time that such a methodology is applied to the continuous removal of nonylphenol at environmental concentrations and using a real STP effluent. Since the proposed strategy shows significant advantages compared to other more conventional enzymatic reactors, these findings have significant implications in terms of the development of a new technology for the treatment of this kind of pollutants.

6. References

Ahel M, Giger W, Koch M (1994) Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Water Research* 28: 1131-1142

Cabana H, Jiwan JLH, Rozenberg R, Elisashvili V, Penninckx M, Agathos SN, Jones JP (2007a) Elimination of endocrine disrupting chemicals nonylphenol and bisphenol A and personal care product ingredient triclosan using enzyme preparation from the white rot fungus *Coriolopsis polizona*. *Chemosphere* 67: 770–778

Cabana H, Jones JP, Agathos SN (2007b) Preparation and characterization of cross-linked laccase aggregates and their application to the elimination of endocrine disrupting chemicals. *Journal of Biotechnology* 132: 23–31

Catapane M, Nicolucci C, Menale C, Mita L, Rossi S, Mita DG, Diano N (2013) Enzymatic removal of estrogenic activity of Nonylphenol and Octylphenol aqueous solutions by immobilized laccase from *Trametes versicolor*. *Journal of Hazardous Materials* 248–249: 337–346

Chen HW, Liang CH, Wu ZM, Chang EE, Lin TF, Chiang PC, Wang GS (2013) Occurrence and assessment of treatment efficiency of nonylphenol, octylphenol and bisphenol-A in drinking water in Taiwan. *Science of the Total Environment* 449: 20–28

Chen ML, Chang CC, Shen YJ, Hung JH, Guo BR, Chuang HY, Mao IF (2008) Quantification of prenatal exposure and maternal-fetal transfer of nonylphenol. *Chemosphere* 73: S239–S245

Farnet AM, Chevremont AC, Gil G, Gastaldi S, Ferre E (2011) Alkylphenol oxidation with a laccase from a white-rot fungus: Effects of culture induction and of ABTS used as a mediator. *Chemosphere* 82: 284–289

Grabski AC, Grimek HJ, Burgess RR (2000) Immobilization of manganese peroxidase from *Lentinula edodes* and its biocatalytic generation of MnIII-chelate as a chemical oxidant of chlorophenols. *Biotechnology and Bioengineering* 60: 204-215

Jones OHA, Green PG, Voulvoulis N, Lester JN (2007) Questioning the excessive use of advanced treatment to remove organic micropollutants from wastewater. *Environmental Science & Technology* 41: 5085-5089

Junghanns C, Moeder M, Krauss G, Martin C, Schlosser D (2005) Degradation of the xenoestrogen nonylphenol by aquatic fungi and their laccases. *Microbiology* 151: 45–57

Kim J, Korshin GV, Velichenko AB (2005) Comparative study of electrochemical degradation and ozonation of nonylphenol. *Water Research* 39: 2527–2534

Kitis M, Adams CD, Daigger GT (1999) The effects of Fenton's reagent pretreatment on the biodegradability of nonionic surfactants. *Water Research* 33: 2561–2568

Li X, Luan T, Liang Y, Wong M, Lan C (2007) Distribution patterns of octylphenol and nonylphenol in the aquatic system at Mai Po Marshes Nature Reserve, a subtropical estuarine wetland in Hong Kong. *Journal of Environmental Sciences* 19: 657–662

Lloret L, Eibes G, Feijoo G, Moreira MT, Lema JM (2012) Continuous operation of a fluidized bed reactor for the removal of estrogens by immobilized laccase on Eupergit supports. *Journal of Biotechnology* 162: 404–406

Lu J, Jin Q, He Y, Wu J, Zhang W, Zhao J (2008) Biodegradation of nonylphenol polyethoxylates by denitrifying activated sludge. *Water Research* 42: 1075–1082

Maletz S, Floehr T, Beier S, Klumper C, Brouwer A, Behnisch P, Higley E, Giesy JP, Hecker M, Gebhardt W, Linnemann V, Pinnekamp J, Hollert H (2013) In vitro characterization of the effectiveness of enhanced sewage treatment processes to eliminate endocrine activity of hospital effluents. *Water Research* 47: 1545–1557

Martínez, AT (2002) Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme and Microbial Technology*, 30: 425–444.

Mester T, de Jong E, Field JA (1995) Manganese regulation of veratryl alcohol in white rot fungi and its indirect effect on lignin peroxidase. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1881–1887

Palma C, Martínez AT, Lema JM, Martínez MJ (2000) Different fungal manganese-oxidizing peroxidases: a comparison between *Bjerkandera* sp. and *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biotechnology* 77: 235–245

Planas C, Guadayol JM, Droguet M, Escalas A, Rivera J, Caixach J (2002) Degradation of polyethoxylated nonylphenols in a sewage treatment plant. Quantitative analysis by isotopic dilution-HRGC/MS. *Water Research* 36: 982–988

Pozdnyakova NN, Nikiforova SV, Turkovskaya OV (2010) Influence of PAHs on ligninolytic enzymes of the fungus *Pleurotus ostreatus* D1. *Central European Journal of Biology* 5: 83-94.

Rodríguez I, Quintana JB, Carpinteiro J, Carro AM, Lorenzo RA, Cela R (2003) Determination of acidic drugs in sewage by gas chromatography-mass spectrometry as tert-butylmethylsilyl derivatives. *Journal of Chromatography* 985: 265-274

Rogers JA, Metz L, Yong VW (2013) Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: A focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. *Molecular Immunology* 53: 421–430

Sasaki T, Kajino T, Li B, Sugiyama H, Takahashi H (2001) New pulp biobleaching system involving manganese peroxidase immobilized in a silica support with controlled pore sizes. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2208–2212

Soares A, Guieysse B, Delgado O, Mattiasson B (2003) Aerobic biodegradation of nonylphenol by cold-adapted bacteria. *Biotechnology Letters* 25: 731–738

Soares A, Guieysse B, Jefferson B, Cartmell E, Lester JN (2008) Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International* 34: 1033–1049

Soares A, Murto M, Guieysse B, Mattiasson B (2006) Biodegradation of nonylphenol in a continuous bioreactor at low temperatures and effects on the microbial population. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69: 597–606

Solé M, López de Alda MJ, Castillo M, Porte C, Ladegaard-Pedersen K, Barceló D (2000) Estrogenicity determination in sewage treatment plants and surface waters from the Catalanian area (NE Spain). *Environmental Science and Technology* 34: 5076-5083.

Songulashvili G, Jimenez-Tobon G, Jaspers C, Penninckx MJ (2012) Immobilized laccase of *Cerrena unicolor* for elimination of endocrine disruptor micropollutants. *Fungal Biology* 116: 883-889

Soto AM, Justicia H, Wray JW, Sonnenschein C (1991) *p*-nonyl-phenol: An estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environmental Health Perspectives* 92: 167-173

Taboada-Puig R, Junghanns C, Demarche P, Moreira MT, Feijoo G, Lema JM, Agathos SN (2011a) Combined cross-linked enzyme aggregates from versatile peroxidase and glucose

oxidase: Production, partial characterization and application for the elimination of endocrine disruptors. *Bioresource Technology* 102: 6593–6599

Taboada-Puig R, Lu-Chau T, Eibes G, Moreira MT, Feijoo G, Lema JM (2011b) Biocatalytic generation of Mn(III)-Chelate as a chemical oxidant of different environmental contaminants. *Biotechnology Progress* 27: 668-676

Tsutsumi Y, Haneda T, Nishida T (2001) Removal of estrogenic activities of bisphenol A and nonylphenol by oxidative enzymes from lignin-degrading basidiomycetes. *Chemosphere* 42: 271-276

Vazquez-Duhalt R, Marquez-Rocha F, Ponce E, Licea AF, Viana MT (2005) Nonylphenol, an integrated vision of a pollutant. *Applied Ecology and Environmental Research* 4: 1-25

Wariishi H, Valli K, Gold MH (1992) Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, Kinetic mechanism and role of chelators. *Journal of Biological Chemistry* 267: 23688-23695
