SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DIRECCIÓN GENERAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR TECNOLÓGICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

INGENIERÍA BIOQUÍMICA

PRESENTA:

INTERIANO SANTOS ERIKA CITLALY

NOMBRE DEL PROYECTO:

"APLICACIÓN DE MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS EN EL BIOTRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES"

LUGAR DE REALIZACIÓN:

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL (CINVESTAV-IPN)

NOMBRE DE ASESORES:

INTERNO:

DR. JOSÉ HUMBERTO CASTAÑON GONZÁLEZ

EXTERNO:

DRA. REFUGIO RODRÍGUEZ VÁZQUEZ

Contenido

Contenido…….. II
Lista de tablas …….. IV
Lista de figuras……... IV
1. Introducción…… 1
2. Justificación…… 3
3. Objetivos……..... 4
4. Caracterización del área…….. 5
5. Problemas a resolver…… 7
6. Alcances y limitaciones…… 8
7. Marco teórico……..... 9
7.1. Proceso textil……. 9
7.2. Colorantes…….. 10
7.2.1. Clasificación de los colorantes……. 11
7.2.2. Azul de Metileno…… …… 12
7.3. Tratamiento de los efluentes de la industria textil…….…….. 14
7.3.1. Tratamiento biológico…….. 16
7.3.2. Paja de cebada…… 17
8. Materiales y métodos……... 18
8.1. Microorganismos……... 18
8.2. Soportes……..... 18
8.3. Colorante……..... 18
8.4. Sistema en columna de burbujeo……..... 19
8.4.1. Inmovilización en paja…… 19
8.4.2. Inoculación…….. 19
8.4.3. Cinética del sistema de columna de burbujeo..…… 19
8.4.4. Determinación de la actividad de la enzima G.O……. 19
8.4.5. Determinación de azucares totales por el reactivo de antrona……. 20
8.4.6. Determinación de proteína total por el método de Bradford……... 21
8.4.7. Determinación de reducción de colorante……..…….. 21
8.5. Sistema en matraces con relación C:N:P 100:10:1…… 22
8.5.1. Inmovilización en paja…….. 22
8.5.2. Inoculación…….. 22
8.5.3. Cinética de sistema en matraces…… 22
8.5.4 Determinación de peróxido de hidrógeno…… 23
8.6. Diseño experimental Plackett Burman…… 23
8.6.1. Inmovilización del inoculo en cubos de poliuretano……... 25
8.6.2. Determinación de ácidos orgánicos……. 25
9. Resultados y discusiones……... 26
9.1. Resultados de las determinaciones en columnas de burbujeo…… 26
9.1.1. Actividad específica enzimática de glucosa oxidasa……. 26
9.1.2. Resultados de proteína total…….. 27
9.1.3. Resultados azucares totales…….. 27

9.1.4. Reducción de color..……. 28
9.1.5. Relación del comportamiento de los parámetros obtenidos…….. 32
9.2. Sistema en matraces con relación C:N:P 100:10:1…… 33
9.2.1. Actividad específica enzimática de glucosa oxidasa……. 33
9.2.2. Determinación de proteína total……. 34
9.2.3. Determinación de azucares totales……... 35
9.2.4. Determinación de pH……. 36
9.2.5. Reducción de color…… 37
9.2.6. Relación entre parámetros……... 39
9.3. Diseño Plackett-Burman definido…….. 42
9.3.1. Producción de ácido oxálico y pH…….. 42
9.3.2. Reducción de colorante…… 43
10. Conclusiones y recomendaciones…… 46
11. Bibliografía…….. 47
12. Anexos……. 50
Anexo A. Curva patrón glucosa oxidasa…… 50
Anexo B. Curva patrón proteína total……. 50
Anexo C. Curva patrón azucares totales…… 51
Anexo D. Curva patrón peróxido de hidrógeno……. 51
Anexo E. Curva patrón color…… 52
Anexo F. Cromatogramas de ácidos orgánicos…… 53

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición química proximal de la paja de cebada (Adata *et. al*. 2009)…… 18
Tabla 2. Matriz codificada para Plackett- Burman……. 24
Tabla 3. Variables del diseño…… 24
Tabla 4. pH final y Ac. Oxálico a los tres días de cultivo para cada uno de los diferentes medios de cultivo del diseño Plackett-Burman……. 42

LISTA DE FIGURAS

Figura 7.1. Clasificación química de los colorantes…….. 11
Figura 7.2. Estructura del azul de metileno……. 13
Figura 9.1 Actividad específica de Glucosa Oxidasa…… 26
Figura 9.2 concentración de proteína extracelular……. 27
Figura 9.3. Determinación azúcares totales…… 28
Figura 9.4. Remoción del colorante azul de metileno…….. 29
Figura 9.5. Biorreactores de tratamiento a distintas horas del experimento; 0 h sin colorante, 24 h con adición de colorante……..…… 29
Figura 9.6. Biorreactores control a distintas horas del experimento; 0 h sin colorante, 24 h con adición de colorante…….. 30
Figura 9.7. Barrido espectrofotométrico del tratamiento a las 12, 24 y 32 horas…… 31
Figura 9.8. Barrido espectrofotométrico del control a las 12, 24 y 32…….. 31

Figura 9.9 Relación del comportamiento de los parámetros obtenidos….. 32
Figura 9.10 Actividad específica de glucosa oxidasa en función del tiempo……. 34
Figura 9.11 Proteína total extracelular en función de tiempo…….. 35
Figura 9.12 Azúcares totales en función del tiempo……. 36
Figura 9.13 pH en función del tiempo……. 37
Figura 9.14 Concentración de colorante en función de tiempo…….. 38
Figura 9.15. Tratamiento sin filtrar y filtrado…… 38
Figura 9.16 Peróxido de hidrógeno, G.O. y G.O específica en función del tiempo……. 39
Figura 9.17 Proteína total, G.O. específica y azucares en función del tiempo…… 40
Figura 9.18 Colorante, proteína total, peróxido de hidrógeno y G.O. específica en función de tiempo……. 41
Figura 9.19 Concentración de colorante no removido biológicamente…… 44
Figura 9.20 Día inicial del experimento con 20 ppm de azul de metileno……. 44
Figura 9.21 Degradación final (tercer día) del azul de metileno…… 45

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los retos más importantes para el ser humano es desarrollar un método eficiente que le ayude a controlar la contaminación ambiental. En la actualidad vivimos en un mundo 100% industrializado, lo que provoca mayor contaminación y a la vez escasez de agua.

Una de las industrias que realiza mayores descargas de aguas residuales es la industria textil; por el proceso y porque existe una mayor demanda de sus productos. El volumen y la composición de los efluentes de la industria textil son de los más contaminantes en todos los sectores industriales (Fitzgerald y Bishop, 1995).

Una fracción importante de los contaminantes liberados al ambiente en los efluentes de este giro industrial son los residuos de los colorantes. Por lo regular los colorantes textiles tienen gran persistencia en el ambiente y los métodos de tratamiento clásicos no son eficientes en su remoción debido a que las reacciones de oxidación o reducción parcial pueden generar productos secundarios altamente tóxicos (Mansilla *et al*., 2001).

Una gran porción de los colorantes no son directamente tóxicos para los organismos vivos. Sin embargo, la fuerte coloración que imparten a los medios de descarga pueden llegar a suprimir los procesos fotosintéticos en el curso del agua, que a lo largo del tiempo pueden agotar el oxígeno disuelto en la misma, por lo que su presencia debe de ser controlada, (Sankar *et al*., 1999).

Estos problemas han generado una gran preocupación, pues son muchas las actividades que el hombre realiza, las cuales generan desechos que han ido alterando el equilibrio ecológico y agotando los recursos naturales, (Neill *et al*., 1999).

Actualmente, para disminuir los efectos sobre el medio ambiente se están haciendo uso de procesos biotecnológicos entre los cuales se encuentran la aplicación de hongos. Teniendo en cuenta que las investigaciones no sólo se han enfocado a la remoción de colorantes si no en disminuir la toxicidad de los colorantes y los productos intermediarios que se producen en su degradación, (Manzano *et al*., 2004).

En este trabajo se evaluó la capacidad de remoción empleando a la paja de cebada como soporte lignocelulósico para los microorganismos asociados al grano de café y así reducir el colorante azul de metileno de un agua residual sintética, para lo cual se evaluaron varios factores con el fin de maximizar la decoloración y el proceso, así se determinó la actividad de la enzima glucosa oxidasa implicada en la producción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y en el proceso de decoloración.

2. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad la problemática del abastecimiento de agua ha ido en aumento, es por ello que las empresas se ven obligadas a reutilizar dichos efluentes o en su defecto descárgalos a cuerpos de aguas con la mínima cantidad de contaminantes, de manera que no afecte a los ecosistemas.

Los efluentes producidos por estas industrias durante la fabricación de sus telas presentan un alto valor de DBO, sólidos suspendidos, color y la presencia de algunos metales pesados. Debido a ello se han implementado tratamientos que suelen ser eficientes, pero muy costosos debido a los materiales e instrumentos que utilizan.

El uso de microorganismos es una alternativa en el tratamiento de los residuales, ya que estos poseen un sistema enzimático con capacidad de degradar dichos compuestos; por lo que representan, una alternativa y es una solución a los problemas que presentan otros métodos de tratamiento, puesto que no generan compuestos intermediarios tóxicos, además de disminuir el color del agua. También es de importancia al utilizar soportes como las pajas, debido a que son soportes de fácil disponibilidad, son económicos y aportan nutrientes, en particular la fuente de carbono (celulosa y hemicelúlosa), que contribuyen a una mayor actividad metabólica y por ende a una mayor decoloración.

Por tal motivo en este trabajo, se pretendió tener una considerable degradación del colorante textil, por los microorganismos asociados al grano del café en soporte de paja de cebada.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el potencial de materiales lignocelulósicos, como alternativa a la decoloración del azul de metileno.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1.- Evaluar la eficiencia de la columna de burbujeo mediante la decoloración de agua.

2.- Evaluar la eficiencia del sistema en matraces mediante la decoloración del agua.

3.- Determinar la presencia de la enzima glucosa oxidasa y su posible relación en la decoloración del azul de metileno.

4. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA.

Este proyecto de residencia fue realizado en el laboratorio de compuestos Xenobióticos del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y Estudios avanzados, (CINVESTAV) ubicado en Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. San Pedro Zacatenco.

Es un organismo público descentralizado con personalidad jurídica y patrimonio propios. Su director fundador, el Dr. Arturo Rosenblueth, impulsó una exigencia académica que ha resultado en el éxito de la institución. Se cuenta con veintiocho departamentos de investigación que se encuentran distribuidos por los nueve planteles a lo largo de la República Mexicana.

Misión y Visión.

Misión: Contribuir de manera destacada al desarrollo de la sociedad mediante la investigación científica y tecnológica de vanguardia y la formación de recursos humanos de alta calidad.

Visión: Ser la institución líder en la formación de investigadores de alto nivel y generación de conocimiento científico y tecnológico de frontera, con un creciente impacto nacional e internacional que contribuya en forma visible y relevante a la solución de problemas del país ampliando nuestra presencia en la sociedad y en la cultura contemporánea.

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería.

El Departamento se localiza en la parte posterior del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav) que ocupa un área de 55 hectáreas de jardines arbolados. El edifico de Biotecnología y Bioingeniería, de 3000 m^2, fue construido en 1976 y ha sido constantemente renovado desde entonces. Cada uno de los 20 laboratorios cuenta con todo el equipo necesario para realizar investigación. Adicionalmente, se cuenta con laboratorios comunes tales como: laboratorio Analítico, laboratorio de Alimentos, laboratorio de Fermentaciones, laboratorio de Radiactividad, laboratorio de Proteínas, cuartos fríos e invernaderos.

La misión del departamento es formar investigadores y recursos humanos de alto nivel, que promuevan la educación e investigación en el área Biotecnológica.

5. PROBLEMAS RESOLVER.

Los problemas de la contaminación de agua son muy importantes y muchos de los tratamientos empleados son muy caros, es por ellos que en la actualidad se apuesta por la incursión en el empleo de un sistema sustentable para la degradación de los contaminantes del agua.

Este proyecto tuvo como finalidad la optimización el sistema de degradación de colorante Azul de Metileno, mediante; hongos del grano de café inmovilizados en el material lignocelúlosico (paja de cebada) para llevar a cabo la degradación a través de las enzimas que propician la formación de peróxido de hidrogeno.

Por lo que se realizaron las pruebas, para con ello poder identificar si el material lignocelúlosico puede ser funcional para este tipo de sistemas, los cuales dieron las bases para poder evaluar otros experimentos, en el cual se determinó el contenido de nutrientes; así como también, se encontró el siguiente problema a resolver, que es la forma de inmovilización, pues por ellos se variaron las formas y el uso de un soporte inerte.

6. Alcances y limitaciones

Alcances:

En la investigación realizada se logró identificar la actividad de la enzima glucosa oxidasa ya que se contaban con los reactivos necesarios para su realización; solo se utilizó paja de cebada debido a si fácil disponibilidad.

Limitaciones:

Dentro de las limitaciones que se presentaron para desarrollar el proyecto se encuentran la disponibilidad del material para trabajar como fue la paja de trigo que no pudo ser conseguida puesto que no era tiempo de cosecha, de igual forma no se pudieron determinar dos enzimas más que son endo y exo glucanasa ya que no se contaban con los reactivos necesarios para su análisis.

Otra limitante estuvo en algunos instrumentos; ya que no sólo fue usado para realizar este trabajo, sino que es de uso común para todos los integrantes del laboratorio, lo cual afectó el tiempo de realización de la presente investigación.

7. MARCO TEÓRICO

7.1 Proceso Textil

La industria textil contribuye con un 3% de las descargas industriales de agua en México. Teniendo el séptimo lugar en la contaminación de agua.

Las operaciones del proceso textil difieren de una fábrica a otra, según el tipo de fibra empleada, clase de hilaza, colorante, tela a producir y clase de maquinaria disponible, pero en general, el proceso comprende las siguientes etapas básicas, preparación de la fibra natural o artificial, hilatura, tejido (plano, punto, no tejido), limpieza, blanqueo, teñido, acabado (mecánico ó químico) (Quintero, 2007), (Fundes, 2001).

En este proceso la industria textil consume grandes cantidades de agua debido a los químicos que se usan en el proceso; siendo sus aguas más difíciles de tratar.

Estos efluentes llevan consigo:

-Concentraciones altas de colorantes

-Contaminantes orgánicos refractarios

-Componentes inhibidores

-Tensoactivos

-Componentes clorados

Todos estos contaminantes son importantes en cuanto su depuración de los efluentes, pero los que marcan un impacto mayor son los colorantes.

7.2. Colorantes

Una de las características más comunes de la sociedad moderna ha sido el desarrollo de compuestos sintéticos con la capacidad de tener una vida útil larga dentro de los procesos industriales, esta característica perdura en las aguas residuales, que pueden contener una gran variedad de contaminantes (Levin y Gealt, 1997).

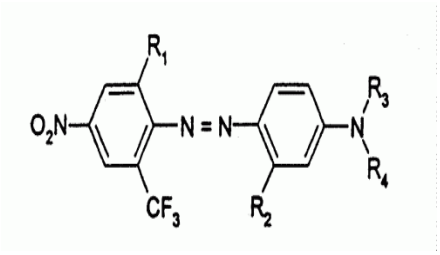
Por lo regular los colorantes textiles tienen gran persistencia en el ambiente y los métodos de tratamiento clásicos no son útiles en su remoción, debido a que las oxidaciones o reducciones parciales pueden generar productos secundarios altamente tóxicos (Mansilla *et al.*, 2001).

Los colorantes son sustancias orgánicas fluorescentes o de color intenso que imparten color a una sustancia incolora o bien a un sustrato por medio de una absorción selectiva de luz dentro de las longitudes de onda del espectro electromagnético (Abdula *et al.*; 2010). El compuesto está constituido por tres grupos funcionales; el cromóforo, que es el grupo responsable de la adsorción de la luz dándole propiedad de color al compuesto, los auxocromos, que le dan la afinidad por la fibra e intensifican el color y por último el solubilizador, que le da afinidad a diversos solventes y está dado por la presencia de iones como; $-SO_3Na^+$, $-NH_3Cl^-$, $-SO_2NH_2^+$, ONa^+, (Antonella *et al*., 2009).

7.2.1. Clasificación de los colorantes.

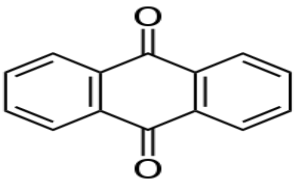
Industrialmente los colorantes poseen una estructura química compleja, entre y con diferentes grupos funcionales como lo son los de tipo azo, diazo, antraquinonas y compuestos metálico, los cuales generalmente se aplican como mezclas. Según sus propiedades pueden ser clasificados en ácidos, básicos, reactivos o directos (Fiezer 2010).

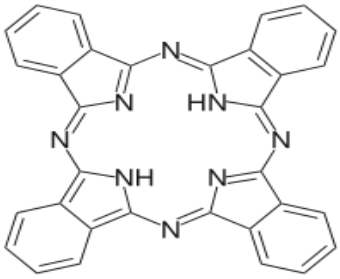
La referencia más importante acerca de la clasificación de los colorantes y pigmentos es de *Colour Index*, publicado por "*The society of dyers and colourists*". En esta publicación los colorantes y pigmentos se clasifican de acuerdo a su estructura química como; azo (-N=N-); carbonil (C=O), (incluyendo antraquinonas), ftalocianinas, diversas clases químicas de colorantes orgánicos (colorantes polienos y polimetinos, colorantes con ion arilcarbonilo (incluyendo trifenilmetinas), dioxinas, (azufre y nitroquímicas) (Christie, 2001).



Grupo azoico

Grupo Carbonil





Grupo ftaniacinas

Grupo Dioxinas

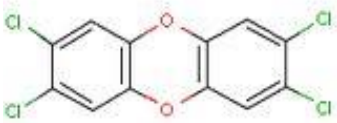


Figura 7.1. Clasificación química de los colorantes

Estos colorantes sintéticos son caracterizados por su resistencia a la luz, lavado y al ataque microbiano, haciéndolos atractivos y funcionales para la industria, pero dando lugar a compuestos no biodegradables. Sin embargo esta persistencia del color en las aguas residuales representa uno de los mayores problemas ambientales, ya que la concentración de colorante en cuerpos receptores puede ser mayor a la de cualquier otro compuesto tóxico permitido por la legislación y sin embargo, ser muy “notoria” su presencia. Además, que puede colorear el suelo y la vegetación circundante a los cuerpos receptores, muchas veces terrenos fértiles utilizados para agricultura y la ganadería (Manrique, 1999).

En México en la NOM-001-ECOL-93 y NOM-014-ECOL-93, se listaba y se tenían considerados los colorantes provenientes de la industria textil, así como las materias primas y residuos resultados de la manufactura de pinturas, como pueden ser los disolventes y secantes, entre otros (Cortinas y Vega, 1993). Actualmente la regulación donde se establecen los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales se encuentra en la NOM-001-ECOL-1996.

7.2.2. Azul de metileno

Este colorante tiene forma de cristales o polvo cristalino, presenta un color verde oscuro, con brillo bronceado. Es Inodoro y estable al aire, sus disoluciones en agua o en alcohol son de color azul profundo. Es fácilmente soluble en el agua y en cloroformo; también es moderadamente soluble en alcohol. Se emplea en el estampado y tinte de la seda algodón de diferentes tonos de color. (Restrepo, 2007).

Es un colorante aromático heterocíclico, un miembro de los colorantes de tiazina. Se utiliza ampliamente en los diferentes campos de la biología, la medicina, la química y la industria. En biología, el azul de metileno, se utiliza como colorante para un número de diferentes procedimientos de tinción.

También se puede utilizar como un indicador para determinar si las células (tales como levadura) están vivos o no. También se utiliza ampliamente en la medicina por sus propiedades antisépticas

El uso del azul de metileno como colorante en la industria textil, ha disminuido ligeramente en los últimos años, debido a su alta sensibilidad a la luz. Sin embargo, todavía es ampliamente utilizado para la fabricación de lápices de colores y tintas poligráficos.

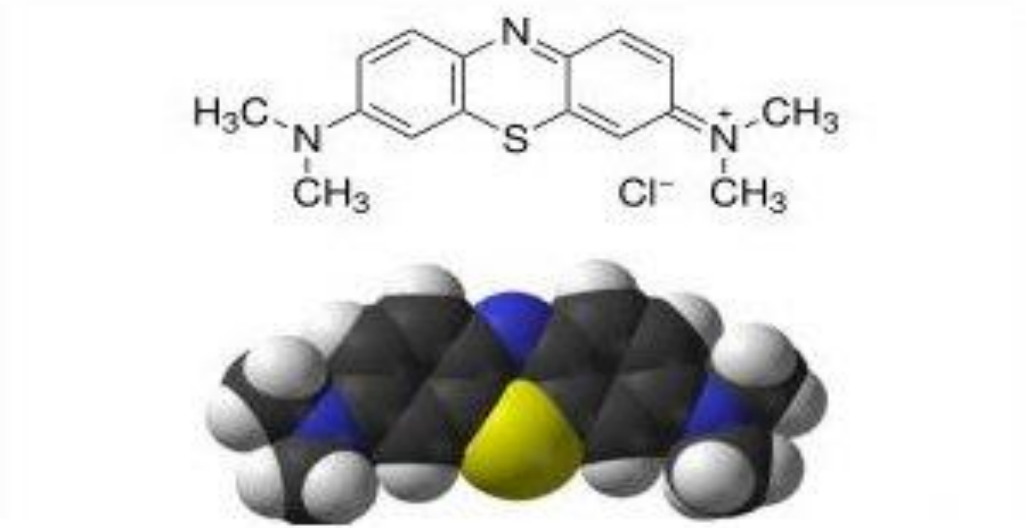


Figura 7.2. Estructura de azul de Metileno

7.3. Tratamiento de los efluentes de la industria textil

El color puede ser removido de aguas residuales por métodos físico-químicos que incluyen: absorción, coagulación-floculación, oxidación y métodos electroquímicos (Epp, 1995; Prideaux, 2004). Aunque unos estudios reportan altas eficiencias de remoción de color por los métodos anteriores (Sen y Demirer, 2003), otros los reportan como costosos, con problemas de operación y generación de grandes cantidades de lodo (Epp, 1995; Prideaux, 2004).

Los tratamientos utilizados para la eliminación de los colorantes (Ramalho, 1996) son:

1. **Tratamientos primarios:**

Este método se emplea para la eliminación de colorantes en suspensión empleando técnicas como la sedimentación.

2. **Tratamientos secundarios:**

Comprende tratamientos biológicos en los que los microorganismos sintetizan enzimas capaces de superar la resistencia a la degradación de los colorantes. Dentro de los cuales se tienen:

Tratamientos aerobios

1. Lodos activados
2. Lagunas aireadas
3. Lagunas de estabilización de aguas residuales.
4. Filtros rociadores
5. Biodiscos (CBR, Contacto Biológico Rotatorio)

Tratamientos anaerobios.

En este tratamiento los productos finales de la degradación son gases, como el metano, CO_2 y pequeñas cantidades de sulfuro de hidrógeno, mercaptano e hidrogeno, en el caso de los colorantes aromáticos como es caso de los azo y se tiene evidencia de que la reducción de estos colorantes origina aminas que son más tóxicas que el colorante original (Swamy y Ramsay, 1999; Field, 1999).

3. Tratamientos terciarios

Se conoce también como tratamiento avanzado, es la serie de procesos destinados a conseguir una calidad del efluente superior a la del tratamiento secundario convencional.

1. Eliminación de sólidos en suspensión
2. Adsorción
3. Proceso de oxidación química
4. Fotodegradación
5. Osmosis inversa

En los últimos años, existe una tendencia a los tratamientos biológicos, por sus bajos costos de capital y de operación, viabilidad para el tratamiento de efluente y su capacidad para reducir DBO y DQO, comparados con los tratamientos químicos (Chemmatters, 1986; Kornaros y Lyberatos, 2006; Sandberg, 1989).

Los sistemas de tratamiento que utilizan microorganismos son capaces de degradar los tintes recalcitrantes, hasta mineralizarlos. La efectividad de estos tratamientos depende de la supervivencia y adaptabilidad de los microorganismos durante el proceso de tratamiento.

A pesar de que los procesos químicos y físicos producen efluentes de calidad aceptable, en la mayoría de las ocasiones generan un alto costo. Mientras que los tratamientos biológicos resultan ser más económicos ya que requieren de materia prima menos costosa y se trabaja con recursos que en muchos casos resultan ser residuos de otras actividades (Moeller and Garzón, 2003).

7.3.1. Tratamientos biológicos.

La biodegradación se emplea para el proceso en el que los seres vivos alteran la estructura molecular de los compuestos químicos del medio para su manutención (Madigan *et al.,* 1998).

Algunas técnicas de remediación emplean la degradación microbiana, la cual utiliza microorganismos como bacterias y hongos, fitorremediación que utiliza plantas, y la remediación a través de enzimas específicas. Los modos de biorremediación aplicados a la decoloración de colorantes incluyen mezclas de cultivos, organismos aislados y enzimas aisladas presentes en los microorganismos (Kandelbauer y Guebitz, 2005). Ellas causan la separación de anillos (Smith, 1990, Berry, 1987, Commandeur y Parsons, 1990).

La utilización de comunidades microbianas lleva a que la decoloración de los efluentes textiles puede ser el resultado de la sinergia de varios microorganismos (Mittal *et al.*, 2006, Nigam *et al.,* 1996b).

7.3.2 Paja de Cebada

Lo residuos lignocelúlosico tienen como principal componente el material celulósico que es una fuente importante carbono y de energía y se han utilizado como materia prima en otros procesos de interés, tales como: producción de papel, lignosulfatos, composta y de alcohol (Rodríguez, 1999).

El cultivo de los hongos en un medio sólido de origen lignocelúlosico ha sido preferentemente aplicado a hongos filamentosos, debido a que reúnen una serie de características que simulan el hábitat natural de éste y favorecen la generación de enzimas ligninolíticas (Rodríguez 1998).

Pajas y otros subproductos fibrosos son producidos inevitablemente ligados a diversos cultivos, en especial a los cereales. Son cosechados en función de la maduración de los granos y no por su valor nutritivo.

La importancia de la paja de cebada radica en primer lugar, en su disponibilidad debido a la superficie destinada al cultivo de cebada como grano para uso maltero, y en segundo lugar a su bajo costo.

Los principales estados productores en la región del Bajío son Guanajuato, Querétaro, Michoacán y Jalisco, mientras que en la región del Altiplano, la producción se concentra en los estados de Hidalgo, Puebla, Tlaxcala y Estado de México y en esta región, el 75% de las siembras de temporal ocurre en el verano (Solano *et al.,* 2008).

Tabla 1 Composición química proximal de la paja cebada (Adapa *et al.,* 2009).

Parámetro	%
Proteína	3.62
Lípidos	1.91
Almidón	0.11
Lignina	17.13
Celulosa	33.25
Hemicelulosa	20.36
Cenizas	2.18

8. Materiales y métodos

8.1 Microorganismos.

En todos los experimentos se emplearon microorganismos asociados al grano verde de café**;** proveniente del estado de Veracruz. El cual fue molido hasta obtener un tamaño de partícula de 0.86-2.0 mm.

8.2 Soporte

En los primeros dos experimentos se utilizó paja de cebada cortada de un centímetro de largo y para el tercer experimento se utilizaron cubos de poliuretano de 1cm x 1cm x 1cm.

8.3 Colorante

El colorante a usar fue Azul de Metileno en concentraciones de 10 y 20 ppm.

**Todas las muestras antes de ser analizadas fueron filtradas a través de un embudo buchner y matraz kitazato utilizando papel filtro de poro cerrado

8.4 Sistema en columnas de burbujeo

8.4.1 Inmovilización en paja

Esta inmovilización se llevó a cabo pesando 0.8 g del grano de café, el cual fue remojado por 24 horas, después de las veinticuatro horas se escurrió hasta quitar el exceso de agua. Se incubó a 28°C, al tercer día de incubación y se le agregaron a 0.8 g de paja previamente remojada por 24 horas. En total se incubó por 5 días.

8.4.2 Inoculación

A las columnas de burbujeo con 800 mL de agua destilada se les agregó el inóculo.

A las columnas de burbujeo “control” se les vertieron 0.8 g de grano de café y 0.8 g de paja estériles y los 800 mL de agua sin esterilizar. Los experimentos se realizaron bajo condiciones ambientales.

8.4.3 Cinética del sistema en columna de burbujeo

Se tomaron muestras a las 0, 8, 16, 24,48 y 56 horas, transcurridas 24 horas se les agregó el colorante a todas las columnas a una concentración de 20 mg/ L. A todas las muestras se les analizó la actividad enzimática de glucosa oxidasa, proteína total y azúcares totales. A partir de la hora 24 se determinó la remoción de color.

8.4.4 Determinación de actividad enzimática de Glucosa oxidasa

La glucosa es oxidada a D-glucono-δ-lactana y peróxido de hidrógeno por la GO. El peróxido de hidrógeno fue posteriormente utilizado para oxidar al sustrato cromogénico 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) en una segunda reacción con la peroxidasa de rábano (POD)

resultando en un cambio de color. La intensidad del color fue medida a 420nm, la cual es proporcional a la concentración de peróxido de hidrógeno. Una unidad de la enzima se define como la cantidad de enzima requerida para producir 1µmol de peróxido de hidrógeno por minuto bajo las condiciones estándares del ensayo.

Se agregaron en orden 630µL de ABTS-regulador, 320 µL de peroxidasa de rábano (5U/ml), 50 µL de glucosa (10mg/ml), para adicionar la muestra se dejaron intervalos de 60 segundos entre cada tubo subsecuente. Se leyó la absorbancia a 420nm en un espectrofotómetro UV-VIS Perkin Helmer, Lambda 3A utilizando celdas de cuarzo de 1 mL. La concentración de GO en las muestras se calculó a partir de una curva de calibración con valores comprendidos entre 0.00 y 0.010 U/mL.

8.4.5 Determinación de azúcares totales por reactivo de Antrona

El contenido de azúcares reductores es cuantificado por la hidrólisis de los polisacáridos en azúcares más simples por hidrolisis ácida y con ellos estimar los monosacáridos resultantes.

Para la cuantificación de azúcares totales a los tubos de ensaye se les añadió 1 mL de la muestra y se colocaron en hielo; se les adicionó 1 mL de ácido sulfúrico concentrado y se mezcló con Vortex suavemente, posteriormente se agregó 3 mL del reactivo Antrona previamente preparado y enfriado en hielo se mezcló con Vortex suavemente, los tubos son calentados en agua hirviendo entre (90-95 °C) durante 8 minutos. Se dejaron en hielo por 5 min, y posteriormente se procedió a leer la absorbancia a 630 nm en el espectrofotómetro UV-VIS Perkin Helmer, Lambda 3A utilizando celdas de cuarzo de 1 mL. Para posteriormente calcular la concentración obtenida a partir una curva de calibración con valores entre 0 µg/mL y 125 µg/mL.

8.4.6 Determinación de Proteína total por el método de Bradford

Esta determinación se basa en el acoplamiento del colorante azul de commassie (Blue G-250) a las proteínas y se determina colorimétricamente.

Para la prueba de proteína total por el método de Bradford se empleó 1 mL de muestra a la cual se le agrega 1mL del reactivo de Bradford y se mezcla por inversión. Se deja en reposo durante 15 minutos para posteriormente medir la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro. Para calcular la concentración se utilizó una curva de calibración.

8.4.7 Determinación de la reducción de colorante

Para determinar la remoción del colorante se realizó una curva patrón con agua destilada y azul de metileno con concentraciones de 5ppm hasta 0.5 ppm y se leyó la absorbancia a 664 nm. Previamente a una muestra de 20 ppm de azul de metileno se hizo un barrido espectrofotométrico de 200 a 700 nm en el cual nos dio un espectro de absorción en 664 nm.

El colorante que se quedaba en el papel filtro con el cual fue filtrada la muestra fue removido por medio de una solución 1:1 acetona y agua y sonicado por 40 minutos en un sonicador BRANSON 1510.

Al término de la toma de muestras se removió el colorante de la paja y también fue sumado para la concentración final del colorante.

En cada lectura se fueron haciendo barridos espectrofotométricos en un espectrofotómetro SHIMADZU UV-1800.

8.5 Sistema en matraces con relación de C: N: P 100:10:1

8.5.1 Inmovilización en paja

Se pesaron 0.160 g del grano de café, fue remojado por 24 horas, después de las veinticuatro horas se escurrió hasta quitar el exceso de agua. Se incubó a 28°C, al tercer día de incubación se le agregaron 0.160 g de paja previamente remojada por 24 horas. En total se incubó por 5 días.

8.5.2 Inoculación

Este experimento se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 500 mL a estos se les agregó glucosa, nitrógeno y fósforo en una relación 100:10:1, el control fue el grano de café estéril y paja estéril en 160 mL de agua estéril para este experimento fueron matraces con 160 mL de agua estéril, a uno de los controles se le agregó el colorante y al otro no.

A todos los matraces se les agregó el inoculó en una campana de flujo laminar.

8.5.3 Cinética de sistema en matraces

Se tomaron muestras a las 0,4,8,12,16,24,32,40,48,56,64,76,88 y 112 horas. En la hora 48 se les agregó el colorante a los matraces con inóculo a una concentración de 10 ppm y al control con colorante. A todas las muestras se analizó actividad enzimática de glucosa oxidasa, proteína total, azúcares totales y peróxido de hidrogeno. A partir de la hora 56 se determinó la remoción de color para cada muestreo.

Se midió la glucosa oxidasa, proteína total, reducción color, los azúcares totales por los métodos antes descritos, a estos tratamientos se le determinó el peróxido de hidrogeno.

8.5.4 Determinación de Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno es un compuesto reactivo y su concentración puede cambiar rápidamente cuando se añade al agua. La medición de las concentraciones debe determinarse con el tiempo.

Para ello fue necesario realizar una curva de calibración, la cual se hizo a partir de una solución patrón de 200 mg/L para preparar los estándares de 0.0 hasta 3.5 mg/L. Se colocó en tubos de ensaye 3 mL del reactivo A (solución de yoduro de potasio, NaOH y molibdato de amonio), después se añadió 3 mL del reactivo B (solución de biftalato de potasio), para posteriormente adicionar 3 mL de la muestra. Se agitó el contenido y se dejó reaccionar por 5 minutos, se leyó la absorbancia a 351 nm en un espectrofotómetro SHIMADZU UV-1800.

8.6 Diseño experimental Plackett Burman

El diseño Plackett Burman implementado para este experimento se estableció la adición de diferentes nutrientes así como la variación de los días de inmovilización y el número de cubos como se muestra en la tabla 1.

Todos los tratamientos se llevaron a cabo en matraces de 125 mL.

Tabla 2. Matriz codificada para Plackett Burman

Tratamientos	A	B	C	D	E	F	G
1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
2	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1
3	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1
4	+1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
5	-1	+1	-1	-1	+1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1	-1	+1	+1
7	+1	+1	-1	+1	-1	-1	+1
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

*Nota: **A=** Inmovilización (días) **B**= $C_6H_{12}O_6$ **C=**$C_{12}H_{22}O_{11}$ **D=** No.Cubos **E=** Fuente de N. **F=**KH_2PO_4 **G=** $FeSO_4$. H_2O **Valores codificados=** (+) nivel alto, (-) nivel bajo.

Variables del diseño:

Tabla 3. Variables del diseño

Compuesto	(+1)	(-1)
Inmovilización(días)	3	1
$C_6H_{12}O_6$ (g/L)	2	1
$C_{12}H_{22}O_{11}$ (g/L)	2	1
No. Cubos	6	3
Fuente de N.	$(NH_4)_2SO_4$	$(NH_4)_2PO_4$
KH_2PO_4 (g/L)	1.0	0.5
$FeSO_4.H_2O$ (mg/L)	3	1

8.6.1 Inmovilización del inoculo en cubos de poliuretano

Preparación del inóculo

Se colocaron 3 gramos de café y se adiciono 700 µL de agua destilada por gramo de café, (40% de capacidad de campo) se incubó por 6 días a 28 °C.

Para la inmovilización se pesaron aproximadamente 1g de inóculo antes preparado y se adicionó a 10ml de solución tween al 0.1%. Se mezcló en un vortex para homogenizar la suspensión de esporas, las cuales se separaron en una malla para un mejor manejo de la suspensión. Se realizó el conteo de esporas hasta obtener una suspensión con $5x10^6$ esporas/ml en Cámara de Neubauer. Se homogenizó y se adicionaron 4 ml de suspensión de esporas al medio wunder (100ml). Se agregaron 30 cubos de poliuretano estériles a 40 ml del medio de crecimiento wunder, se dejó en agitación a 120rpm a 28°C por uno o tres días según el diseño.

La inoculación de los matraces con los diferentes tratamientos se llevó a cabo en una campana de flujo laminar, agregando los cubos según el diseño de experimentos antes descrito.

Para este diseño experimental fueron analizados para cada muestra ácidos orgánicos esperando obtener acido oxálico.

8.6.2 Determinación de ácidos orgánicos

Para la determinación de ácidos orgánicos en este caso ácido Oxálico se tomaron 10 mL de muestras previamente filtrado en papel filtro de poro cerrado, después se procedió a preparar la muestra cómo sigue a continuación:

Después de ser filtrada la muestra se pasó a través de un cartucho C-18 (Supelco DSC-18), posteriormente se ajustó el pH a 2.2 con ácido clorhídrico 1N y s e le dio un tratamiento con carbón activado utilizando 10 mg por cada mililitro de muestra, se agito a 150 rpm durante una hora. Las muestras se filtraron a través de un disco con membrana de nylon 0.2 µm y fibra de vidrio para eliminar los residuos de carbón activado.

La cuantificación se llevó a cabo en un equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con detector de UV. Se utilizó ácido sulfúrico 0.33 mM, con un flujo de 0.4 mL/min en la fase móvil, a una temperatura de 30 °C.

9. RESULTADOS Y DISCUCIONES

9.1 Resultados de determinaciones en columnas de burbujeo

9.1.1 Actividad Enzimática Glucosa Oxidasa

La actividad específica enzimática es expresada por la concentración de enzima G.O. entre la concentración de proteína obtenida, se detectó la actividad a partir de la hora inicial (0) llegando a un máximo a las 16 horas, con un 0.000138 (U/mg de proteína). En los controles no se detectó actividad enzimática (figura 9.1).

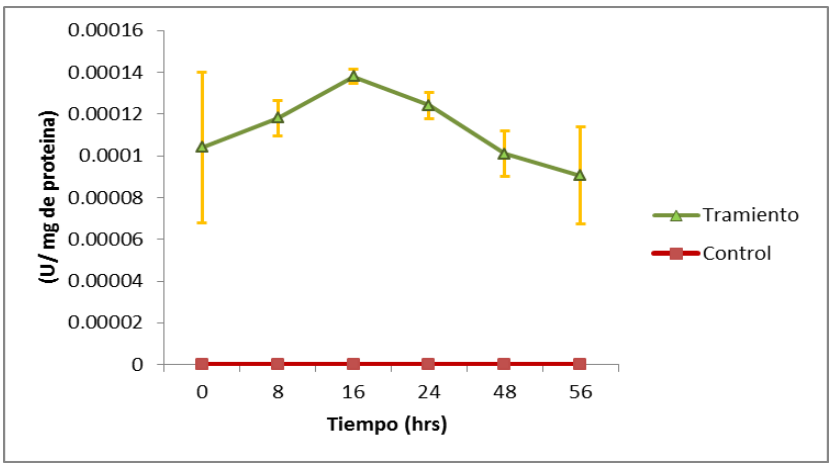


Figura 9.1.- Determinación de la actividad específica de G. O.

9.1.2 Resultados de Proteína total.

La proteína total presentó un incremento a las 16 horas con un valor de 28.7 mg/mL, incrementándose hasta las 56 horas a un valor de 33.67 mg/mL al momento de terminar el experimento. En el control se encontró una pequeña producción de proteína lo cual se explica, ya que existen proteínas en el material empleado, aunque el aumento no fue significativo (9.2).

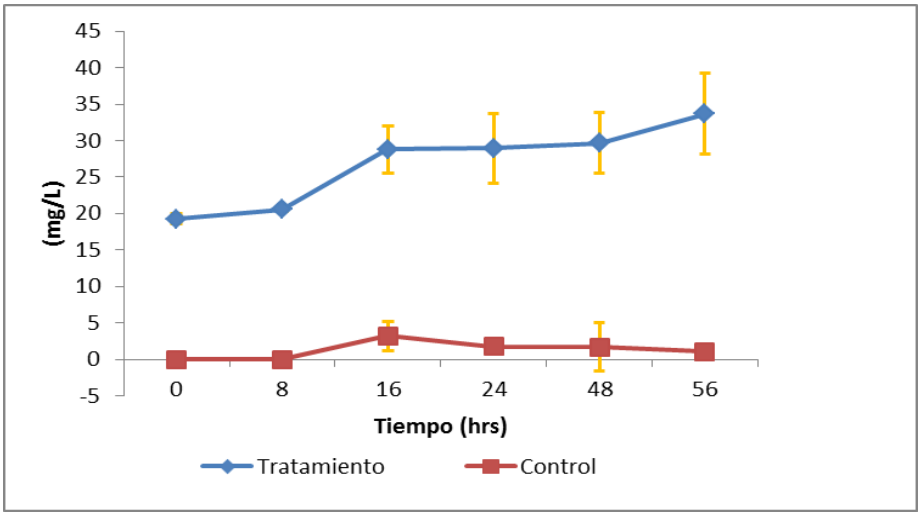


Figura 9.2.- Determinación de proteína total extracelular

9.1.3 Resultados de Azúcares Totales

Los azúcares totales cuantificados fueron los procedentes del material lignocelúlosico que contienen principalmente hemicelúlosa y celulosa, los cuales pudieron haber sido desdoblados por los microorganismos del grano de café, estos azúcares se determinaron a las 8 horas de iniciado el experimento, dando un valor de 114.785 mg/L, la cual presento fluctuaciones debido a su posible desdoblamiento de los carbohidratos y posterior consumo por los microorganismos. En los controles los azúcares presentan valores más bajos que en el tratamiento pero aumentan entre las 16 y 24 horas, para posteriormente reducirse, que se explica porque los

microorganismos inactivaos durante la esterilización, se vuelven a activar al tener condiciones favorables de cultivo de crecimiento (Silvia *et al.,* 2004), que consumen los azucares disponibles que pudieron liberarse al realizar el proceso de esterilización (figura 9.3).

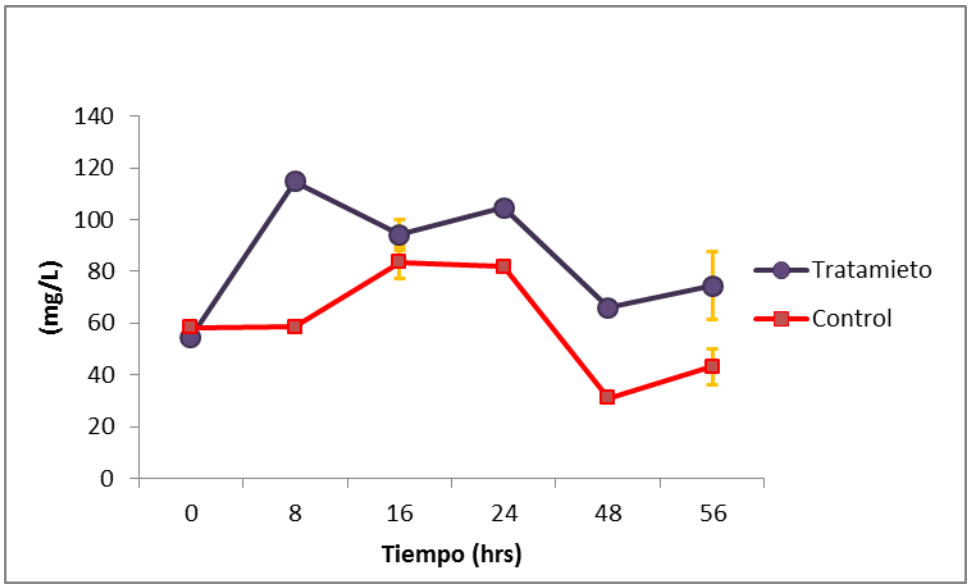


Figura 9.3. Determinación de Azucares Totales

9.1.4 Reducción de color

La reducción de color al día y medio de tratamiento fue del 10.15% en remoción biológica equivalente a 2.03 ppm (9.4); teniendo una remoción abiótica por adsorción a las paredes de la columna y al papel filtro, (figuras 9.5y 9.6).

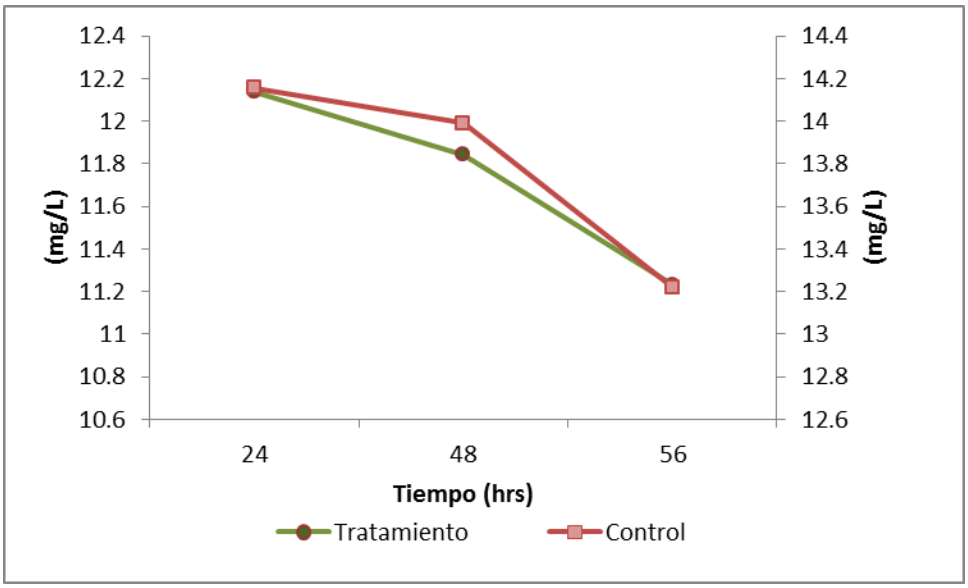


Figura 9.4.- Remoción de colorante Azul de Metileno (mg/L)

Figura 9.5.- Biorreactores de tratamiento a distintas horas del experimento; 0 h sin colorante, 24 h con adición de colorante.

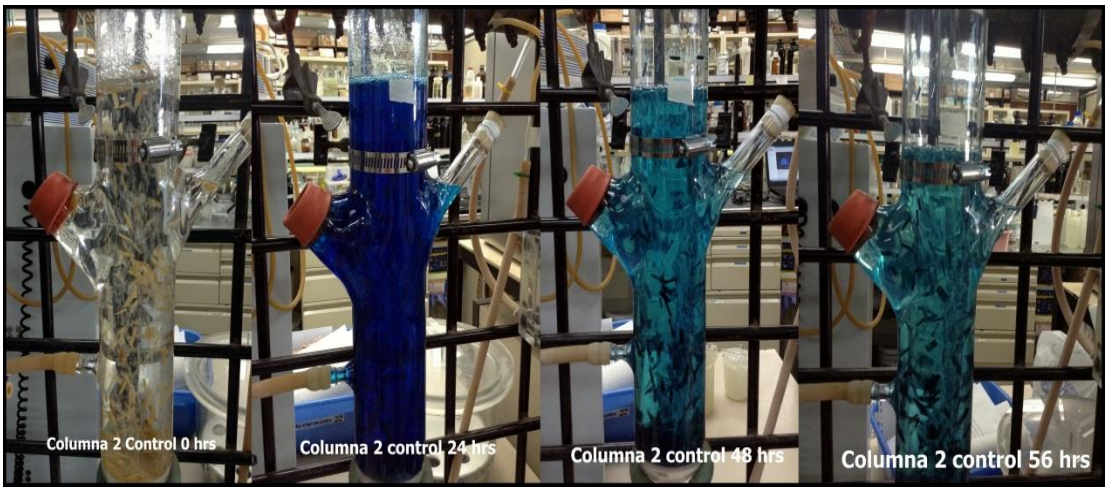


Figura 9.6. Biorreactores Control a distintas horas del experimento; 0 h sin colorante, 24 h adición de colorante.

Análisis en el espectrofotómetro de UV-Visible

En los espectros de absorción se muestra que la banda de absorción del colorante presenta un desplazamiento de la longitud de onda (figura 9.4), lo cual se podría atribuir a la degradación, que dan lugar a la formación de productos de la degradación, que muestran picos de absorción a longitudes de onda menores a 664 nm; dicho desplazamiento puede ser observado en el control, ya que en este el pico de absorción sigue en 664nm como se muestra en la figura 9.7 y 9.8.

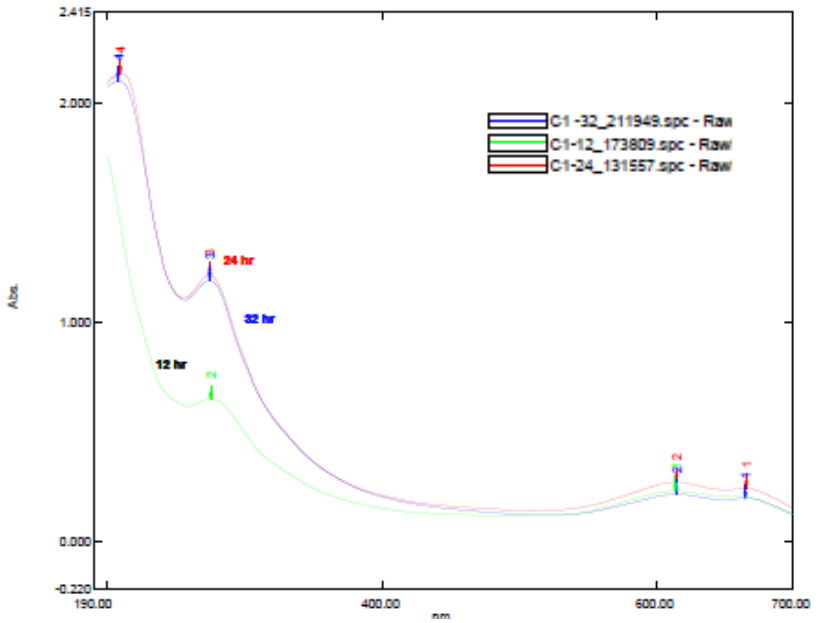


Figura 9.7.- Barrido espectrofotométrico del Tratamiento a las 12, 24 y 32 hrs.

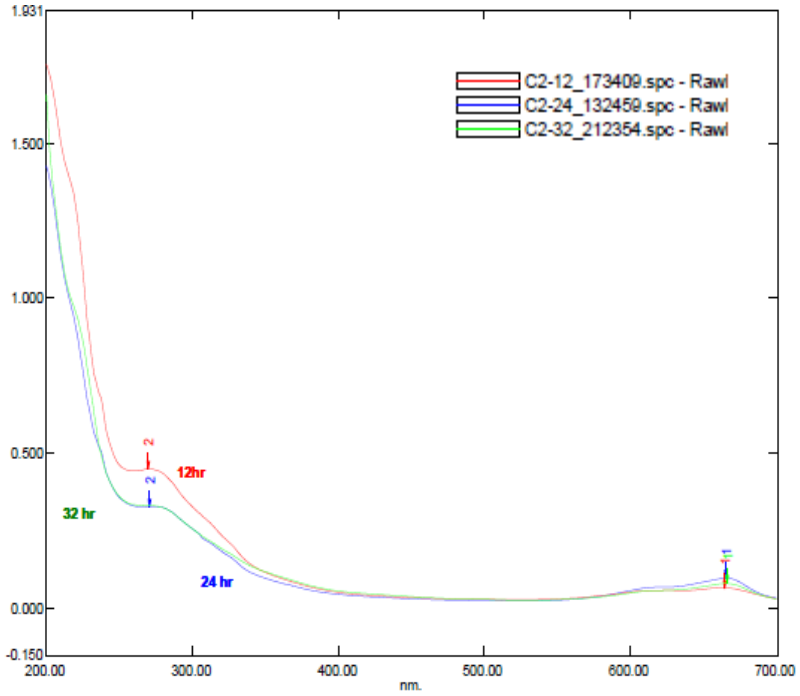


Figura 9.8.- Barrido espectrofotométrico del Control a las 12, 24 y 32

9.1.5. Relación de los parámetros obtenidos.

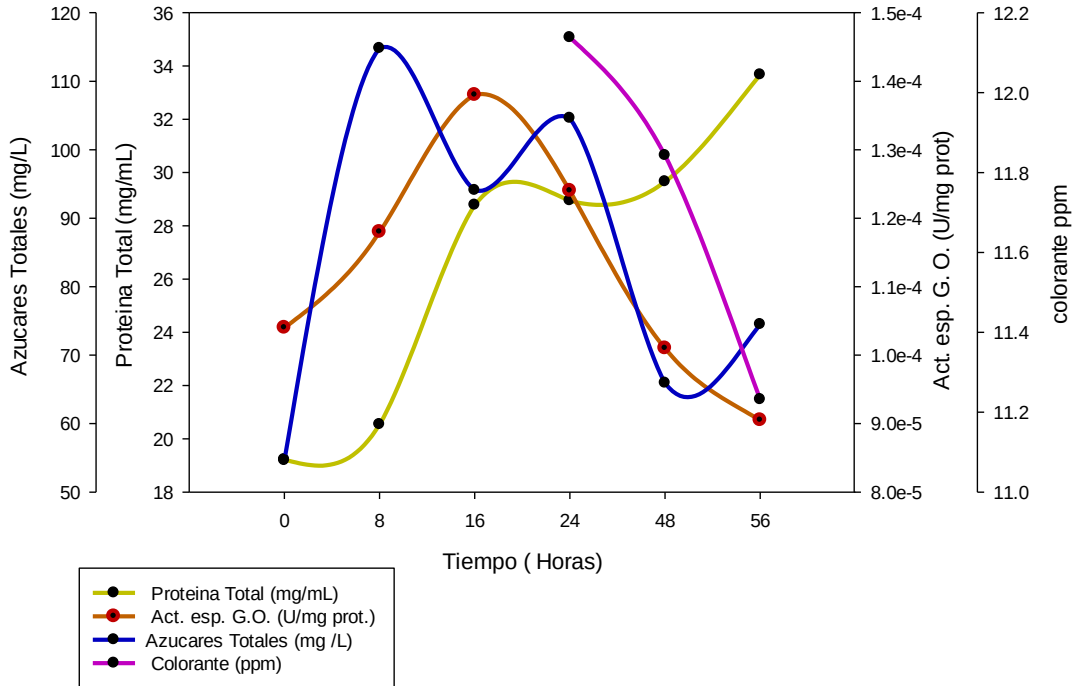


Figura 9.9.- Relación del comportamiento de los parámetros obtenidos durante el tratamiento del colorante.

En la figura 9.9 se aprecia que la proteína total extracelular se encuentra en determinación de los azúcares del medio; se aprecia dos valores máximos a las 8 y a las 24 h, que podrían provenir de la paja, ya que no se adicionó ninguna fuente de carbono. La paja es conocido que contiene un elevada cantidad de hemicelúlosa y celulosa (Rodríguez, 1991), que pueden liberarse al medio de cultivo durante el proceso de fermentación y servir como fuente de carbono primaria para los microorganismos; y que explica la disminución significativa pasando las 24 h del tratamiento; Concordando con el aumento gradual de la proteína total. Aunado a la disminución de azúcares podría estar relacionada la actividad de la glucosa oxidasa, después de las 24 h, y que se correlaciona con la disminución del colorante.

9.2 Efecto de relación C: N: P en la decoloración

8.2.1 Determinación de actividad enzimática de glucosa oxidasa

En el control sin colorante, no se observó actividad enzimática de la glucosa oxidasa y con colorante si presentó poca actividad, atribuible a la activación de algunos microorganismos presentes en el material y que se pudieran haber reactivado bajo condiciones de cultivo favorable, pues es conocido que aun con condiciones de esterilidad se ha presentado un aumento de la actividad microbiana (Fernandez-Sánchez *et al*., 2001), debido a esperas que se puedan estar activando (Sylvia *et al.,* 1999). En el tratamiento como se observa en la gráfica 6, la actividad enzimática de GO se detecta a las 12 horas, teniendo una mayor actividad a las 32 horas de haber iniciado el experimento, posteriormente desciende, y a partir de las 76 horas mostró una variación.

Se aprecia la diferencia entre el tratamiento y los controles, que aunque hubo actividad, esta no influyo en los resultados de la actividad de GO, excepto por las 64,76 y 88 horas en el control con colorante, lo que puede indicar que la actividad enzimática es debido a los microorganismos asociados al grano del café, por lo que la actividad que se presentó en el control con colorante pudo haberse dado ya que la paja y el grano de café fueron esterilizados una sola vez y los microorganismos productores de glucosa oxidasa pudieron activarse nuevamente, ya que tenían nutrientes y condiciones óptimas de incubación (Sylvia *et al.,* 1999)

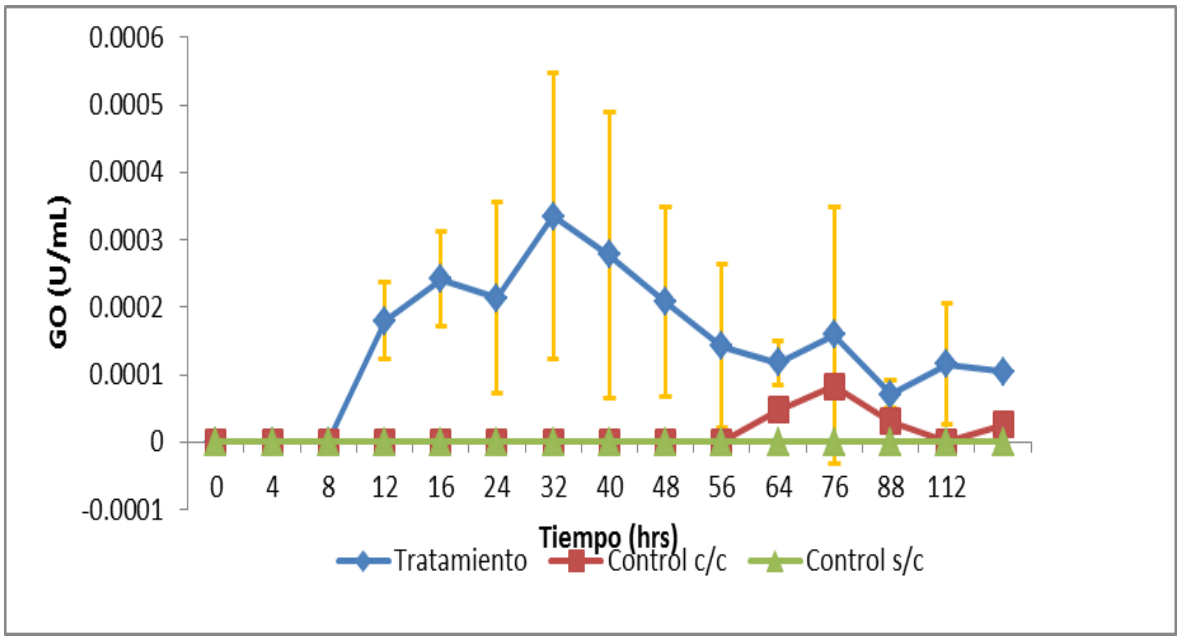


Figura 9.10.- Actividad específica glucosa oxidasa (U/mg) en función tiempo

8.2.2 Determinación de Proteína total por el método de Bradford

En esta determinación, como se esperaba se obtuvo proteína en el tratamiento y en los controles, siendo mayor la proteína en el tratamiento a las 64 horas, en el control con colorante en el tiempo en que se presentó la mayor contaminación, también se observa una mayor cantidad de proteína total, mientras que en el control con colorante es constante comparada con el tratamiento y el control con colorante. Desde las cero y 40 horas tiene un comportamiento similar en los dos controles y el tratamiento, y los dos controles hasta las 64 horas, en el que el control con colorante incrementa su actividad, mientras que el control sin colorante disminuye y se mantiene estable.

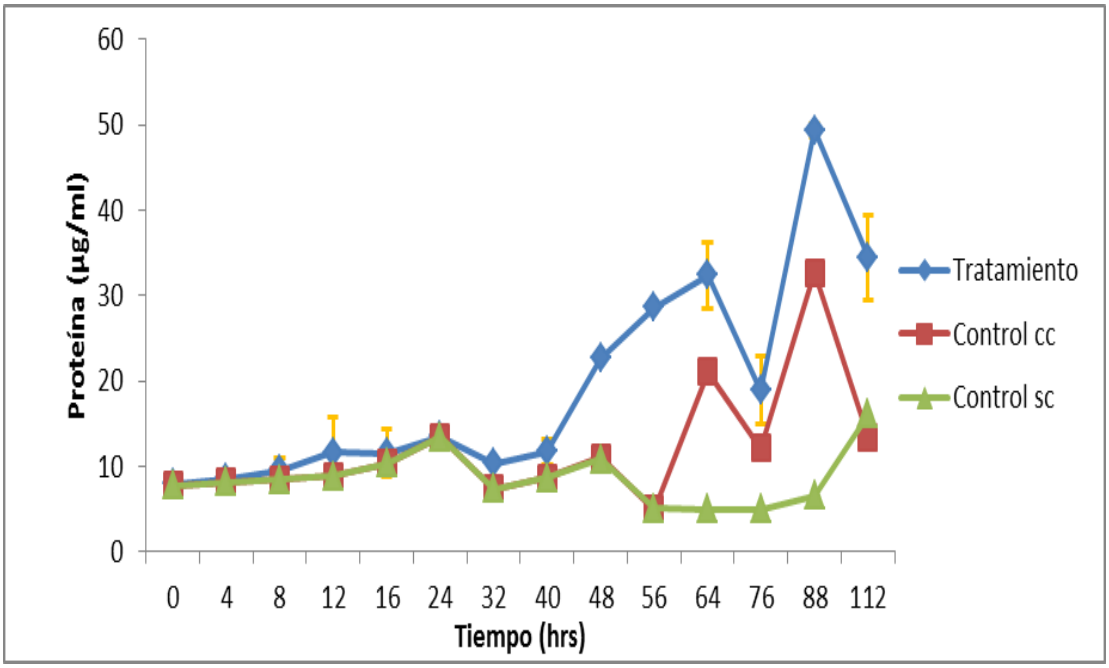


Figura 9.11.- Proteína total extracelular en función Tiempo

9.2.3 Determinación de azúcares totales por el método de reactivo de Antrona

En los controles se determinó una mayor cantidad de azúcares totales, esto pudo deberse a que como ya se mencionó el material lignocelúlosico y el agua se esterilizó, por lo que se pudieron solubilizar alguno azúcares de la paja y dio como resultado mayor cantidad de azúcares. Los controles tienen un comportamiento similar, el cual es descendente y constante, a excepción de la hora 32, en la cual se nota un leve aumento, contrariamente el tratamiento tiene un comportamiento fluctuante, similar a lo previamente discutido relacionado a los carbohidratos de la paja.

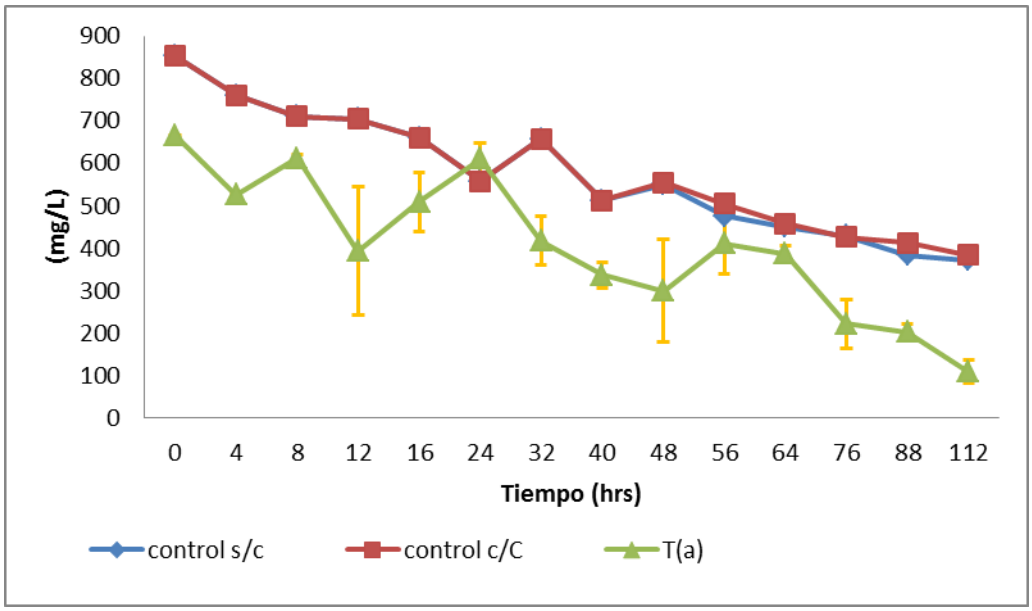


Figura 9.12.- Azúcares totales en función del Tiempo

9.2.4 Determinación de pH

El pH en las muestras de los controles se comportó sin variaciones, disminuyendo hasta 4.5 y 4.8 en el control con colorante y sin colorante respectivamente, en el caso del tratamiento el pH disminuyó hasta llegar a 2.8 a las 112 horas, y disminuyó de manera continua a partir de la hora 32, el hecho de que el pH en el tratamiento fuera más ácido que en los controles pudiera indicar la síntesis de algunos ácidos orgánicos, que sería importante comprobar, ya que se han detectado la producción de algunos ácidos organicos (Izacapa-Treviño,2007) como son el ácido oxálico y tartárico, durante el cultivo de varios hongos filamentosos como son el *Penicillium, Aspergillus,* que se han determinado en el grano de café (Roldán-Martín, 2005)

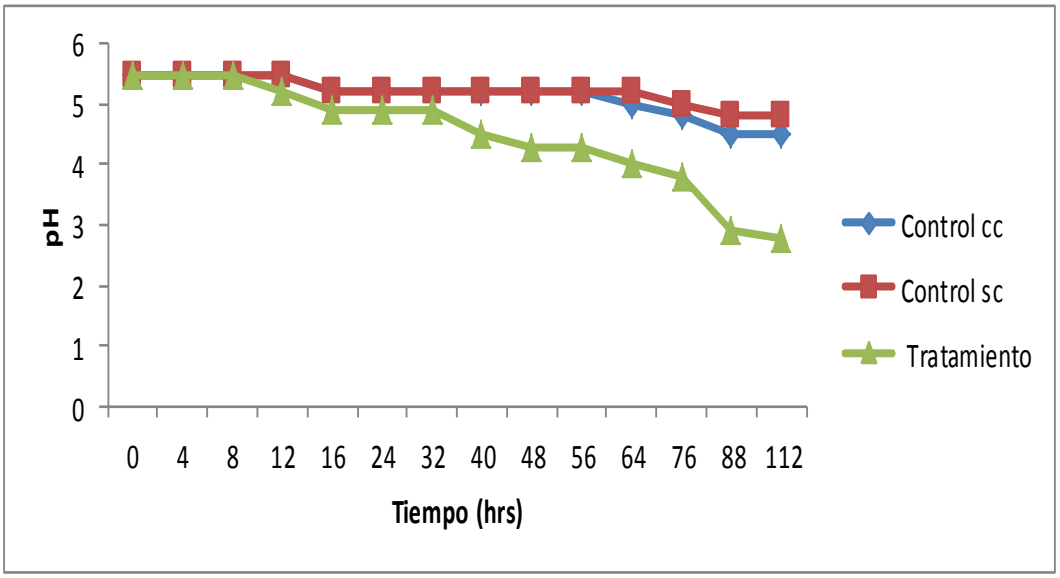


Figura 9.13.- pH en función del Tiempo

9.2.5 Reducción de color

Para la reducción de color, a las ocho horas después de agregado el colorante, se obtuvieron concentraciones de 9.79 y 9.84 ppm para el tratamiento y control respectivamente, a las 64 horas aún no hay una remoción significativa, aunque a partir de este tiempo la concentración del colorante en el tratamiento y en el control descienden a 7.09 y 7.21 ppm respectivamente, a la hora 76 se encontró que en el tratamiento, el medio de cultivo se redujo el color considerablemente (figura 9.14), no obstante al momento de filtrar la muestra, el color se tornaba visible nuevamente (figura 9.14). Esto pudo deberse a que el azul de metileno se encontraba en su estado leuco, el azul de metileno es azul cuando está en un ambiente oxidante, pero es incoloro (azul de metileno leuco) si se expone a un agente reductor (en ausencia de oxígeno). Este puede ser rápidamente oxidado en presencia de oxígeno a su color original.

Al final del tratamiento, (dos días y medio) se obtuvo una reducción biológica del 10%.

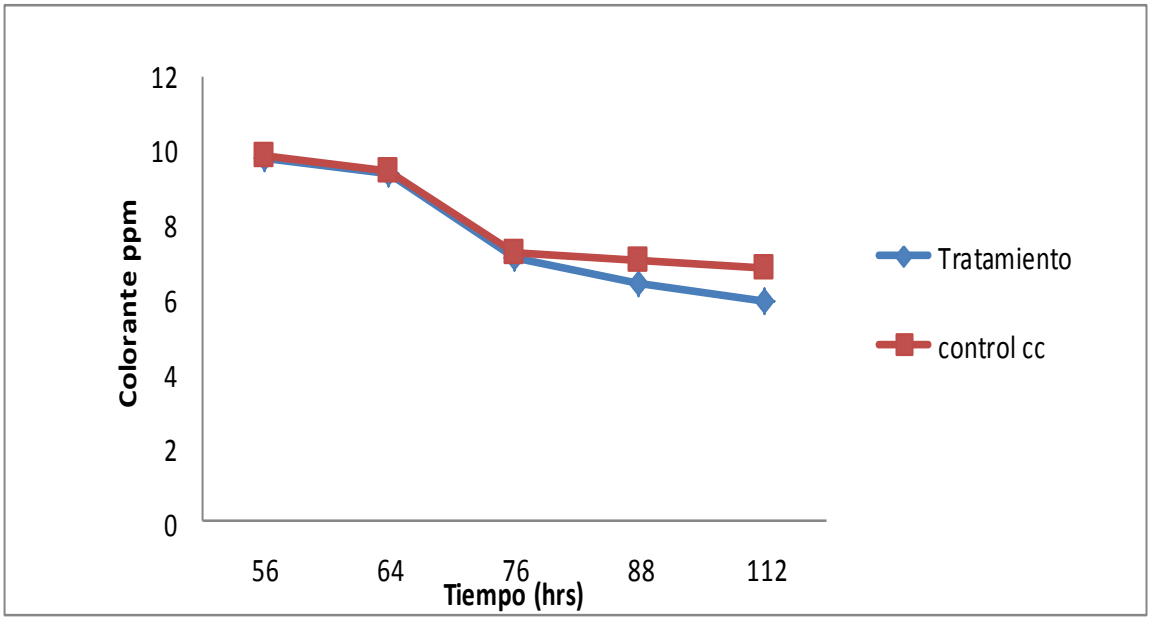


Figura 9.14.- Concentración de colorante en función del tiempo

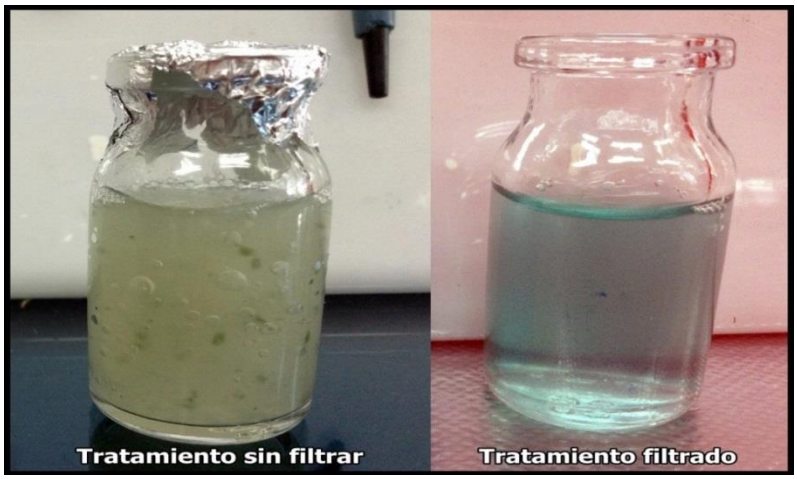


Figura 9.15.- Tratamiento sin filtrar y filtrado

9.2.6 Relación entre parámetros obtenidos en la relación C: N: P

En la figura 9.16 se muestra el aumento en la actividad enzimática a las 16 y 32 horas y posteriormente se muestra también un aumento en producción de peróxido de hidrogeno a partir de las 48 horas se presenta una fluctuación en la actividad y la producción del peróxido de hidrógeno.

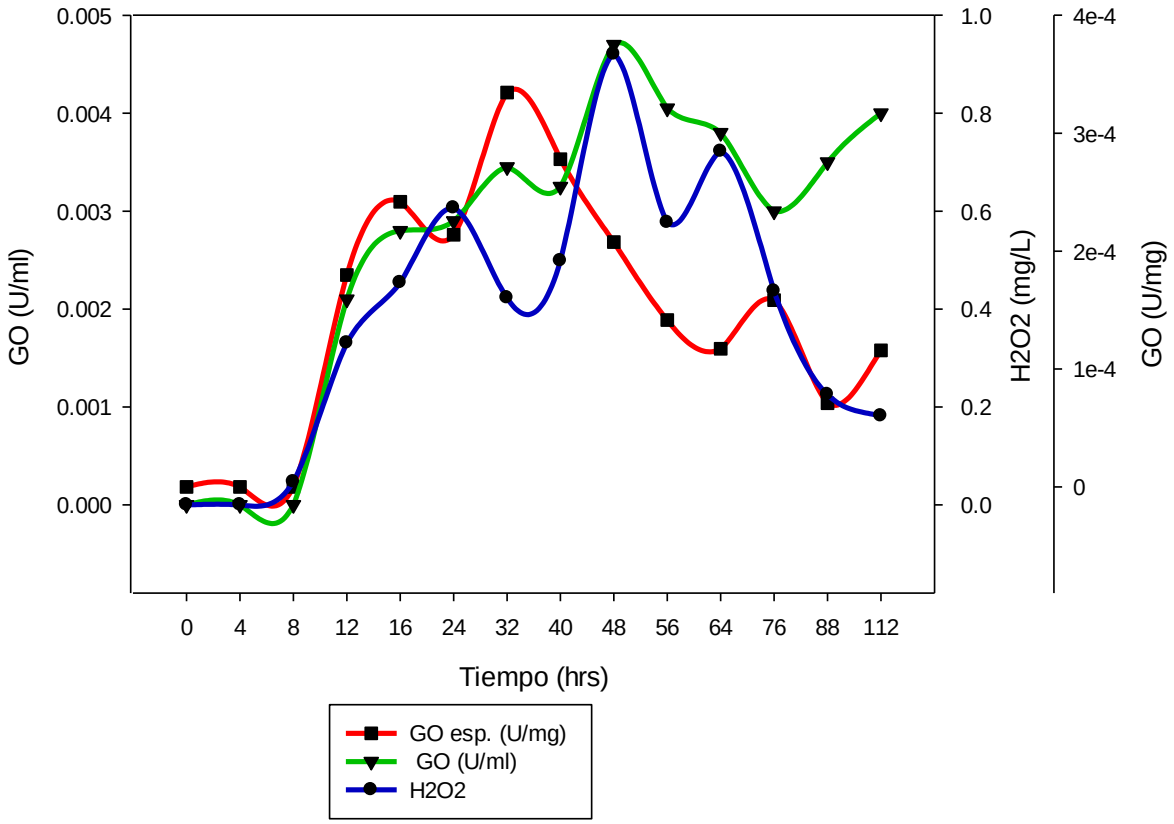


Figura 9.16.- Peróxido de hidrógeno, GO y GO especifica en función del

En la figura 9.17 se observa la relación de la actividad enzimática específica de GO con los azúcares; ya que mientras los azucares son consumidos la actividad específica de glucosa oxidasa aumenta, encontrando así el efecto esperado durante las primeras horas del tratamiento. Después de la hora 32 tanto la actividad enzimática como los azúcares descienden, sin embargo los azúcares vuelven a aumentar posiblemente por la degradación de la paja, aunque a partir de la hora 56 ya no hay incrementos en los azúcares. Esto nos puede indicar la necesidad de continuar adicionando paja para que el sistema se mantenga con la producción de azucares en el medio de cultivo.

Dado que la proteína total extracelular es proporcional a los microorganismos existentes en el medio, se puede suponer que mientras los azúcares son consumidos la proteína total va en aumento y tienen un comportamiento similar. En la figura 9.17se aprecia dicho comportamiento, sin embargo en la hora 76 los azúcares siguen disminuyendo y la proteína aumenta significativamente, esto podría indicar que los microorganismos están obteniendo su carbono de otra fuente.

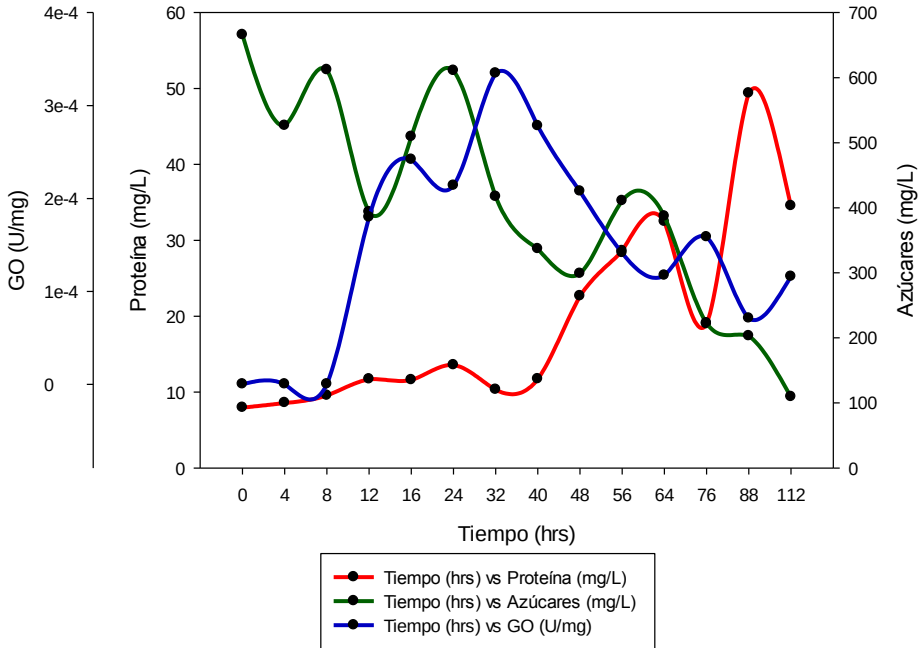


Figura 9.17.- Proteína total, G.O. específica y azúcares en función del Tiempo

Esta fuente de carbono se podría suponer que la obtuvo del colorante, ya que a las 88 horas la proteína muestra un aumento significativo y el colorante disminuye en el punto anterior, como se muestra en la figura 9.18 ; dicha disminución de colorante pudo llevarse a cabo por la interacción con el peróxido de hidrogeno ya que este presenta una disminución constante después de haber agregado el colorante, lo anterior incluyendo el consumo que se supone se dio por parte de los microorganismos hicieron que la remoción biológica fuera en total del 10%.

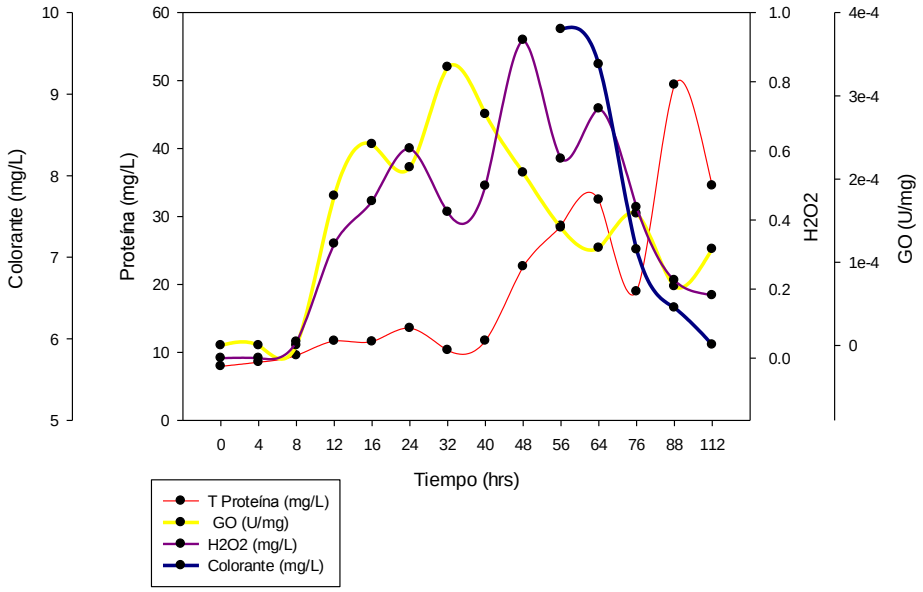


Figura 9.18.- Colorante, Proteína, H_20_2 y GO en función Tiempo

9.3 DISEÑO PLACKETT BURMAN DEFINIDO.

9.3.1 Producción de ácido oxálico y pH

En la tabla 4 se muestran los resultados de pH final y producción de ácido Oxálico del diseño Plackett-Burman definido para la remoción de color.

Tabla 4.- pH final y áreas de ácido oxálico a los tres días de cultivo para cada uno de los diferentes medios de cultivo del diseño Plackett-Burman

Tratamiento	pH final	Ácido Oxálico (Área)
1 (3-3)	5.0	419184.333
2 (1-6)	5.5	170964.5
3 (1-6)	5.5	17828
4 (3-6)	5.5	556071
5 (1-3)	5,5	212122.33
6 (3-3)	5.5	508471.67
7 (3-6)	5.0	557821.67
8 (1-3)	5.5	573696
W (control) (1-3)	3.5	0.0
W (control) (1-6)	4.2	0.0
W (control)(3-3)	3.5	0.0
W (control)(3-6)	4.0	0.0

Dónde: (1-3)= Un día de inmovilización y tres cubos
(1-6)= Un día de inmovilización y seis cubos
(3-3)= Tres días de inmovilización y tres cubos
(3-6)= Tres días de inmovilización y seis cubos

La producción de ácido oxálico se presentó principalmente en los tratamientos, mientras que en los controles (W) no se detectó ácido oxálico encontrándose en ellos ácido tartárico (véase los anexos). De acuerdo al análisis de varianza (ANOVA) realizado, las variables no tienen un efecto significativo.

9.3.2. Reducción de Colorante.

La reducción de colorante mediante el diseño Plackett-Burman, mostró mejores resultados que en los tratamientos anteriores, (figura 9.18); obteniendo una remoción en los tratamiento de más 50% con un máximo de 60% en el tratamiento 7. En los controles positivos la mayoría se encuentra entre un 23% y 39 % (figuras 9.19 y 9.20). De acuerdo al programa LSD del SAS no se encontró diferencias significativas en los tratamientos, sin embargo el tratamiento 7 es un poco prometedor en la reducción del azul de metileno.

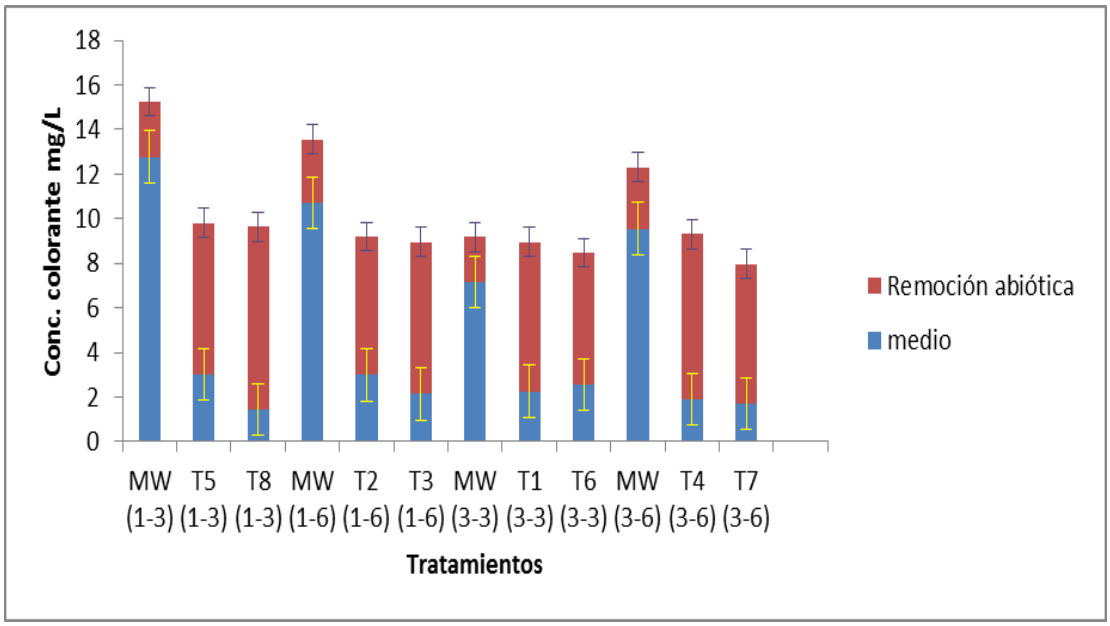


Figura 9.19.- Concentración del colorante no removido biológicamente.

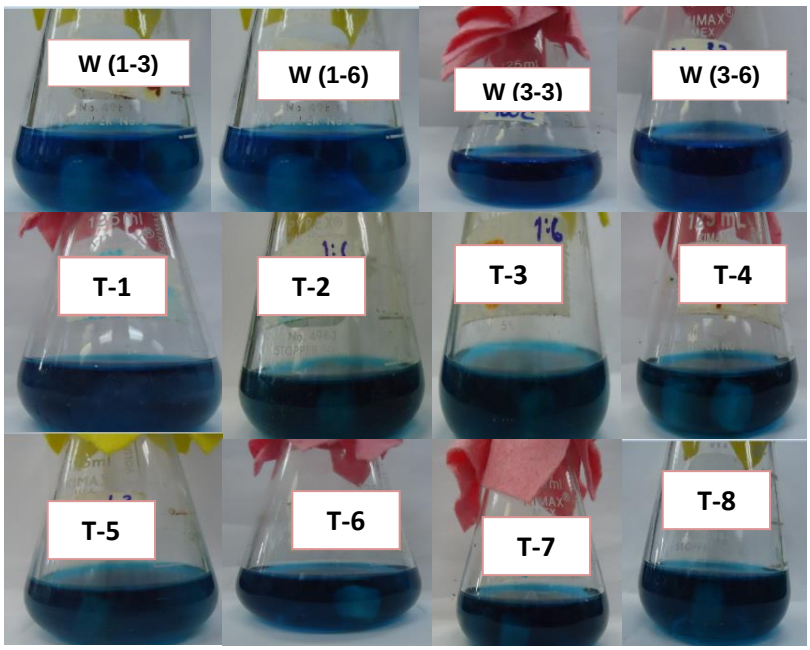


Figura 9.20.- Día inicial del experimento con 20 ppm de Azul de Metileno.

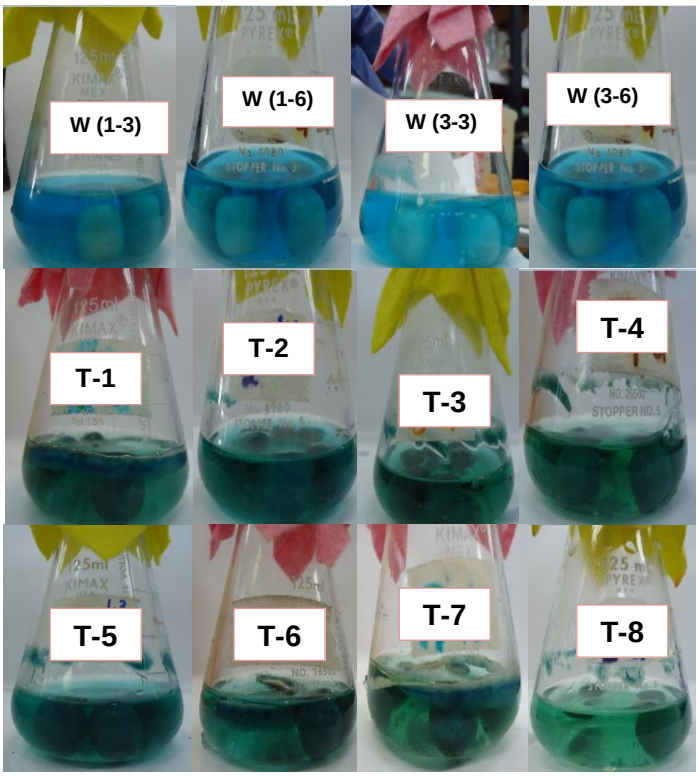


Figura 9.21.- Degradación final (tercer día) del azul de Metileno

En este diseño no se pudo calcular la proteína total, azúcares totales y Glucosa oxidasa, debido a que se encontraron en bajas cantidades con respecto a los valores de las curvas de calibración. Es por ello que solo se tomó el pH y ácidos orgánicos.

10. CONCLUCIONES Y RECOMENDACIONES

Con los análisis realizados, se concluye que la paja puede remover abióticamente parte del colorante por medio de adsorción. Sin embargo su función como soporte para el crecimiento de los microorganismos asociados al grano de café; para remover el colorante no fue eficiente al menos en las condiciones investigadas.

Así mismo la producción de glucosa oxidasa enzima involucrada en la producción de peróxido de hidrogeno si fue detectada en el cultivo, con valores bajos de la actividad, en presencia del colorante. Por lo que sería recomendable seguir investigando la mejora en las condiciones de cultivo.

Por lo anterior, se realizó un experimento con medios definidos e inmovilizados en cubos de poliuretano, con varios componentes del medio de cultivo, obteniendo mayores reducciones del color y se determinó la producción de ácido oxálico.

Por tal motivo se recomienda la implementación de otro método de inmovilización en paja, así como prolongar el tiempo de experimentación, para con ello poder obtener mejores resultados en la remoción biótica del colorante.

10. BIBLIOGRAFIA.

1.-Antonella Anastai, V. Pringione, G. Vanese (2009), Industrial dye degradation and detoxificacion by basidiomycetes beloging to different eco-physiological goups, Journal of Hazardous materials.

2.-Chemmatters, 1986 American Chemical Society, Washington, DC.

3.-Chrstie,R. 2001, Colour Chemetry Royal Society of chemistry. United Kingdom.

4.-Commandeur I. y Parsons J. (1990) Degradation of aromatic compounds biodeg.

5.-Cortinas N. C., Vegas G., S., Residuos peligrosos en el mundo y en México., INE, México, 1993.

6.-Epp. D. The Chemistry of vat Dyes, University Middletown Ohio, 1995.

7.-Fernández-Sánchez J.M., R. Rodríguez-Vázquez**,** G. Ruiz-Aguilar & P.J.J. Álvarez, 2001. PCB biodegradation in aged contaminated soil: interactions between exogenous *Phanerochaete chrysosporium* and indigenous microorganisms. J. of Environ. Sci. and Health, part. A 36 (7), (1145-1162).

8.-Kindelbaver A, Guebitz G. (2005). Biorremediation For the Decolorization of Textle Dyes- A review, En: Evirometal Chemistry, Green Chemistry and pollutants in Ecosystems.

9.-Korano M, M. yLyberatos (2006), Biological treatment of wastewaters form a dye manufacturing company usin a trickling filter.

10.-Mansilla H.D., Limaza C., Gutarra A, y Rodríguez J. (2001) Tratamiento de residuos liquido de la industria de celulosa y textil en eliminación de contaminante por fotocatálisis heterogénea, Blesa M.A. Editor, Editand CyTED La planta argentina.

11.-Manzano A., León T., Arguelles, J. Leal, R. Chinea, R. Guerra, G. Casado, G. Sánchez, M. y Gómez B., 2004, Hongo de la pudrición blanca con capacidad lignínolitica y acción colorante sobre el violeta cristal. Revista Biológica.

12.-Mittal A, Mittal J. y Kurup L. (2006). Batch and bulk removal of hazardous dye, indigo carmine from waste water through adsorption. Journal of Hazardous materials.

13.-Moeller, G. and Garzón, M. 2003, desarrollo de tecnología no convencionales para el tratamiento de efluentes de la fabricación de colorantes tipo azo.

14.-Neill, F.Hawkes, D. Hawkes, N. and Lorenco, M. 1999, J chem, Tecnol, Biotechnol.

15.-NOM-001-ECOL-1996, Límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes naturales, Secretaria de medio ambiente, recursos naturales y pesca 1996.

16.-Producción más limpia en el sector textil, Medellín Colombia.

17.-Quintero R, Área metropolitana el valle de aburrá (2007)

18.-Ramolho, R.S., Tratamiento de aguas residuales. Editorial Reverte. S.A., España 1996.

19.-Restrepo T., D. Sánchez, A. Galvis, Jhonny R.M., J. Sanabria (2007), Avances en investigación y desarrollo en aguas y saneamiento para el cumplimiento de metas del milenio. Ed. Universidad del valle, Calí Colombia.

20.-Rodríguez-Vázquez, 1991, pretreatment of biomass and comparison with Brown rot decay mechanism, PhD Depto. Forest and Wood Science. Colorado State University, Fort Collins Co, USA.

21.-Roldán Martín G.A. Remoción de hidrocarburos en un sistema de biopilas con adición de texturizantes. Depto. De Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV-IPN 24 de abril 2006.

22.-Sandberg (1989), Indigo Textile Technique and History lark books Asheville, NC.

23.-Sankar,E. Terre, I and Blendill, F, 1999, Problems of dyes, International Journal of Canada.

24.-Sen S., Demirer G (2003) anaerobic treatment of real textile wastewater with a fluidized bed reactor. Water Reasearch.

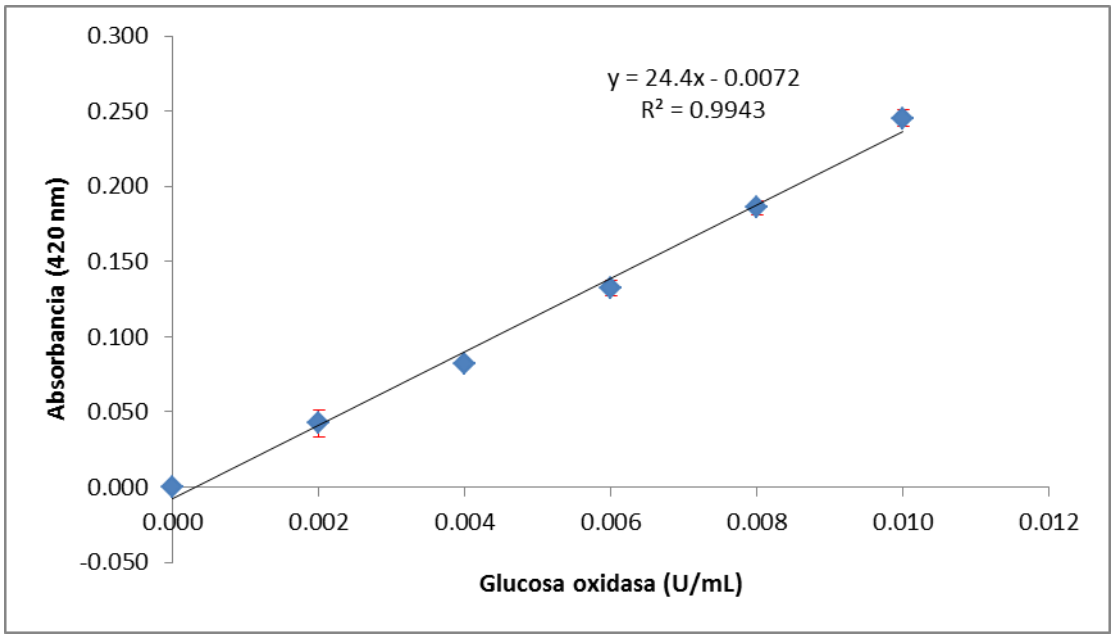
25.-Smith, M. (1990).The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria.

26.-Swamy, J., Ramsay, J. A., The evaluation of white Rot Fungi in the Decoloration of Textile Dyes, Enz. and microb. Technol.

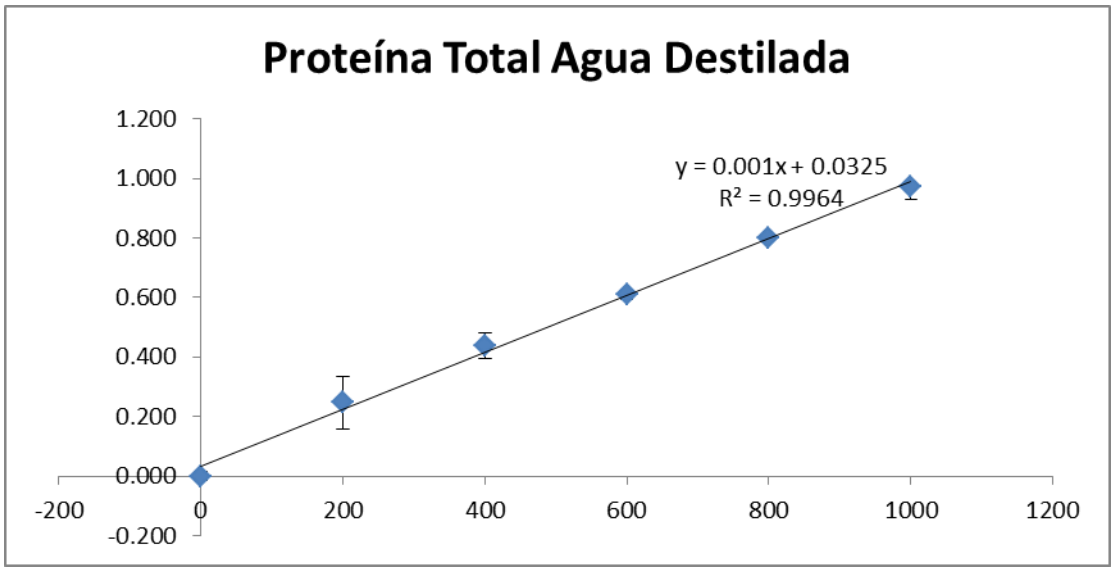
27.-Sylvia D. M., Furhmann J.J., Hartel P.G., and Zuberer D.A. Principles and Aplications on Soil Microbiology. Prentice Hall, New Jersey, ISBN 0-13-4599991-8.

10. ANEXOS

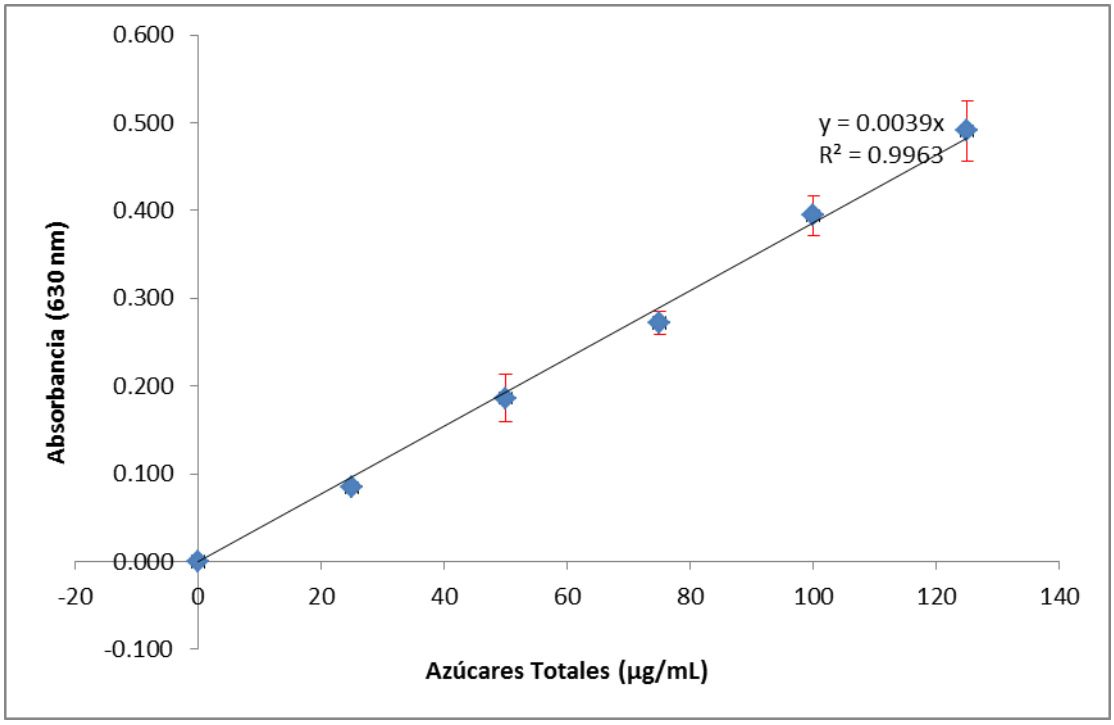
ANEXO A. CURVA PATRÓN GLUCOSA OXIDASA.



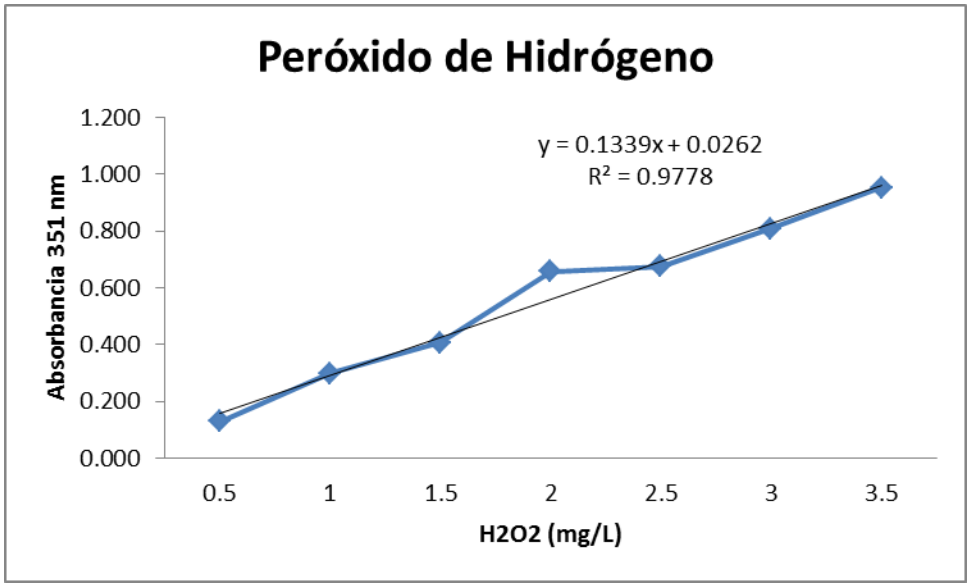
ANEXO B. CURVA PATRÓN DE PROTEÍNA TOTAL



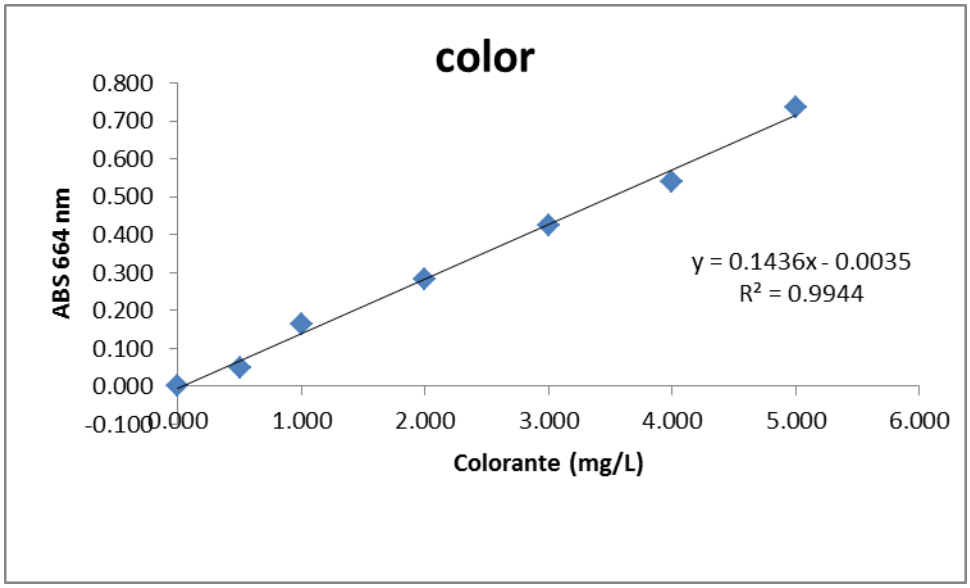
ANEXO C. CURVA PATRON DE AZUCARES TOTALES.



ANEXO D. CURVA PATRÓN PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

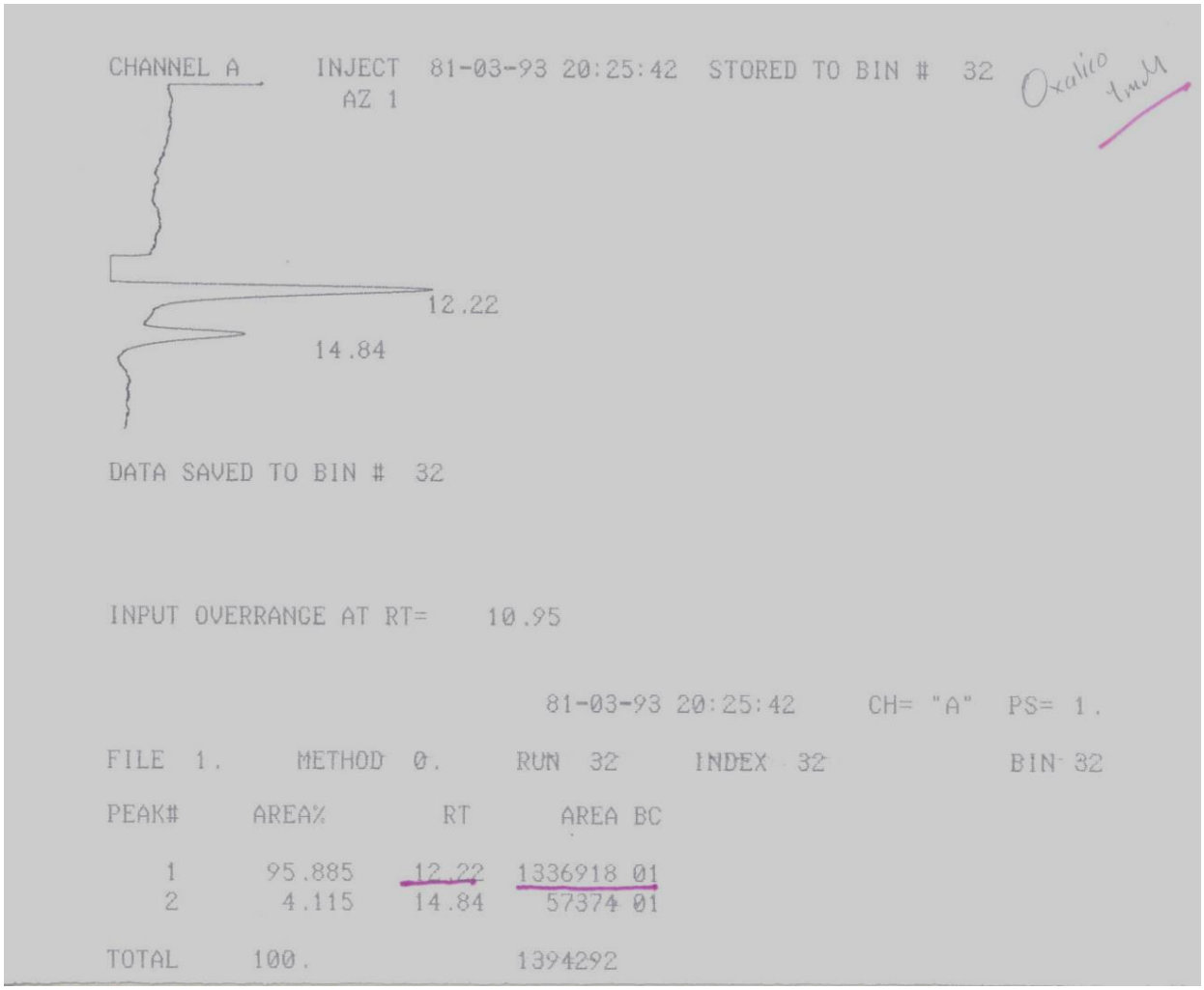


ANEXO E. CURVA PATRÓN DE COLOR

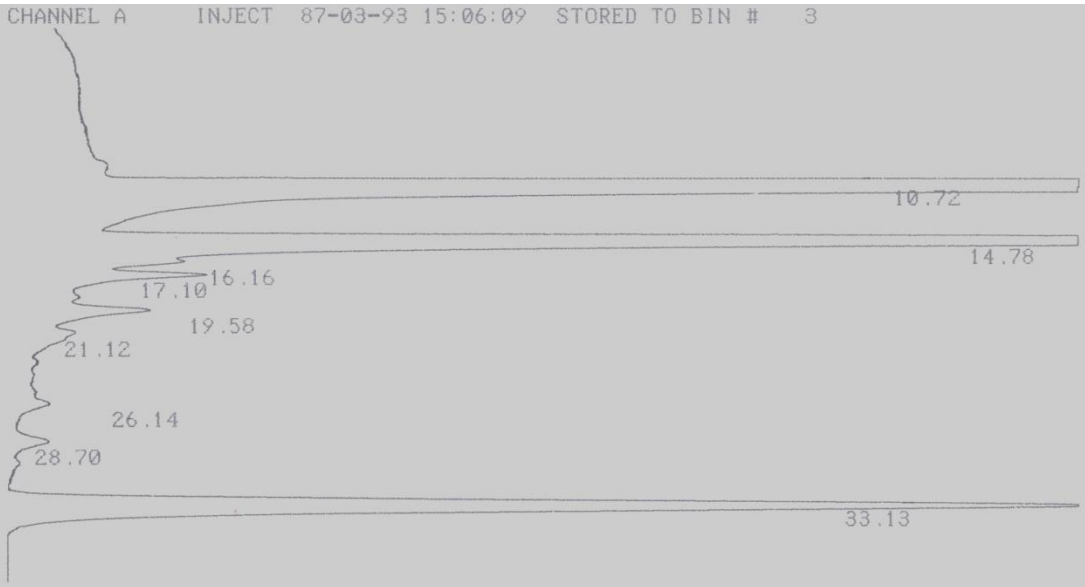


Anexo F. Cromatrogramas de ácidos orgánicos.

Ac. Oxálico estándar.



Mw. (1-3)



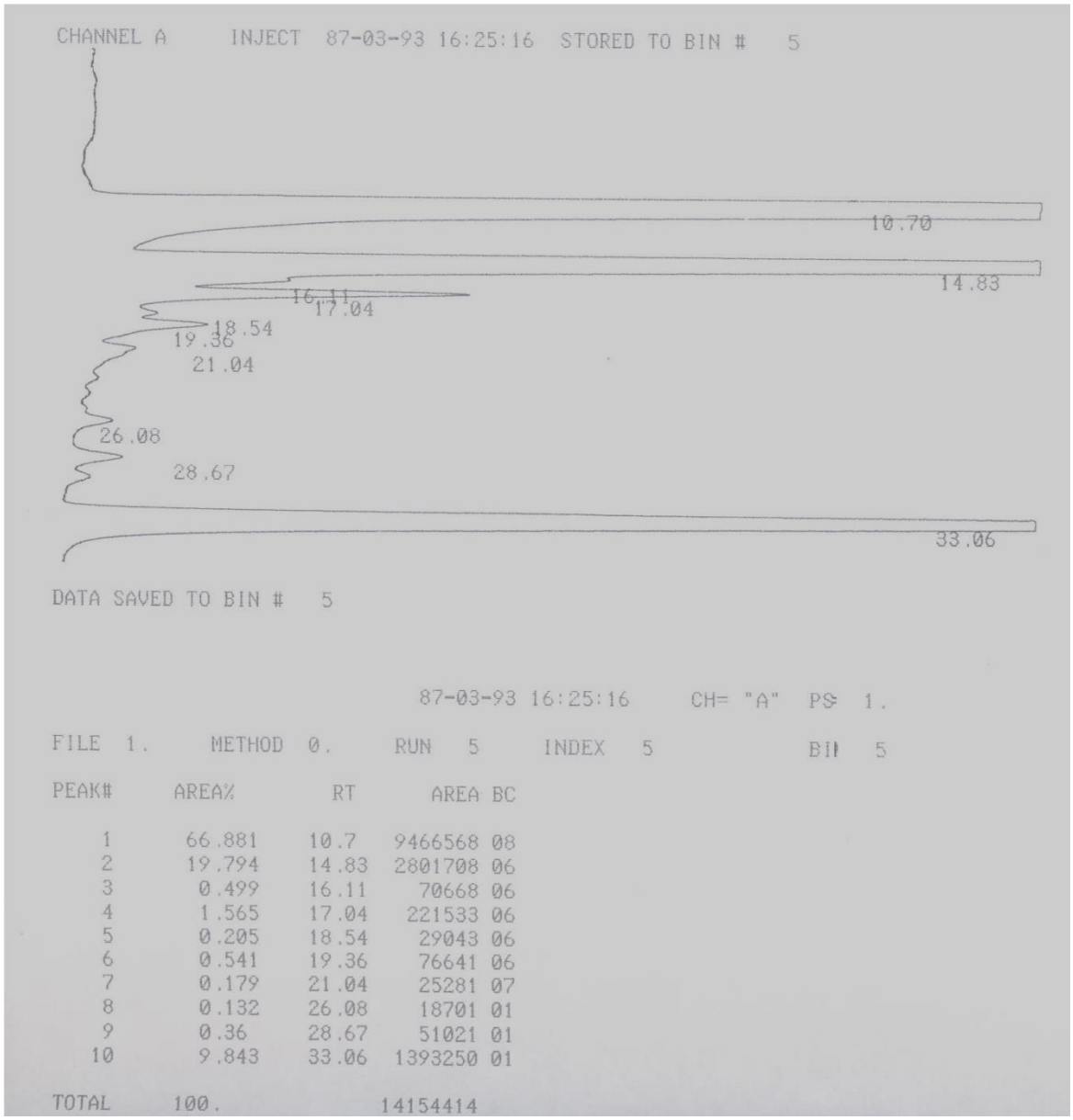
DATA SAVED TO BIN # 3

87-03-93 15:06:09 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 3 INDEX 3 BIN 3

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	66.702	10.72	5385412	08
2	19.861	14.78	1603556	06
3	0.513	16.16	41408	06
4	0.817	17.1	65941	07
5	0.633	19.58	51105	02
6	0.276	21.12	22296	03
7	0.132	26.14	10638	01
8	0.256	28.7	20629	01
9	10.811	33.13	872825	01
TOTAL	100.		8073810	

Mw. (1-6)

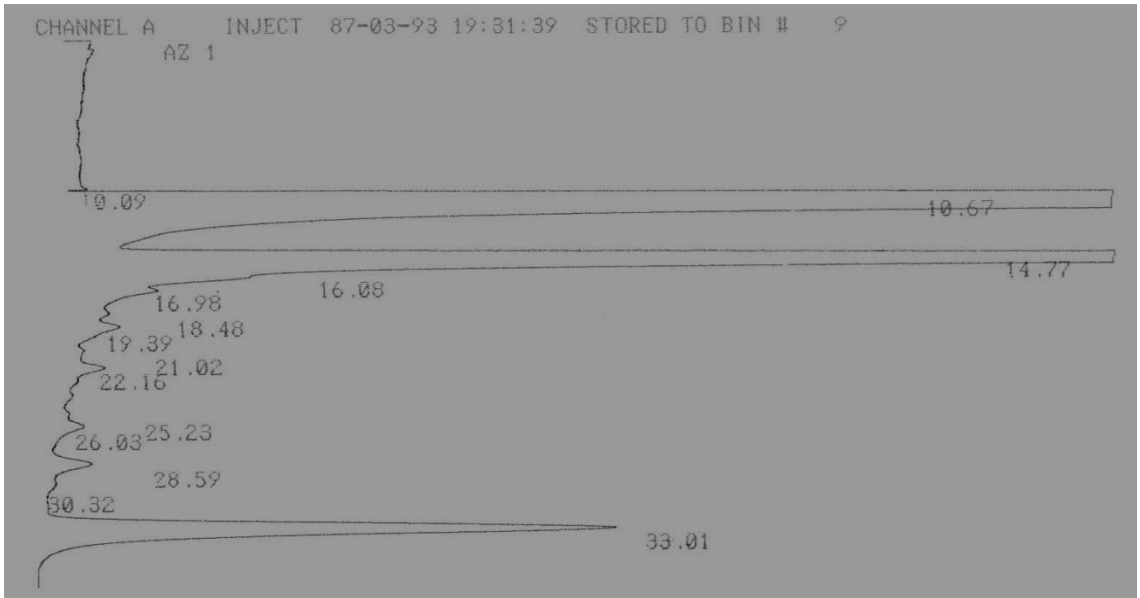


87-03-93 16:25:16 CH= "A" PS 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 5 INDEX 5 BIN 5

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	66.881	10.7	9466568	08
2	19.794	14.83	2801708	06
3	0.499	16.11	70668	06
4	1.565	17.04	221533	06
5	0.205	18.54	29043	06
6	0.541	19.36	76641	06
7	0.179	21.04	25281	07
8	0.132	26.08	18701	01
9	0.36	28.67	51021	01
10	9.843	33.06	1393250	01
TOTAL	100.		14154414	

Mw (3-3)



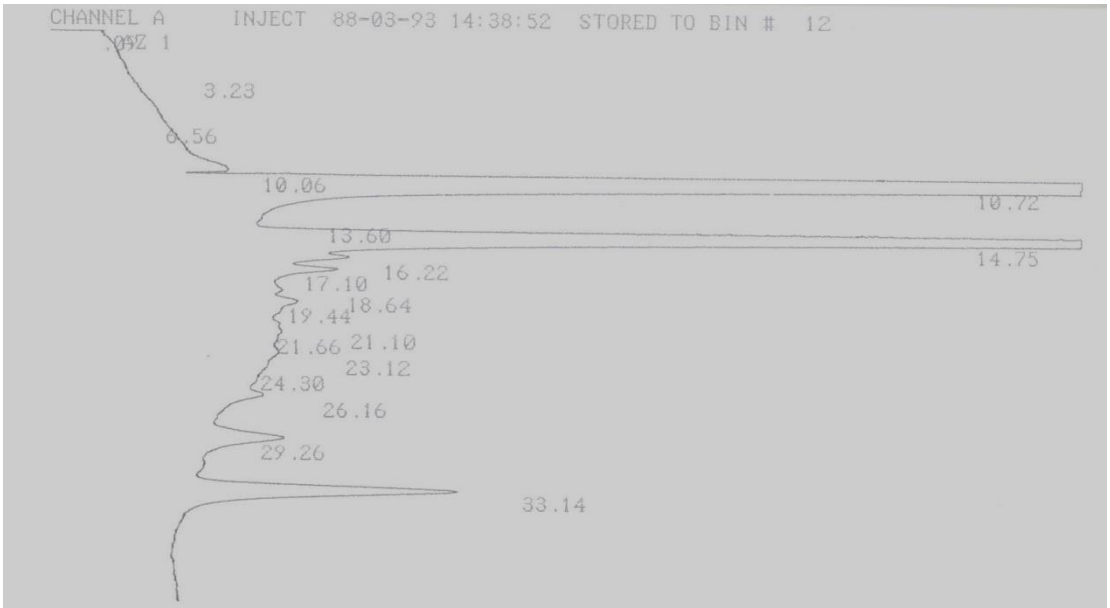
DATA SAVED TO BIN # 9

87-03-93 19:31:39 CH= "A" PS 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 9 INDEX 9 BIN 9

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	0.016	10.09	1864	02
2	77.377	10.67	8911067	08
3	17.079	14.77	1966843	06
4	0.484	16.08	55691	06
5	0.25	16.98	28817	07
6	0.03	18.48	3457	02
7	0.16	19.39	18413	08
8	0.012	21.02	1375	05
9	0.105	22.16	12059	01
10	0.029	25.23	3285	02
11	0.144	26.03	16568	03
12	0.269	28.59	31027	02
13	0.032	30.32	3680	03
14	4.014	33.01	462220	01

Mw (3-6)



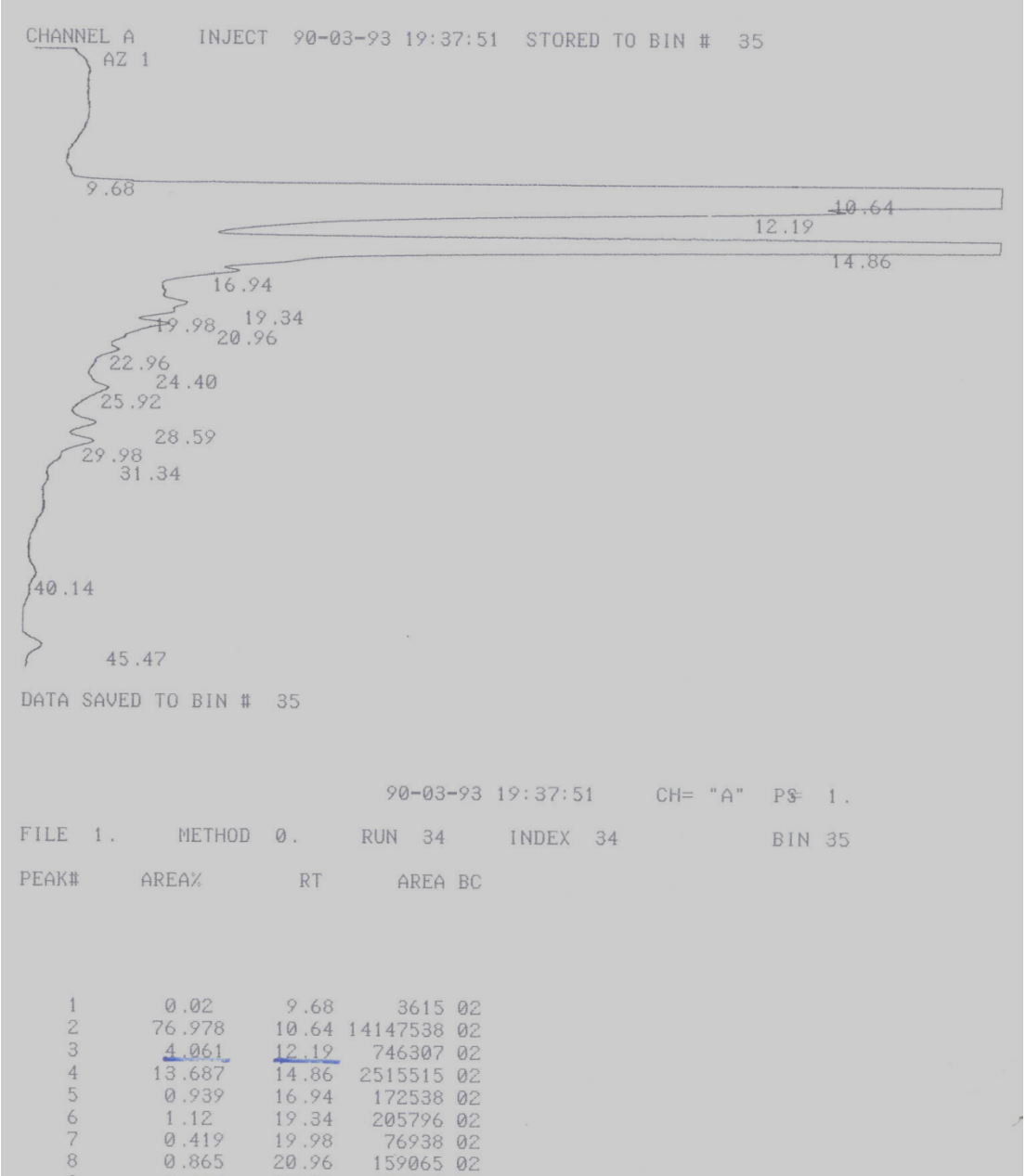
DATA SAVED TO BIN # 12

88-03-93 14:38:52 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 11 INDEX 11 BN 12

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	0.012	0.09	898	03
2	0.06	3.23	4491	02
3	0.851	6.56	63788	02
4	2.392	10.06	179248	02
5	73.053	10.72	5473961	08
6	0.001	13.6	78	05
7	14.808	14.75	1109593	06
8	0.715	16.22	53588	06
9	0.846	17.1	63370	06
10	0.352	18.64	26373	06
11	0.843	19.44	63192	06
12	0.355	21.1	26590	06
13	0.564	21.66	42272	06
14	0.672	23.12	50369	06
15	0.483	24.3	36213	06
16	0.304	26.16	22765	07
17	0.86	29.26	64467	05
18	2.827	33.14	211830	01
TOTAL	100.		7493086	

Tratamiento 1

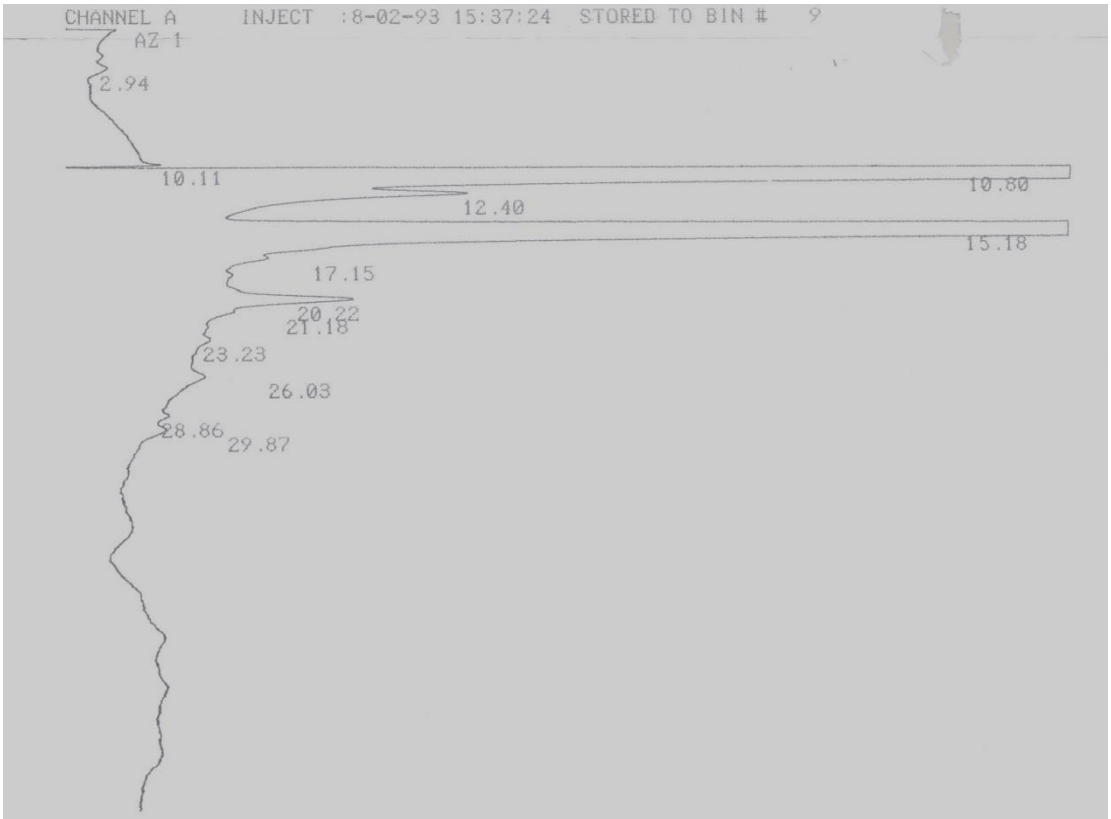


90-03-93 19:37:51 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 34 INDEX 34 BIN 35

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	0.02	9.68	3615	02
2	76.978	10.64	14147538	02
3	4.061	12.19	746307	02
4	13.687	14.86	2515515	02
5	0.939	16.94	172538	02
6	1.12	19.34	205796	02
7	0.419	19.98	76938	02
8	0.865	20.96	159065	02

Tratamiento 2



DATA SAVED TO BIN # 9

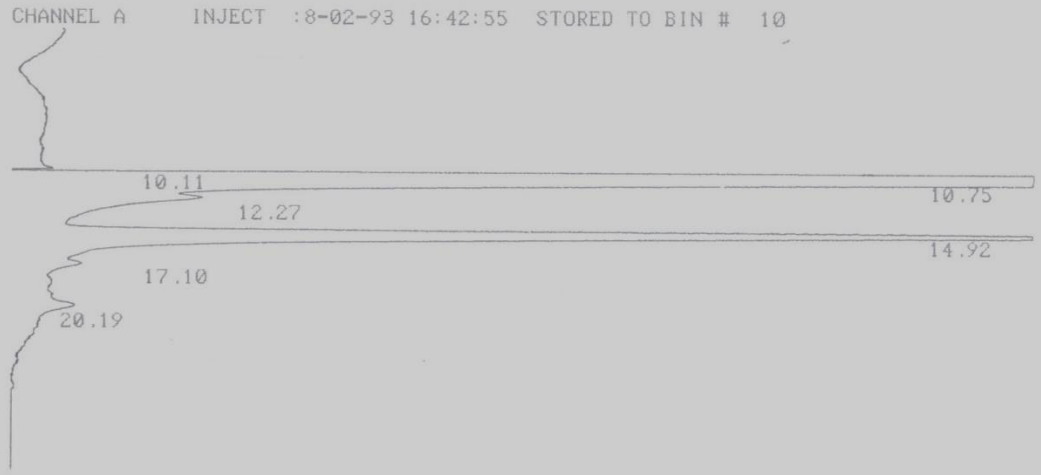
:8-02-93 15:37:24 CH= "A" PS 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 9 INDEX 9 BIN 9

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	0.068	2.94	7141	01
2	0.06	10.11	6385	02
3	61.64	10.8	6510794	02
4	3.093	12.4	326693	02
5	33.837	15.18	3574041	08
6	0.04	17.15	4186	05
7	0.879	20.22	92844	02

Tratamiento 3

CHANNEL A INJECT :8-02-93 16:42:55 STORED TO BIN # 10



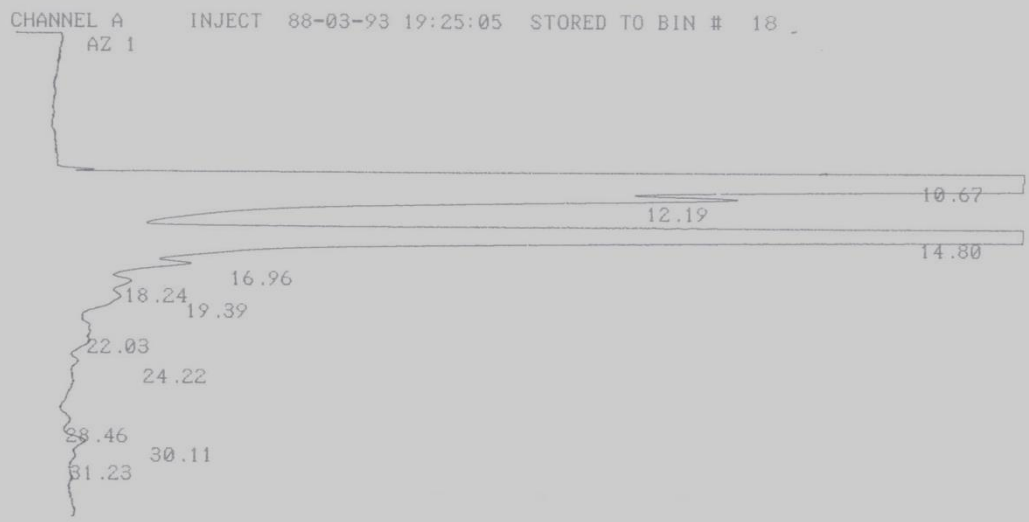
DATA SAVED TO BIN # 10

:8-02-93 16:42:55 CH= "A" PS: 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 10 INDEX 10 BIN 10

PEAK#	AREA%	RT	AREA BC
1	0.04	10.11	1727 02
2	83.486	10.75	3596729 08
3	0.414	12.27	17828 05
4	15.531	14.92	669117 01
5	0.186	17.1	7997 01
6	0.343	20.19	14780 01
TOTAL	100.		4308178

Tratamiento 4



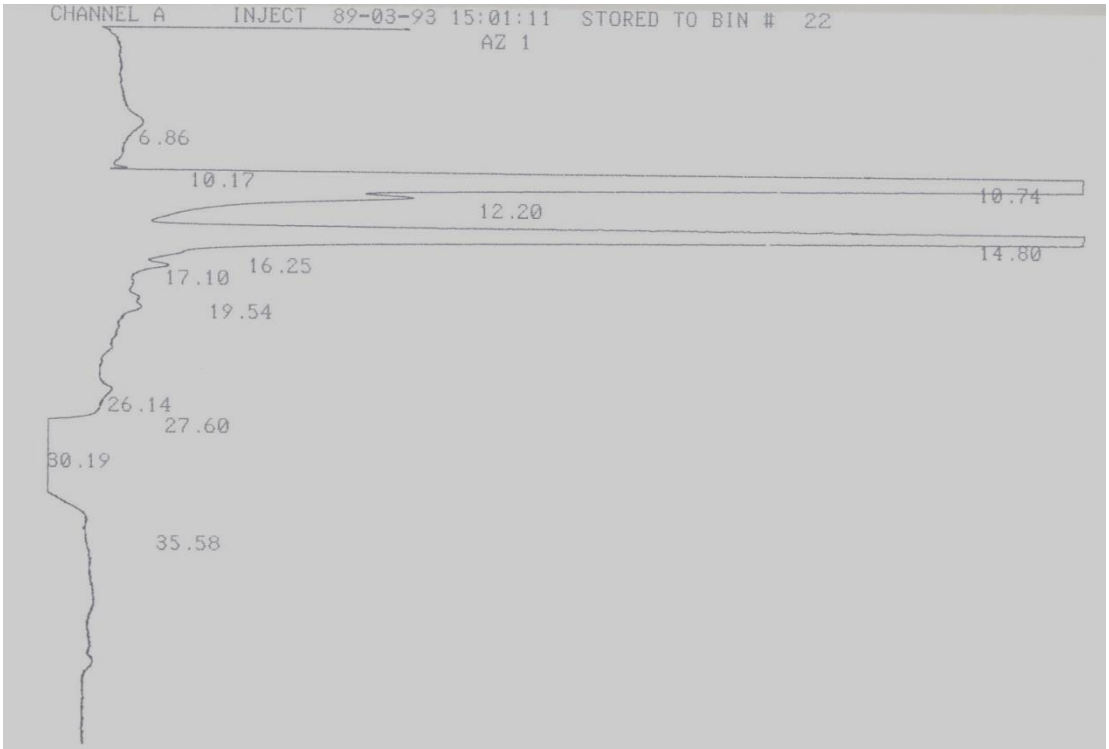
DATA SAVED TO BIN # 18

88-03-93 19:25:05 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 17 INDEX 17 BIN 18

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	73.835	10.67	10857788	02
2	4.048	12.19	595234	02
3	19.984	14.8	2938823	02
4	0.674	16.96	99134	02
5	0.412	18.24	60540	02
6	0.499	19.39	73312	02
7	0.291	22.03	42745	02
8	0.025	24.22	3644	03
9	0.045	28.46	6604	02
10	0.121	30.11	17809	02
11	0.067	31.23	9879	03
TOTAL	100.		14705512	

Tratamiento 5



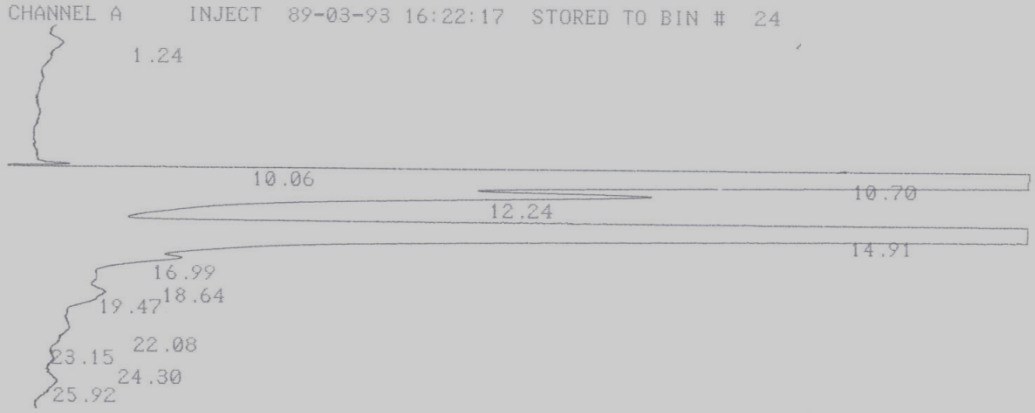
DATA SAVED TO BIN # 22

89-03-93 15:01:11 CH= "A" PE= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 21 INDEX 21 BIN 22

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	0.288	6.86	24667	01
2	0.024	10.17	2029	02
3	70.229	10.74	6011811	02
4	3.	12.2	256823	02
5	18.437	14.8	1578270	02
6	0.223	16.25	19059	02
7	0.265	17.1	22678	03
8	0.192	19.54	16405	01
9	2.084	26.14	178439	02
10	1.811	27.6	154991	03
11	0.144	30.19	12287	02
12	3.305	35.58	282879	03

Tratamiento 6



DATA SAVED TO BIN # 24

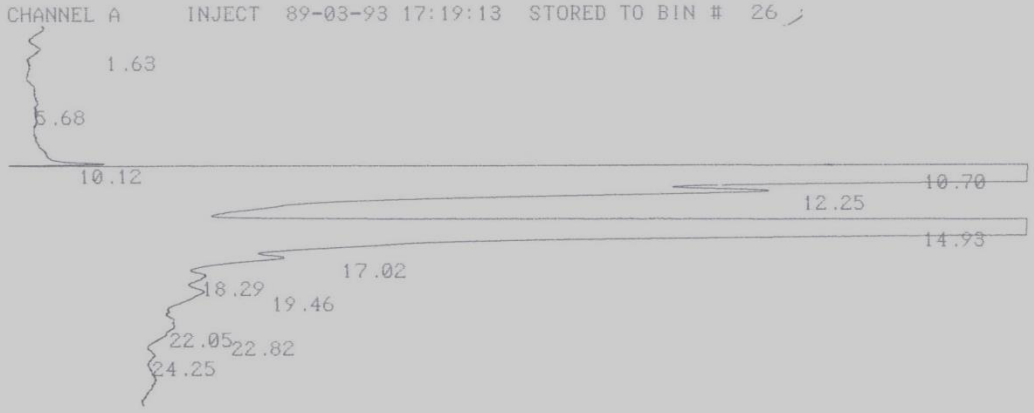
89-03-93 16:22:17 CH= "A" P$= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 23 INDEX 23 BIN 24

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	0.063	1.24	9095	01
2	0.054	10.06	7804	02
3	57.469	10.7	8281568	02
4	3.984	12.24	574183	02
5	35.655	14.91	5138115	02
6	0.866	16.99	124818	02
7	0.327	18.64	47135	02
8	0.797	19.47	114789	02
9	0.357	22.08	51396	02

Tratamiento 7

CHANNEL A INJECT 89-03-93 17:19:13 STORED TO BIN # 26



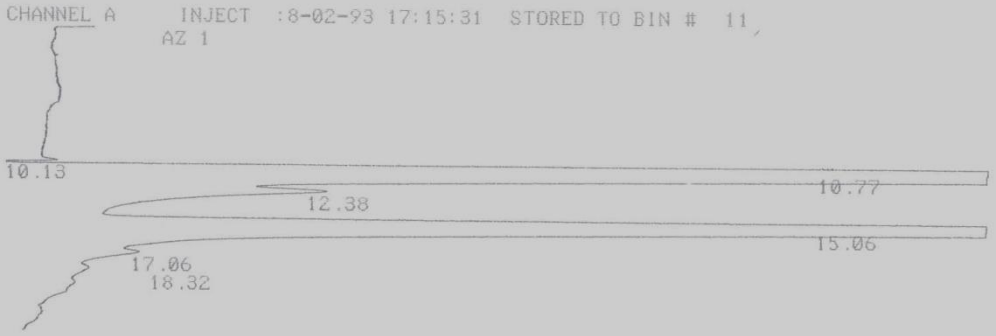
DATA SAVED TO BIN # 26

89-03-93 17:19:13 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 25 INDEX 25 BIN 26

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	0.035	1.63	6165	01
2	0.449	5.68	78227	02
3	0.139	10.12	24288	02
4	63.735	10.7	11112301	02
5	4.364	12.25	760848	02
6	27.018	14.93	4710619	02
7	1.095	17.02	190931	02
8	0.712	18.29	124221	02
9	1.161	19.46	202414	02
10	0.572	22.05	99716	02
11	0.223	22.82	38887	02
12	0.497	24.25	86652	03
TOTAL	100.		17435269	

Tratamiento 8



DATA SAVED TO BIN # 11

:8-02-93 17:15:31 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 11 INDEX 11 BIN 11

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	0.207	10.13	20626	02
2	68.037	10.77	6764534	02
3	4.482	12.38	445590	02
4	27.096	15.06	2693988	08
5	0.122	17.06	12151	05
6	0.056	18.32	5573	01
TOTAL	100.		9942462	