

SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR

DIRECCIÓN GENERAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
TECNOLÓGICA



SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA



**SEP**

## **TRABAJO PROFESIONAL**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TITULO DE:**

# **INGENIERA BIOQUÍMICA**

**QUE PRESENTA:**

**ALEXANDRA PASCACIO HERNÁNDEZ**

**CON EL TEMA:**

**“INMOVILIZACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS ASOCIADOS AL GRANO VERDE DE CAFÉ PARA LA DECOLORACIÓN DE UN AGUA RESIDUAL SINTÉTICA”**

**MEDIANTE:**

**OPCION I  
(TESIS PROFESIONAL)**

**TUXTLA GUTIERREZ, CHIAPAS**

**MAYO 2014**

# ÍNDICE

<b>Lista de figuras</b>	III
<b>Lista de tablas</b>	V
<b>Resumen</b>	VI
<b>1. Introducción</b>	1
<b>2. Marco Teórico</b>	3
2.1. Microorganismos del grano verde de café	3
2.2. Proceso textil	3
2.3. Colorantes	4
2.3.1. Clasificación de colorantes	5
2.3.2. Azul de Metileno	6
2.4. Tratamiento de aguas residuales	7
2.4.1 Tratamientos primarios	8
2.4.2 Tratamientos secundarios	8
2.4.3 Tratamientos terciarios	11
2.4.4 Tratamiento biológico	14
2.5 Tratamiento de los efluentes de la industria textil	15
2.5.1 Adsorción	15
2.5.2 Coagulación-Floculación	16
2.5.3 Oxidación	17
2.5.4 Métodos Electroquímicos	18
2.6 Inmovilización	19
2.6.1. Paja de cebada	21
2.6.2 Poliuretano	22
2.7. Enzima Glucosa Oxidasa	23
<b>3. Antecedentes</b>	25
3.1 Inmovilización de microorganismos para tratamiento de aguas residuales	25
3.2 Tratamiento de aguas residuales textiles con microorganismos	26

<b>4. Justificación</b>	27
<b>5. Objetivos</b>	29
<b>6. Materiales y métodos</b>	30
6.1. Microorganismos	30
6.2. Soportes	30
6.3. Colorante	30
6.4. Sistema de columna de burbujeo	30
6.4.1. Inmovilización en paja	30
6.4.2. Inoculación	31
6.4.3. Cinética	31
6.4.4. Determinación de la actividad de la enzima G.O	31
6.4.5. Determinación de azúcares totales por el reactivo de Antrona	32
6.4.6. Determinación de Proteína Total por el método de Bradford	32
6.4.7. Determinación de remoción de colorante	33
6.5. Sistema en matraces con relación C:N:F 100:10:1	33
6.5.1. Inmovilización en paja	33
6.5.2. Inoculación	33
6.5.3. Cinética	34
6.5.4. Determinación de Peróxido de Hidrogeno	34
6.6. Diseño experimental Plackett Burman	35
6.6.1. Inmovilización del inoculo en cubos de poliuretano	36
6.6.2. Determinación de Ácidos Orgánicos	37
<b>7. Resultados y discusiones</b>	38
7.1 Resultado de la inmovilización en paja y poliuretano	38
7.2 Resultados de las determinaciones en columnas de burbujeo	40
7.2.1. Actividad específica enzimática de Glucosa Oxidasa	40
7.2.2. Resultados de Proteína Total	40
7.2.3. Resultados Azúcares Totales	41
7.2.4. Reducción de color	42
7.2.5. Análisis espectrofotométrico	43

7.2.6. Relación del comportamiento de los parámetros obtenidos	45
7.3. Sistema en matraces con relación C:N:P 100:10:1	46
7.3.1. Actividad específica enzimática de Glucosa Oxidasa	46
7.3.2. Determinación de Proteína Total	47
7.3.3. Determinación de Azúcares Totales	48
7.3.4. Determinación de pH	49
7.3.5. Reducción de color	50
7.3.6. Relación entre parámetros	51
7.4. Diseño Placket-Burman	54
7.4.1. Producción de ácido oxálico y pH	54
7.4.2. Reducción de colorante	56
<b>8. Conclusiones y Recomendaciones</b>	<b>59</b>
<b>9. Bibliografía</b>	<b>61</b>
<b>10. Anexos</b>	<b>66</b>
Anexo A Curva Patrón Glucosa Oxidasa	
Anexo B Curva Patrón Proteína total	
Anexo C Curva Patrón Azúcares totales	
Anexo D Curva Patrón Peróxido de Hidrogeno	
Anexo E Curva Patrón Color	
Anexo F. Cromatogramas de ácidos orgánicos	

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 2.1 Ejemplos estructurales de colorantes textiles	6
Figura 2.2 Azul de Metileno	7
Figura 2.3 Microscopía de barrido electrónico para la inmovilización pasiva de <i>T. versicolor</i> en espuma de poliuretano a 200x	23
Figura 2.4 Glucosa Oxidasa	24
Figura 7.1 Inmovilización en paja	38
Figura 7.2 Paja al final del tratamiento	39

Figura 7.3 a) Cubos de poliuretano sin inóculo b) Cubos de poliuretano con inóculo	39
Figura 7.4 Actividad específica de Glucosa Oxidasa (GO) (U/mg )	40
Figura 7.5 Determinación de proteína	45
Figura 7.6 Determinación de Azúcares	42
Figura 7.7 Reducción de colorante Azul de Metileno (mg/L)	42
Figura 7.8- Columna tratamiento a distintas horas del experimento	43
Figura 7.9. Columna control a distintas horas del experimento	43
Figura 7.10- Barrido espectrofotométrico del tratamiento a las 12, 24 y 32 h	44
Figura 7.11 Barrido espectrofotométrico del Control a las 12, 24 y 32 h	44
Figura 7.12 Relación del comportamiento de los parámetros obtenidos	45
Figura 7.13.- Actividad específica glucosa oxidasa	47
Figura 7.14- Proteína total extracelular en función del tiempo	48
Figura 7.15- Azúcares totales en función del tiempo	49
Figura 7.16.- pH	50
Figura 7.17- Concentración de colorante en función del tiempo	51
Figura 7.18-. Muestra filtrada y sin filtrar	51
Figura 7.19.- GO, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y Actividad específica de GO en función del tiempo	52
Figura 7.20.- GO, Proteína y Azúcares en función del tiempo	53
Figura 7.21.- Colorante, Proteína, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y GO en función del tiempo	54
Figura 7.22.-.Reducción abiótica	56
Figura 7.23.-Día inicial del experimento con 20 ppm de azul de metileno	57
Figura 7.24- Degradación final (tercer día) del azul de metileno	57

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición química proximal de la paja de cebada (adapa Et al. 2009)	22
Tabla 2. Matriz codificada para Plackett- Burman	35
Tabla 3. Variables del diseño	36
Tabla 4. pH final y áreas de ac. oxálico a los tres días de cultivo para cada uno de los diferentes medios de cultivo del diseño Plackett-Burman	55

# RESUMEN

Debido al incremento de la producción en empresas textiles se han incrementado los efluentes contaminados con residuos de los colorantes usados. En particular, la flora microbiana del grano verde de café puede ser usada para el tratamiento de aguas residuales textiles. Cabe señalar que se pueden usar granos de café rechazados por su calidad en la industria cafetalera, por lo que a este residuo se le puede dar un uso para biorremediación.

Por otro lado, procesos biotecnológicos y de biorremediación utilizan microorganismos inmovilizados esto con el objetivo de evitar el lavado celular. Es por esto que los microorganismos de los granos verdes de café fueron inmovilizados en paja de cebada y poliuretano. En el caso de la paja de cebada se inmovilizaron agregándoselo al grano de café húmedo previamente incubado. En el caso de los cubos de poliuretano se realizó mediante una suspensión de esporas del grano de café. De ambos resulto mejor el poliuretano en cubos, en los que se apreciaba un mayor crecimiento de la biopelícula.

Con objeto de evaluar la eficiencia de los microorganismos inmovilizados se utilizó una columna de burbujeo y matraces de 250 y 500 mL. En los matraces se añadió carbono, nitrógeno y fósforo en una relación 100:10:1 y se obtuvo un 10% de remoción de colorante y en la columnas de burbujeo se alcanzó hasta un 10% de remoción de colorante. Finalmente se realizó un diseño experimental Plackett Burman con medios definidos y cubos de poliuretano y obteniéndose remociones de colorante de hasta un 60%, así mismo se determinó la presencia de ácido oxálico que es un producto de la degradación del colorante.

Los resultados obtenidos demuestran que los microorganismos inmovilizados de los granos de café pueden ser utilizados para la remoción de colorantes similares a los presentes en los efluentes contaminados de las industrias textiles



# CAPÍTULO 1

## 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 una sociedad 100% industrializada, lo que provoca mayor contaminación y a la vez una escasez de agua.

Una de las industrias que realiza mayores descargas de aguas residuales es la industria textil; ya que existe 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).

De contaminantes liberados al ambiente en los efluentes de este giro industrial los residuos de colorantes son una fracción importante. 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 oxidaciones o reducciones parciales pueden generar productos secundarios altamente tóxicos (Mansilla *et al.*).

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 puede llegar a suprimir los procesos fotosintéticos en los cursos de agua, que a lo largo de tiempo pueden agotar el oxígeno disuelto en la misma, por lo que su presencia debe de ser reducida (Sankar *et al.*, 1999).

Actualmente, para disminuir los efectos contaminantes de los efluentes de agua de la industria textil, se están haciendo uso de herramientas

biotecnológicas entre los cuales se encuentran los microorganismos (Manzano *et al.*, 2004).

Los microorganismos asociados al grano verde de café han sido utilizados para la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, por lo que se cree que puede ser utilizada para el tratamiento de aguas residuales textiles.

Estos microorganismos al estar inmovilizados en un soporte tienen ventajas como son una mayor tolerancia a compuestos tóxicos, mayor control de la concentración de la biomasa ya que en sistemas acuáticos la biomasa puede ser arrastrada. El uso de soportes biodegradables como la paja, al contener ciertos macro y micronutrientes esenciales para el metabolismo de los microorganismos, inmovilizados de esta manera ya no sería necesaria la adición de fuentes de nutriente adicional

Se ha reportado anteriormente que algunos hongos como los ligninolíticos han sido capaces de decolorar colorantes, esta decoloración se les atribuye a las enzimas de estos hongos, como es el caso de la lacasa del hongo *Trametes versicolor*.

En este trabajo se determinó la capacidad de remoción empleando a la paja de cebada como soporte lignocelulósico para los microorganismos asociados al grano verde 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 mismo se determinó la actividad de la enzima glucosa oxidasa implicada en la producción de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y en el proceso de decoloración.

# CAPÍTULO 2

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Microorganismos del grano verde de café

El grano verde de café contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento de microorganismos. En otras investigaciones se han empleado residuos de café (de calidad inferior) en suelos contaminados con hidrocarburos y en condiciones específicas de cultivo, para mejorar la limpieza del suelo contaminado (Rodríguez y col, 2011)

En el trabajo de Barragán *et al.* (2007) se aislaron de los granos verdes de café *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Stenotrophomas maltophilia*, *Flaviononas oryzihabitans* y *Margonella marganii*; la mayoría de estas bacterias tienen capacidad para degradar contaminantes orgánicos. Los hongos aislados de los granos de café capaces de crecer con fenantreno como única fuente de carbono eran *Mucor sp.*, *Aspergillus sp.*, *Aspergillus niger* y *Penicillium sp.*

### 2.2 Proceso Textil

La industria textil es uno de los sectores industriales de mayor complejidad, debido a que se trata de un sector muy fragmentado y heterogéneo, formando principalmente por pequeñas y medianas empresas (Pey, 2008).

El proceso textil comprende de tres fases: hilatura, tejeduría y acabados. Los efluentes industriales se generan principalmente en el proceso de acabados, éste se define como cualquier proceso realizado sobre el hilo o tejido para cambiar la apariencia, el tacto y su comportamiento, que comprende el

descruce, blanqueo y teñido. En estas etapas se agregan una serie de insumos químicos, tales como tintes, detergentes, agentes estabilizantes, agentes humectantes, dispersantes y penetrantes, sales inorgánicas como sosa cáustica, sal textil, peróxido de hidrógeno, ácido acético, etc., los cuales son en su mayor parte lavados y retirados con el efluente (Salas 2003).

Los procesos de la industria textil no liberan grandes cantidades de metales; sin embargo, aun las pequeñas concentraciones involucradas pueden producir acumulación en los tejidos de animales acuáticos. Muchas veces los efectos se observan a largo plazo, y en la mayoría de los casos son difíciles y costosos de tratar (Mansilla *et al.*).

El color es el primer contaminante en ser reconocido en el agua, afectando el valor estético de ésta, así como también la transparencia, la disolución del oxígeno y otros gases en lagos, ríos y otros cuerpos hídricos. Generalmente es más importante la remoción de color que de sustancias orgánicas incoloras (Moreno y Ospina 2008).

La concentración de colorantes presentes en el agua residual textil, muestran variaciones, dependiendo del material que se procesa, de las tonalidades en que se coloree el material y del porcentaje de eficiencia del teñido. Dichos porcentajes de eficiencia o fijación, están determinados por el tipo de colorante y las variables del proceso (Colindres, 2010).

### **2.3 Colorantes**

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 (Moeller y Garzón, 2003). El compuesto está constituido por tres grupos funcionales; el cromóforo, que es el grupo

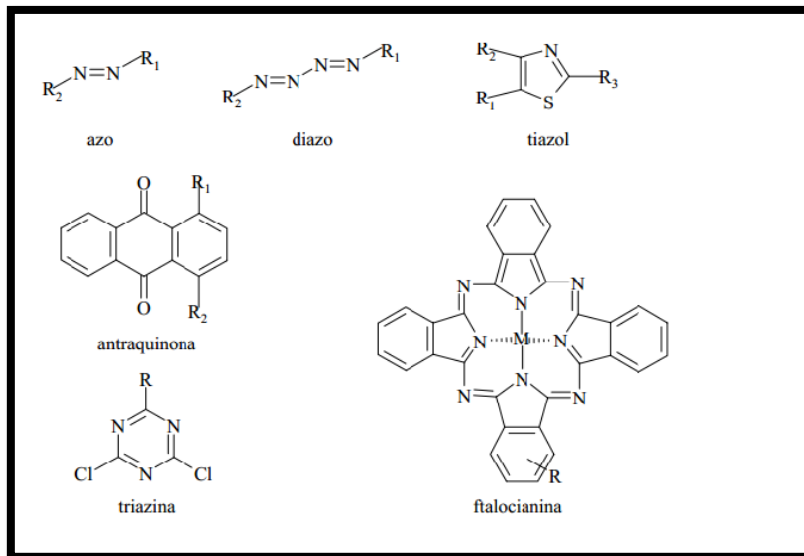
responsable de la adsorción de la luz dándole propiedad de color, los auxóchromos, que le dan la afinidad por la fibra e intensifican el color y por último el solubilizador, que le da afinidad a diversos disolventes y está dado por la presencia de iones como  $\text{SO}_3\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_3\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_2\text{NH}_2^+$ ,  $\text{ONa}^+$ , (Antonella *et al.*, 2009).

Las moléculas de los colorantes empleados en la industria textil son de estructura muy variada y compleja, todos ellos están diseñados para resistir las degradaciones producidas por diferentes agentes externos. La gran mayoría son muy solubles en agua, resistentes a la acción de productos químicos y poco biodegradables (Pey, 2008)

### **2.3.1. Clasificación de los colorantes**

Los colorantes textiles pueden ser clasificados de acuerdo a su aplicación a la fibra o por su constitución química. De acuerdo a su aplicación a la fibra pueden clasificarse en ácidos, básicos, directos, dispersos, mordientes, reactivos y a la tinta; esta clasificación se basa en las condiciones en las cuales se efectúa el proceso de tintura. La segunda clasificación se hace con base en el grupo cromóforo principal que constituye el colorante; el Color Índex (4ta edición) usa la siguiente clasificación: Nitroso, nitro, azo, azoico, estilbeno, diarilmetano, triarilmetano, santeño, quinoleína, metino, acridina, azufre, tiazol, tiamina, indamina, azina, oxacina, lactona, antraquinona, indigoide y ftalocianina (Garzón, 2009).

Un 60% de los colorantes de uso en la industria textil actual son los colorantes reactivos, que se caracterizan por formar una unión éter con la fibra, lo que garantiza una mayor duración del color en el tejido. Sus estructuras frecuentemente contienen grupos azo, antraquinona o ftalocianina (Garzón, 2009).



**Figura 2.1** Ejemplos estructurales de colorantes textiles (adaptado de Mansilla *et al.*)

Los colorantes reactivos tienen una gran importancia tanto como en la tintura como en la estampación, presentan una amplia gama de matices y gran versatilidad en cuanto a procesos de aplicación. Se utilizan principalmente en la tintura de fibras celulósicas (Pey, 2008).

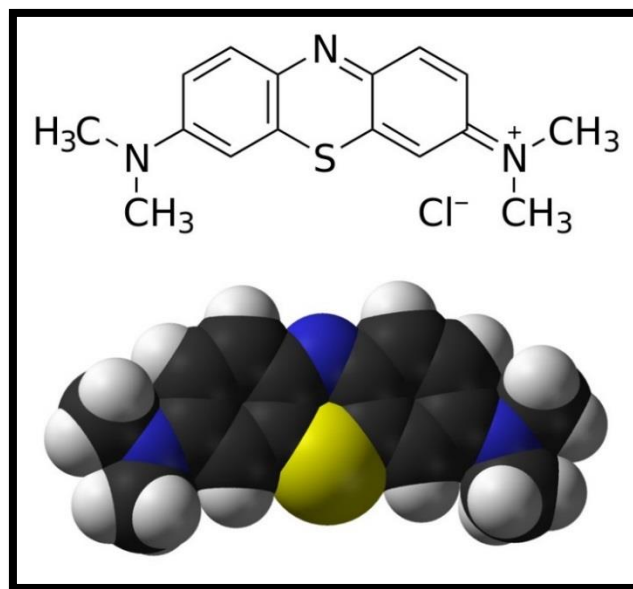
### 2.3.2. Azul de metileno

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 triazina. 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 poligráficas. (Garzón y Barragán 2008)



**Figura 2.2** Azul de Metileno (Adaptado de Bautista, 2011)

## 2.4 Tratamiento de aguas residuales

Los tratamientos convencionales utilizados para la eliminación de los contaminantes se describen a continuación

### **2.4.1 Tratamientos primarios**

Los tratamientos primarios implican la reducción de sólidos en suspensión y lograr las condiciones adecuadas para el tratamiento secundario, para esto se aplican los procesos de

Homogenización, es una operación unitaria que tiene como finalidad uniformar el flujo, la carga de contaminantes y las condiciones fisicoquímicas (pH, temperatura, etc.) de las aguas residuales en la planta de tratamiento.

Neutralización, Antes de pasar a los tratamientos secundarios es importante efectuar la neutralización para lograr una mayor eficiencia de estos sistemas.

Sedimentación, es la separación de partículas suspendidas más pesadas que el agua mediante la acción de la gravedad. Este se basa en la diferencia de gravedad específica entre el material sedimentable y el agua, por consiguiente, cualquier factor que afecte tal característica afectará la velocidad de sedimentación.

### **2.4.2 Tratamientos secundarios**

Estos comprenden 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 y anaerobios.

Dentro de los primeros se tienen



## Tratamiento con lodos activados

Es un proceso de tratamiento por el cual el agua residual y el lodo biológico (microorganismos que utilizan nutrientes en solución para el crecimiento celular, contribuyendo a la limpieza del agua residual) son mezclados y aireados en un tanque denominado reactor. Los flóculos biológicos formados en este proceso se sedimentan en un tanque de sedimentación, lugar del cual son recirculados nuevamente al tanque aireador o reactor. En el proceso los microorganismos son completamente mezclados con la materia orgánica en el agua residual de manera que esta les sirva como sustrato alimenticio.

## Lagunas aireadas

Son balsas con profundidades de 1 a 4 metros en las que la oxigenación de las aguas residuales se realiza mediante unidades de aireación bien sean superficiales, turbinas o difusores. La diferencia fundamental entre lagunas aireadas y el sistema de lodos activados es que en este se lleva a cabo la recirculación del lodo como forma de controlar la cantidad de lodo biológico en el reactor de aireación. Las lagunas aireadas son sistemas sin reciclado de lodo.

## Balsas de estabilización de aguas residuales

En las balsas de estabilización no se utiliza equipo de aireación. El oxígeno necesario en las balsas se obtiene de la superficie natural de aireación y de las algas que producen oxígeno por la fotosíntesis. El oxígeno liberado por las algas se utiliza por las bacterias para la degradación aerobia de la materia orgánica.

Los productos de degradación (CO<sub>2</sub>, amoníaco, fosfatos) son utilizados de nuevo por las algas.

### Filtros percoladores

Estos pertenecen a los reactores de crecimiento asistido, en los que se utiliza algún tipo de soporte del crecimiento biológico, el cual se mantienen fijo en él. El filtro percolador es un relleno cubierto de limo biológico, a través del cual se percola el agua residual.

### Biodiscos

Su principal ventaja es el bajo consumo de energía y fácil mantenimiento. Su funcionamiento se basa en la rotación de un disco sumergido en el agua a tratar. Este movimiento provoca la transferencia de oxígeno entre la atmosfera y la flora microbiana aeróbica adherida a los rellenos contenidos en los discos. Está a través de procesos bioquímicos degrada y elimina la materia orgánica.

Dentro de los anaerobios se tiene

### Biodigestor

Es un aparato que facilita el crecimiento y la proliferación de un grupo de bacterias anaerobias metanogénicas que descomponen y tratan los residuos. El uso de digestores anaerobios es más común cada día, ya sea para el tratamiento de excretas animales, la producción de biogás, la purificación de aguas residuales y la elaboración de biofertilizantes.

Existen varios tipos de biodigestores y se clasifican según el régimen de carga y la dirección del flujo en su interior.

Flujo continuo: son los que reciben su carga por medio de una bomba que mantiene una corriente continua.

Flujo semi-continuo: son los que reciben una carga fija cada día y aportan la misma cantidad

Estacionarios: son los que se cargan de una sola vez y pasado el tiempo de retención se vacían completamente.

Flujo horizontal (tubulares) se cargan por un extremo y la carga diaria va desplazando por su interior la precedente.

Flujo ascendente la carga se inyecta en el fondo del recipiente y fluye hacia la parte superior

En este tratamiento los productos finales de la degradación son gases, como el metano, CO<sub>2</sub> y pequeñas cantidades de sulfuro de hidrógeno, mercaptano e hidrógeno, 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).

### **2.4.3 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.

## Eliminación de sólidos en suspensión

Los sólidos en suspensión, es la medida de los sólidos sedimentables y de los no sedimentables, que pueden ser retenidos en un filtro. La presencia de sólidos en suspensión incrementa la turbidez del agua y la de los sólidos disueltos. Estos sólidos en suspensión producen el color aparente en las aguas y disminuyen el paso de radiación solar, lo que lleva consigo una disminución de la fotosíntesis y muerte de las plantas a las que no les llega esta radiación.

La presencia de sólidos en suspensión en el agua puede dar lugar a la existencia de colonias bacterianas en lugares donde estos sólidos podrían acumularse por falta de flujos o flujos muy lentos. Para conseguir una mayor eliminación de sólidos en suspensión de los efluentes de los procesos de tratamientos biológicos y químicos se emplea la filtración, también se utiliza para la eliminación del fósforo precipitado por vía química, y como etapa previa de un proceso de electrodiálisis.

La filtración puede efectuarse de muchas formas: con baja carga superficial (filtros lentos) o con alta carga superficial (filtros rápidos), en medios porosos (pastas arcillosas, papel filtro) o en medios granulares (arena, antracita, granate o combinados), con flujo ascendente; descendente y mixto (parte ascendente y parte descendente). Por otro lado, el filtro puede trabajar a presión o por gravedad, según sea la magnitud de la carga hidráulica que exista sobre el lecho filtrante. (Otero, 2007).

## Oxidación química

Históricamente el uso de reactivos químicos oxidantes en el tratamiento de aguas se encaminó en sus comienzos hacia la esterilización del agua o, más exactamente, hacia la destrucción de gérmenes patógenos, ya sea como único método, o como una etapa final complementaria de otros tratamientos (Gomella y Guerre, 1997).

Los reactivos utilizados han sido el cloro y sus compuestos, el bromo, el yodo, el ozono y el permanganato potásico.

Actualmente los reactivos que se utilizan con mayor frecuencia con objeto de destruir gérmenes patógenos, son el cloro y sus compuestos; sin embargo, debido a sus evidentes inconvenientes organolépticos y a su creciente complejidad de su forma de empleo, así como a las interferencias que producen con otras sustancias presentes en el agua tratada, la ozonización ocupa cada vez más un lugar preponderante.

## Osmosis inversa

La ósmosis es un proceso natural, en el cual un fluido pasa a través de una membrana semipermeable, de una zona de baja concentración a una de alta concentración hasta alcanzar el equilibrio, este fenómeno es debido al potencial químico de cada una de las sustancias, el cual está en función de la temperatura, presión y concentración de los sólidos disueltos. En la ósmosis inversa el agua se inyecta a altas presiones sobre un conjunto de membranas semipermeables. No se trata de un proceso de filtración si no de un mecanismo de disolución-difusión. Las sustancias que pueden disolver y difundir pasan. Retiene casi todo menos los compuestos orgánicos pequeños.

La técnica de ósmosis inversa es la que tiene el mayor poder de retención, que alcanza hasta el no permitir el paso de las sales monovalentes disueltas. (García, 2002)

#### **2.4.4. Tratamientos biológicos**

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

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 y Garzón, 2003).

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).

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).

## **2.5 Tratamiento de los efluentes de la industria textil**

Los colorantes pueden ser removido de aguas residuales por métodos físico-químicos que incluyen: adsorción, coagulación-floculación, oxidación y métodos electroquímicos.

### **2.5.1 Adsorción**

La adsorción constituye uno de los procesos más utilizados dentro de los sistemas de tratamiento terciario de las aguas residuales. Se emplea fundamentalmente para retener contaminantes de naturaleza orgánica, presentes en general, en concentraciones bajas, lo que dificulta su eliminación por otros procedimientos. Cabe citar la eliminación de compuestos fenólicos, hidrocarburos aromáticos nitrados, derivados clorados, sustancias coloreadas, así como otras que comunican olor y sabor a las aguas.

La separación por adsorción se basa en tres mecanismos diferentes: estérico, cinético y de equilibrio. En el mecanismo de separación estérico, el adsorbente tiene poros de dimensiones tales que permite el paso sólo de las moléculas más pequeñas. El mecanismo de equilibrio se basa en que los adsorbentes presentan afinidades diferentes para acomodar distintas especies: la que se retenga más fuertemente será la que se elimine preferentemente. El mecanismo cinético se fundamenta en las diferentes velocidades de difusión de los compuestos en los poros; el tiempo de exposición determina que la especie que difunda más rápidamente sea la que se elimine preferentemente retenida por el sólido.

Los adsorbentes más empleados son el gel de sílice, la alúmina y, sobre todo, el carbón activo y determinadas resinas sintéticas.

### **2.5.2 Coagulación-floculación**

El tinte no fijado en la tela y removido por el agua en el efluente son partículas coloidales de gran volumen y poco peso con especiales propiedades superficiales y cargadas eléctricamente. Se caracterizan por su gran estabilidad, que impide que se junten, pudiendo mantenerse indefinidamente en el seno del líquido que los contiene. Esta estabilidad es debida a que la energía cinética que poseen es menor que la energía potencial resultante de la repulsión electrostática y fuerzas de Van der Waals entre partículas. Ya que esto impide el choque de las partículas de tinte y que formen así masas mayores, llamados flóculos, las partículas no se asientan. La coagulación desestabiliza estos coloides, al neutralizar las fuerzas que los mantienen separados. Esto se logra por lo general añadiendo coagulantes químicos y aplicando energía de mezclado. Las sustancias químicas cancelan las cargas eléctricas sobre la superficie del coloide, permitiendo que las partículas coloidales se aglomeren formando flóculos.

Estos flóculos inicialmente pequeños crean al juntarse aglomerados mayores de baja densidad que pueden ser separados por flotación con aire disuelto. El proceso de desestabilización es la coagulación (neutralización de la carga); la etapa de formación de flóculos es la floculación. (Salas, 2003)

Los casos más frecuentes en los que se utiliza la coagulación son la clarificación, la decoloración, la eliminación de precipitados de carbono cálcico y de hidróxido magnésico (ablandamiento con cal), la eliminación de materia orgánica. (Gomella y Guerre, 1997)



### 2.5.3 Oxidación

Los procesos de oxidación avanzada prometen ser unos de los métodos más eficientes para la remoción de contaminantes no biodegradables contenidos en aguas superficiales y subterráneas. Implican la generación de especies intermediarias altamente reactivas (radicales) que inician la oxidación de compuestos orgánicos. En soluciones acuosas, el radical hidroxilo ( $\text{HO}\cdot$ ), de elevado potencial de oxidación, es la especie principal que inicia la mayoría de los procesos de oxidación avanzada. Existen diferentes alternativas para la formación de estos radicales: UV/ $\text{H}_2\text{O}_2$ , UV/Ozono, Ozono/ $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  (reactivo de fenton), UV/ $\text{TiO}_2$  (fotocatálisis heterogénea), oxidación supercrítica del agua, etc. (Colindres, 2010)

Los radicales  $\text{HO}\cdot$  Generados en disolución son los responsables de la oxidación de los compuestos orgánicos (RH en la ecuación 1) por captura de hidrógeno y formación de un radical orgánico (ecuación 1), que puede reaccionar con el oxígeno atmosférico formando peroxirradicales (ecuación 2) que dan lugar a una serie de reacciones de degradación oxidativa, alcanzando en algunos casos la mineralización completa de la materia orgánica.



Los radicales hidroxilo pueden actuar frente a los compuestos orgánicos (R en la ecuación 3) mediante otros mecanismos de reacción, como la adición electrofílica (ecuación 3) o la transferencia de electrones (ecuación 4).



De igual forma se pueden producir recombinaciones entre radicales hidroxilo para formar peróxido de hidrógeno (ecuación 5), o se pueden formar radicales perhidroxilo en presencia de exceso de peróxido de hidrógeno (ecuación 6). Radical perhidroxilo que parece no contribuir a las degradaciones oxidativas, por su menor reactividad.



Los procesos de oxidación avanzada se clasifican en procesos fotoquímicos y no fotoquímicos, en función de la utilización o no de los radicales luminosos en el proceso. (Pey, 2008)

La desventaja se presenta en cuanto a un alto costo comparado con los procesos biológicos, sin embargo el uso de un proceso de oxidación avanzada puede mejorar la biodegradabilidad de aguas residuales o lograr una casi completa remoción utilizándolo como pre-tratamiento o post-tratamiento respectivamente (García *et al.*,2011)

#### **2.5.4 Métodos electroquímicos**

Los métodos electroquímicos de tratamiento de aguas residuales como la electroflotación, eletrodecantación y la electrocoagulación, involucran el uso de una celda electrolítica y un par de electrodos metálicos a través de los cuales se hace circular una corriente eléctrica.

Con esta tecnología se han implementado diversas estrategias (directas o indirectas) realizando tanto oxidaciones como reducciones del contaminante. En la electrólisis directa, la especie es oxidada (en el ánodo) o reducida (en el cátodo) en la superficie de uno de los electrodos; mientras que en la indirecta

la sustancia de interés es degradada por especies generadas electroquímicamente (Sarria *et al.*, 2005).

De todas las técnicas electroquímicas conocidas se tiene mayor interés en emplear la electrocoagulación como método de tratamiento de aguas residuales que contengan metales pesados, residuos de grasa, tintes textiles, partículas suspendidas, suspensiones acuosas de partículas ultra finas, nitratos, fenoles, arsénico y contaminantes orgánicos, y se emplea para potabilizar agua.

La electrocoagulación es un método electroquímico de tratamiento de aguas donde un electrodo de sacrificio se corroe para que se lleve a cabo la coagulación, es un proceso complicado que envuelve varios mecanismos químicos y fenómenos físicos, que emplea electrodos consumibles para suplir iones en el agua residual. Un proceso de electrocoagulación involucra tres etapas sucesivas:

Formación de los coagulantes por oxidación electrolítica del electrodo de sacrificio.

Desestabilización de los contaminantes, partículas suspendidas y rompimiento de emulsión

Agregación de las fases desestabilizadas para formar flocs.

## **2.6 Inmovilización**

La inmovilización celular es el confinamiento físico o localización de células intactas a una región definida del espacio determinado con la conservación de alguna actividad catalítica deseada (Karel *et al.*, 1985). Ha sido estudiada durante las últimas décadas como la solución y el mejoramiento de sistemas

de tratamiento de aguas, suelos y aires contaminados. (Garzón y Barragán, 2008)

Constituye una alternativa común para llevar a cabo la eliminación de componentes indeseables del agua, aprovechando la actividad metabólica de los mismos sobre esos componentes trayendo consigo muchas ventajas como son

Mayor actividad metabólica por parte de las células inmovilizadas.

Fácil recuperación de las células con la mezcla de la reacción.

Mayor superficie de contacto.

Se puede trabajar con mayor cantidad de biomاسas en un reactor.

Disponibilidad homogénea de nutrientes y oxígeno para las células.

Mayor resistencia a la toxicidad y cambios ambientales.

La aplicación tradicional consiste en la eliminación de materia orgánica biodegradable, tanto soluble como coloidal, así como la eliminación de compuestos que contienen elementos nutrientes (N y P). Es uno de los tratamientos más habituales, no solo en el caso de las aguas residuales urbanas, si no también industriales, entre las que están papelera, textilera y curtiembre entre otras, encontrando buenos resultados en cuanto a la remoción de color, fenoles y compuestos clorinados y adquiriendo como ventaja de su utilización la fácil separación del bioportador en el agua tratada (Herrera y Rosas, 2003).

Existen una multitud de métodos de inmovilización, Estos se pueden dividir en cuatro categorías principales basados en el mecanismo físico que causa la inmovilización. (Karel *et al.*, 1985)

Adherencia a una superficie

Atrapamiento dentro de una matriz porosa

Detrás de una barrera de contención  
Agregación de sí mismo

Los materiales utilizados para inmovilizar células pueden ser de dos tipos: inorgánicos y orgánicos; dentro de los primeros se destacan la celulosa, estropajo, viruta, salvado de trigo, cascarilla de cebada, fique y dentro de los inorgánicos la porcelana porosa, fibra de vidrio poroso, espuma de poliuretano, alginato, nylon y soportes de sílica (Fernández y Henao, 2007).

### **2.6.1 Paja de Cebada**

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

El cultivo de los hongos en un medio sólido de origen lignocelulósico 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 y son 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 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 2.1** Composición química proximal de la paja cebada (Adapa *et al.*, 2009)

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

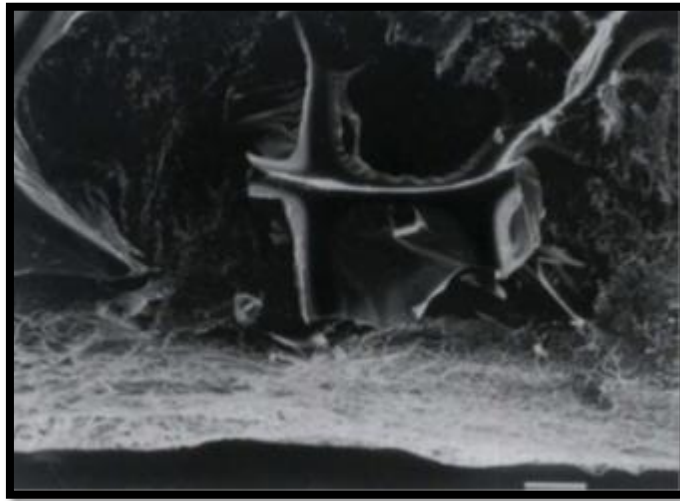
### 2.6.2 Poliuretano

Los poliuretanos generalmente son creados al hacer reaccionar un diisocianato, como el diisocianato de tolueno (TDI), con un polioliol formulado. Estos son polímeros muy versátiles que permiten la creación de nuevos materiales. Esto se debe principalmente a la manera que se sintetizan y la amplia gama de diferentes componentes que se pueden utilizar para formar diversos poliuretanos. Los componentes más habituales que interfieren en la formulación de un poliuretano son macroglicoles, isocianatos, alargadores, catalizadores, y aditivos como emulsionantes, estabilizantes, pigmentos, cargas inorgánicas y plastificantes.

Las espumas flexibles de poliuretano (PU) poseen celdas abiertas, son permeables al aire, reversibles a la deformación y pueden ser producidas con diversas propiedades, incluyendo firmeza y resiliencia.

El poliuretano es un material ampliamente usado en la inmovilización de microorganismos gracias a su resistencia en condiciones ambientales

diferentes. La espuma de poliuretano permite la inmovilización de microorganismos por adsorción. Se espera que los microorganismos se adhieran y crezcan formando un biofilm en las paredes de cada uno de los poros.



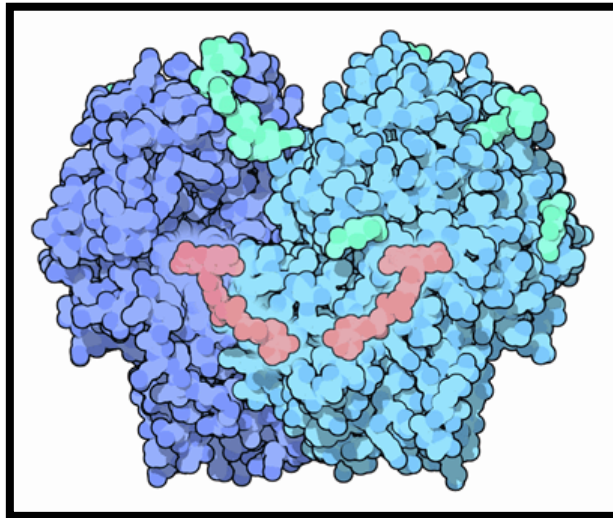
**Figura 2.3** Microscopía de barrido electrónico para la inmovilización pasiva de *T. versicolor* en espuma de poliuretano a 200x.

(Castillo y González, 2007)

## 2.7 Enzima glucosa oxidasa

La glucosa oxidasa es una glicoproteína dependiente de FAD, que cataliza la oxidación de la  $\beta$ -Dglucosa, por la vía del D-glucano- $\delta$ -lactona, hacia ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, usando el oxígeno molecular como aceptor final de electrones. En las células contribuye a degradar los azúcares hacia sus metabolitos. Usualmente es extraída a partir de las cepas de *Aspergillus niger* y *Penicillium glaucum*, aunque actualmente se han encontrado muchas especies productoras; sin embargo, las de mayor rendimiento pertenecen a estos dos géneros.

Es muy utilizada a nivel industrial, es un aditivo importante para la conservación de alimentos y forma parte de los reactivos para la determinación de la glicemia y otros parámetros clínicos, también se utiliza para la fabricación de biosensores sensibles a glucosa.



**Figura 2.4** Enzima Glucosa oxidasa



# CAPÍTULO 3

## ANTECEDENTES

### 3.1 Inmovilización de microorganismos para tratamiento de aguas residuales textiles

Las sustancias toxicas vertidas a distintas aguas por las industrias son un problema. Se han empleado numerosas técnicas con el fin de minimizar el impacto que causan al ambiente.

Con el fin de contrarrestar este problema se han implementado soluciones que implican el uso de microorganismos tale como hongos, bacterias y algas, los cuales tienen capacidad de degradar estas sustancias.

Para lograr mayor eficiencia de estos sistemas biológicos se ha impulsado el uso de la inmovilización de la biomasa activa. Esta biomasa puede ser inmovilizada en distintos materiales como son el poliuretano, estropajo, paja, carbón activado, etc.

En el trabajo de Díaz (2011) utilizó paja y cubos de pino para la inmovilización de *Trametes Versicolor* y microorganismos asociados al grano verde de café para la reducción de contaminantes de un agua residual.

Gomez y colaboradores (2005) implementaron el uso de espuma de poliuretano para el tratamiento del efluente proveniente de una industria papelera, inmovilizando *Trametes Versicolor*. Para descontaminación de aguas con compuestos fenólicos en aguas contaminadas se inmovilizo peroxidasa de chayote en un soporte orgánico poliestireno-divinilbenceno funcionalizado con triglicina y activado con 1,1'carbonildiimidazol.

### 3.2 Tratamiento de aguas residuales textiles con microorganismos

Los microorganismos a menudo son empleados en la biorremediación de efluentes contaminados con colorantes. Una gran parte de estos microorganismos son los hongos de la podredumbre blanca como son *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* y *Phanerochaete chrysosporium*, entre otros.

Domínguez y colaboradores (2005) utilizaron *Trametes versicolor*, para la decoloración de colorantes sintéticos textiles. Chang y Colaboradores (2001) utilizaron *Pseudomonas luteola* para la degradación del colorante Rojo reactivo 22.

Mazamanci y colaboradores (2005) inmovilizaron *Funalia trogii* en estropajo, para degradar una solución con el colorante Negro Reactivo 5. Castillo y Gonzáles (2007) lograron una decoloración del 92% del mismo colorante con *Trametes versicolor*. Moreno y Ospina (2008) utilizaron *Pleurotus ostreatus*.

Para la degradación de colorantes textiles de diferentes clases químicas se utilizaron hongos y bacterias como son *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Bacillus sp* y cuatro cepas del Género *Klebsiella*, (Garzon, 2009)

## **CAPÍTULO 4**

# **JUSTIFICACIÓN**

Actualmente según cifras de la Secretaría de Economía, hay más de 3 mil 750 plantas maquiladoras en el país. Estas empresas generan un volumen aproximado de 64,196.00 litros/día (SEMARNAT, 2008) de aguas residuales, los cuales contienen un gran porcentaje de colorantes asociados, por lo que es importante desarrollar tecnologías para eliminar estos contaminantes.

Con objeto de eliminar estos colorantes se han desarrollado procesos físicos, químicos y microbiológicos. Los tratamientos físicos como la adsorción tienen la desventaja de que se tiene que recuperar el adsorbente lo que genera un costo, los tratamientos químicos pueden generar subproductos más contaminantes, los tratamientos microbiológicos con microorganismos tienen un gasto de energía y un costo menor.

En particular los microorganismos asociados al grano verde de café, tiene un potencial para su uso en la biorremediación de suelos, estos podrían utilizarse para la biorremediación de aguas residuales. Cabe señalar que se pueden usar granos de café que son rechazados por su calidad en la industria cafetalera, Por lo que a este residuo se le puede dar un uso para biorremediación.

Estos microorganismos deben ser inmovilizados en un soporte, porque en su forma libre pudiese llevarse un efecto de “lavado celular”. Un soporte serviría para darle estabilidad mecánica y química a dichos microorganismos. Este soporte es usualmente inerte y no interactúa con los microorganismos, como el poliuretano. Sin embargo existen soportes no inertes como la paja, esta puede actuar para soportar a los microorganismos del grano de café y así

mismo proveería de los nutrientes necesarios para su supervivencia, otra de las ventajas de estos soportes es su fácil disponibilidad y bajo costo.

El uso de microorganismos es una buena alternativa, ya que estos poseen una maquinaria enzimática que degradan estos compuestos, son una buena solución puesto que no generan compuestos intermediarios tóxicos además de disminuir el color presente en el agua.

# **CAPÍTULO 5**

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de los microorganismos asociados al grano verde de café inmovilizados en paja de cebada y espuma de poliuretano en la decoloración de un agua residual sintética (azul de metileno).

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Inmovilizar los microorganismos presentes en los granos de café en paja de cebada y en espuma de poliuretano.
2. Evaluar la decoloración del agua residual sintética en una columna de burbujeo monitoreando: actividad enzimática de glucosa oxidasa, proteína total, azúcares totales y reducción del color.
3. Evaluar la decoloración del agua residual sintética a nivel matraz agregando C: N: F y monitoreando: actividad enzimática de glucosa oxidasa, proteína total, azúcares totales, peróxido de hidrógeno y reducción del color.
4. Establecer un diseño experimental de Plackett Burman usando como factores las concentraciones de glucosa y sacarosa así como la fuente de N, P y S teniendo como factores de respuesta ácidos orgánicos y la reducción de color.

# **CAPÍTULO 6**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 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.

### **6.2 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<sup>3</sup>.

### **6.3 Colorante**

El colorante a usar fue azul de metileno en concentraciones de 10 y 20 ppm.

### **6.4 Sistema en columnas de burbujeo**

#### **6.4.1 Inmovilización en paja**

Esta inmovilización se llevó a cabo pesando 0.8g 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 se agregó 0.8g de paja previamente remojada por 24 horas. En total se incubó por 5 días.

#### **6.4.2 Inoculación**

A las columnas de burbujeo con 800mL de agua destilada se les agregó el inóculo. A las columnas de burbujeo “control” se les vertieron 0.8g de grano de café y 0.8g de paja estéril y los 800mL de agua sin esterilizar. Los experimentos se realizaron bajo condiciones de no esterilidad.

#### **6.4.3 Cinética**

Se tomaron muestras a las 0, 8, 16, 24,48 y 56 horas, transcurridas 16 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.

#### **6.4.4 Determinación de actividad enzimática de glucosa oxidasa**

La glucosa es oxidada a D-glucono- $\delta$ -lactona y peróxido de hidrógeno por la GO. El peróxido de hidrógeno es posteriormente utilizado para oxidar al sustrato cromogénico (ABTS) en una segunda reacción con la peroxidasa de rábano (POD) lo que resulta en un cambio de color. La intensidad del color, medida a 420nm, es proporcional a la concentración de peróxido de hidrógeno. Una unidad de la enzima se define como la cantidad de enzima requerida para producir 1 $\mu$ mol de peróxido de hidrógeno por minuto bajo las condiciones estándares del ensayo.

Se agregaron en orden 630 $\mu$ L de ABTS-regulador, 320  $\mu$ L de peroxidasa de rábano (5U/mL), 50  $\mu$ L 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.

#### **6.4.5 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 hidrólisis 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 un 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.

#### **6.4.6 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 1 mL 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.



#### **6.4.7 Determinación de la reducción de colorante**

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

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

### **6.5 Sistema en matraces con relación de C: N: P 100:10:1**

#### **6.5.1 Inmovilización en paja**

Se pesaron 0.160g 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 0.160g de paja previamente remojada por 24 horas. En total se incubó por 5 días.

#### **6.5.2 Inoculación**

Este experimento se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 500mL 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 a uno de los controles se le agregó el colorante y al otro no.

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

### **6.5.3 Cinética**

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 hidrógeno. A partir de la hora 56 se determinó la remoción de color para cada muestreo.

Se midió la glucosa oxidasa, proteína total, reducción de color y los azúcares totales, por los métodos antes descritos, en este experimento se determinó el peróxido de hidrógeno.

### **6.5.4 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 ensayo 3mL del reactivo A (solución de yoduro de potasio, NaOH y molibdato de amonio), después se añadió 3mL del reactivo B (solución de biftalato de potasio), para posteriormente adicionar 3mL 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.

## 6.6 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 2.

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

**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<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> **C=**C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub> **D=** N° Cubos  
**E=** Fuente de N. **F=**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> **G=** FeSO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O **Valores codificados=** (+) nivel alto, (-) nivel bajo.

**Tabla 3** Variables del diseño

<b>Compuesto</b>	<b>(+1)</b>	<b>(-1)</b>
<b>Inmovilización( días)</b>	3	1
<b>C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> (g/L)</b>	2	1
<b>C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub> (g/L)</b>	2	1
<b>No. Cubos</b>	6	3
<b>Fuente de N.</b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (g/L)</b>	1.0	0.5
<b>FeSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (mg/L)</b>	3	1

### 6.6.1 Inmovilización del inóculo en cubos de poliuretano

#### Preparación del inóculo

Se colocaron 3 gramos de café, 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 adiciono a 10mL de solución tween al 0.1%. Se mezcló con un vortex para homogenizar la suspensión de esporas, las cuales se separaron en malla para un mejor manejo de la suspensión. Se realizó el conteo de esporas hasta obtener una suspensión con 5x10<sup>6</sup> esporas/mL en Cámara de Neubauer. Se homogenizó y se adicionaron 4mL 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.

### **6.6.2 Determinación de ácidos orgánicos**

Para la determinación de ácidos orgánicos se tomaron 10mL de muestra previamente filtrada en papel filtro de poro cerrado, después se procedió a preparar la muestra cómo sigue a continuación:

Después de 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 se le dio un tratamiento con carbón activado utilizando 10 mg por cada mililitro de muestra, se agitó a 150 rpm durante una hora. Las muestras se filtraron a través de un disco con membrana de nylon 0.2  $\mu\text{m}$  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 0.4mL/min en la fase móvil, a una temperatura de 30 °C.

# CAPÍTULO 7

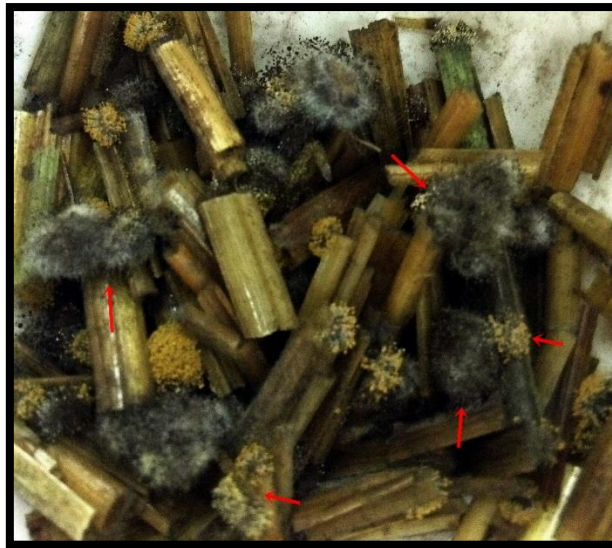
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Resultados de la inmovilización en paja y poliuretano

En la inmovilización los resultados son cualitativos.

#### Inmovilización en paja

Al término de la incubación el micelio de los hongos se adhirió poco sobre la superficie de la paja. (Figura 7.1)



**Figura 7.1** Inmovilización en paja

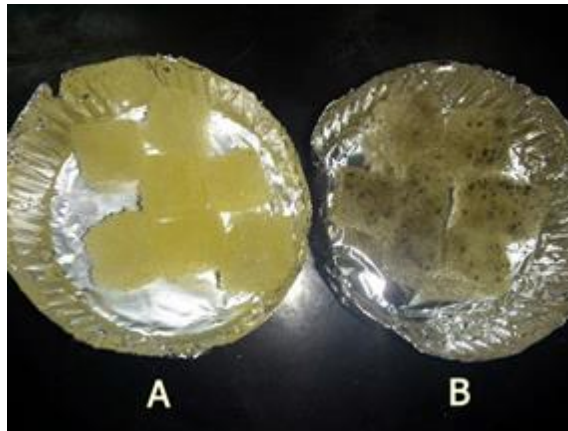
Durante los experimentos algunos de los microorganismos estaban visiblemente libres en el agua residual sintética, y al finalizar los experimentos la biomasa estaba separada de la paja. (Figura 7.2)



7.2 Paja al final del tratamiento

### Inmovilización en poliuretano

La inmovilización en los cubos de espuma de poliuretano fue visible como se observa en la imagen

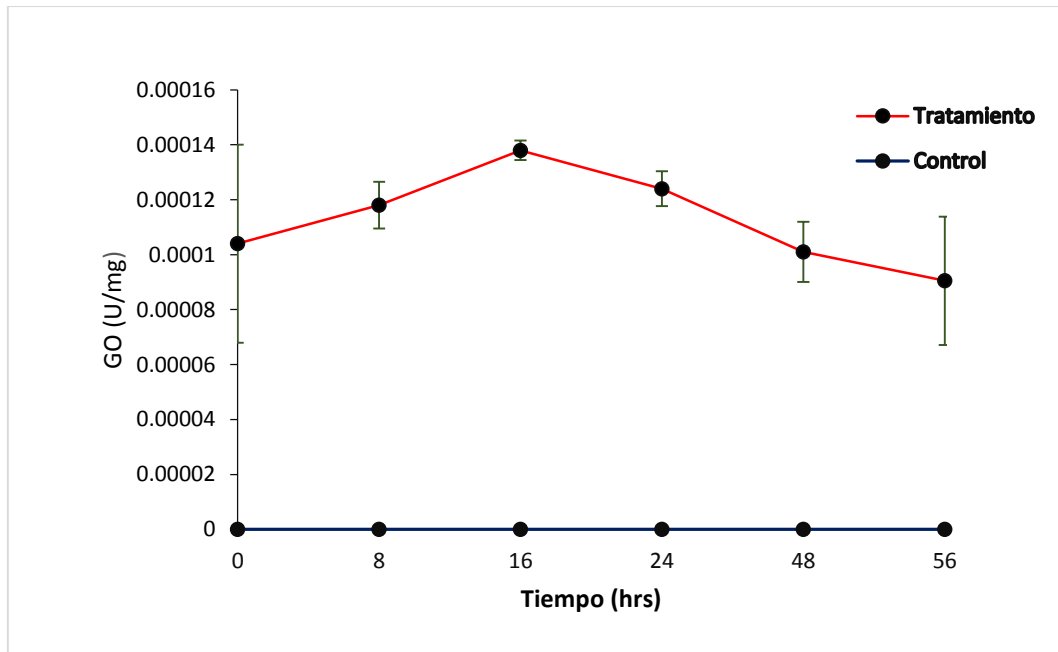


**Figura 7.3** a) Cubos de poliuretano sin inóculo b) Cubos de poliuretano con inóculo

## 7.2 Resultados de determinaciones en columnas de burbujeo

### 7.2.1 Actividad Enzimática Glucosa Oxidasa

La actividad específica enzimática es expresada por la concentración de enzima GO 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 la actividad enzimática (Figura 7.4).

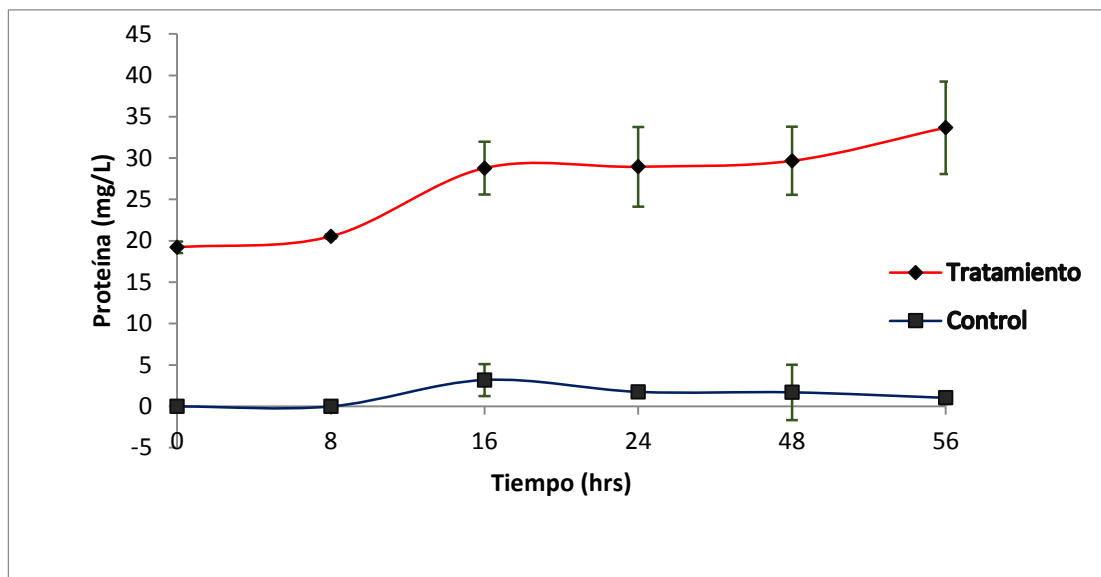


**Figura 7.4** Actividad específica de glucosa Oxidasa

### 7.2.2 Resultados de Proteína total.

La proteína total presentó un incremento a las 16 horas con un valor de 28.78mg/mL, incrementándose hasta las 56 horas, a un valor de 33.67 mg/mL. En el control no se observó producción de proteína. (Figura 7.5).





**Figura 7.5.** Determinación de proteína total

### 7.2.3 Resultados de Azúcares Totales

Los azúcares totales cuantificados fueron los procedentes del material lignocelulósico que contienen principalmente hemicelulosa 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, el cual presentó fluctuaciones, debido al 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 inactivados durante la esterilización, se vuelven a activar al tener condiciones favorables de cultivo para el crecimiento (Silvia *et al.*, 2004), que consumen los azúcares disponibles que pudieron liberarse al realizar el proceso de esterilización (Figura 7.6).

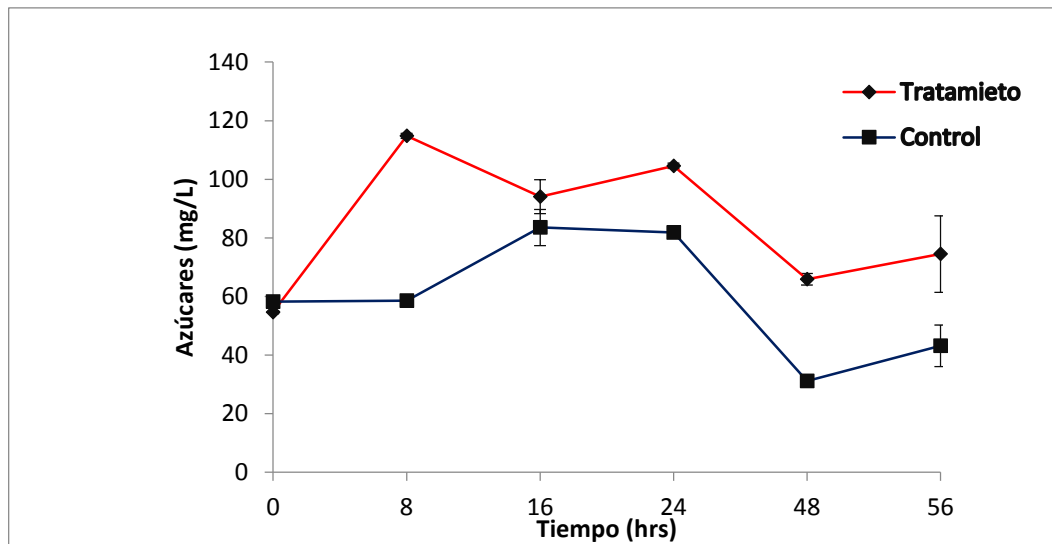


Figura 7.6 Determinación de Azúcares Totales

#### 7.2.4 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. A las 8 horas después de agregado el colorante (24 h) la columna de tratamiento tuvo menos concentración de colorante en comparación con la columna control (Figura 7.7), teniendo una remoción abiótica por adsorción a las paredes de la columna y al filtro, (figuras 7.8 y 7.9).

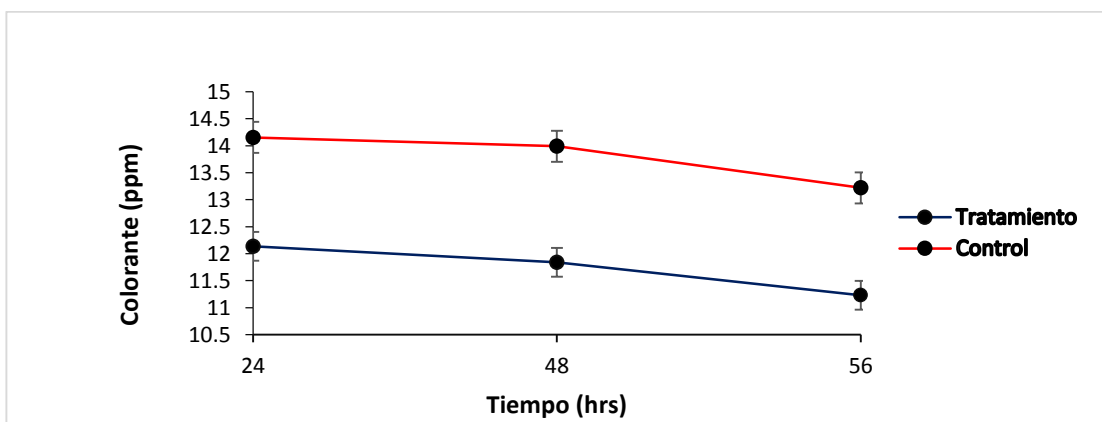
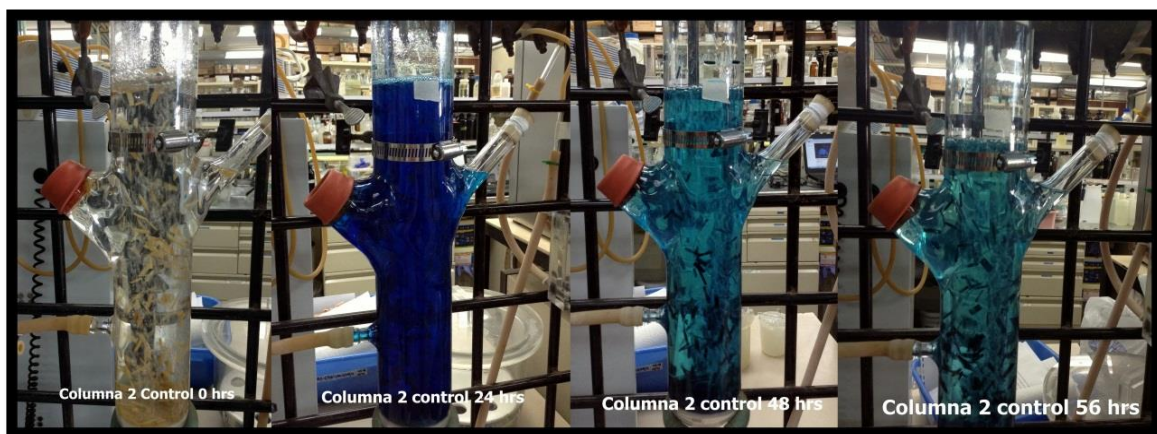


Figura 7.7 Reducción de colorante Azul de Metileno



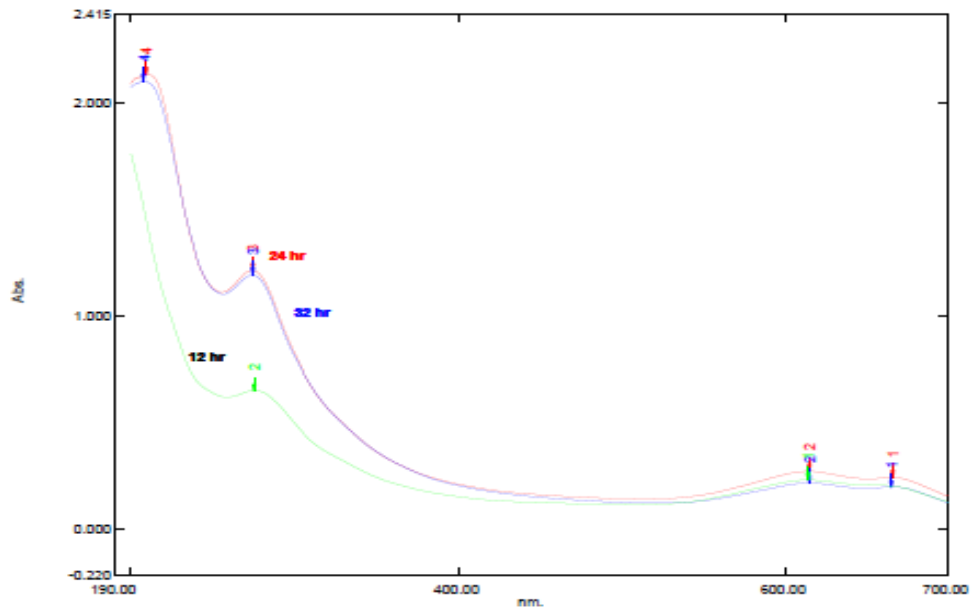
**Figura 7.8.** Columna tratamiento a distintas horas del experimento



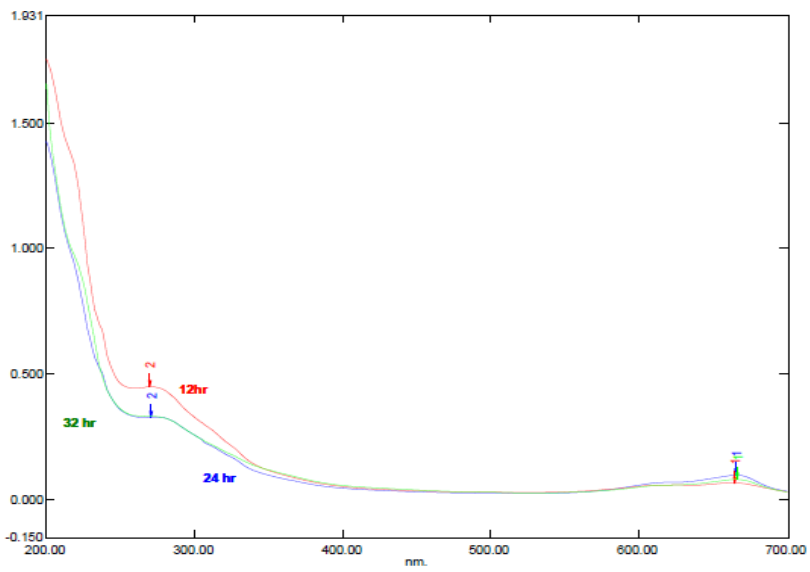
**Figura 7.9** Columna control a distintas horas del experimento

### 7.2.5 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 7.9), lo cual se podría atribuir a la posible degradación, que da lugar a la formación de los productos de la degradación, que muestran picos de absorción a longitudes de onda menores a 664 nm; dicho desplazamiento puede ser observado en comparación con el control, ya que en este el pico de absorción sigue en 664 nm como se muestra en la figura 7.10 y 7.11.



**Figura 7.10-** Barrido espectrofotométrico del tratamiento a las 12, 24 y 32 h.



**Figura 7.11.-** Barrido espectrofotométrico del Control a las 12, 24 y 32 horas

## 7.2.6 Relación del comportamiento de los parámetros obtenidos

En la figura 7.12 se encuentra la 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. Es conocido que la paja contiene una elevada cantidad de hemicelulosas y celulosa (Rodríguez-Vázquez, 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 del tratamiento. Concordando con el aumento gradual de la proteína total, Aunado a la disminución de azúcares podría estar relacionado a la actividad de la Glucosa oxidasa, que disminuye después de las 24 h, y que se correlaciona con la disminución del colorante.

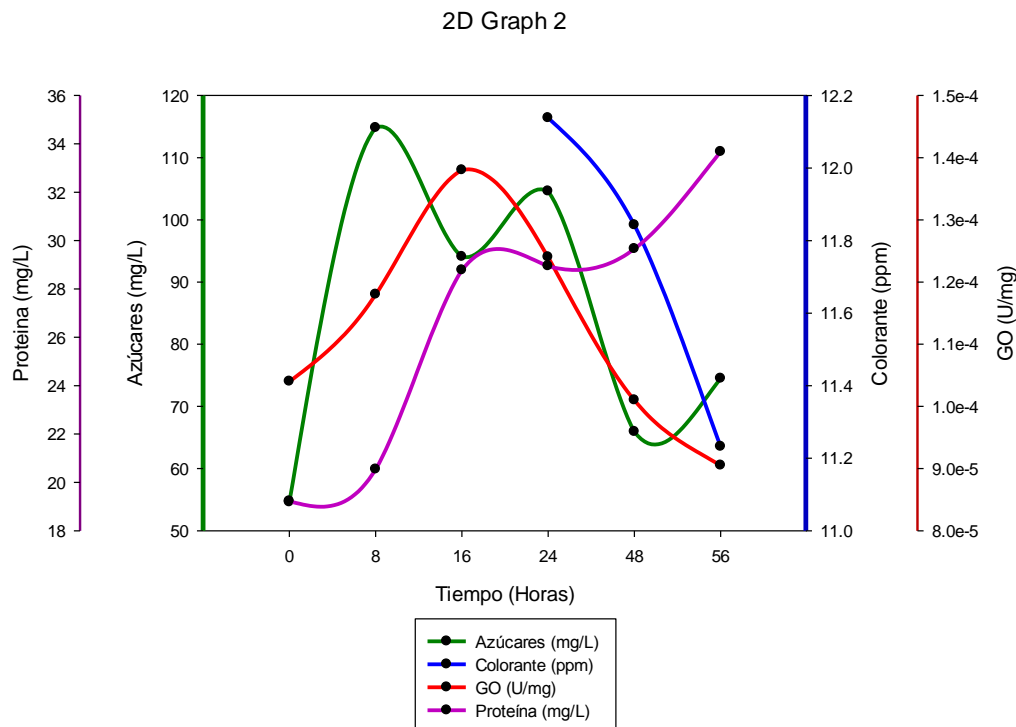


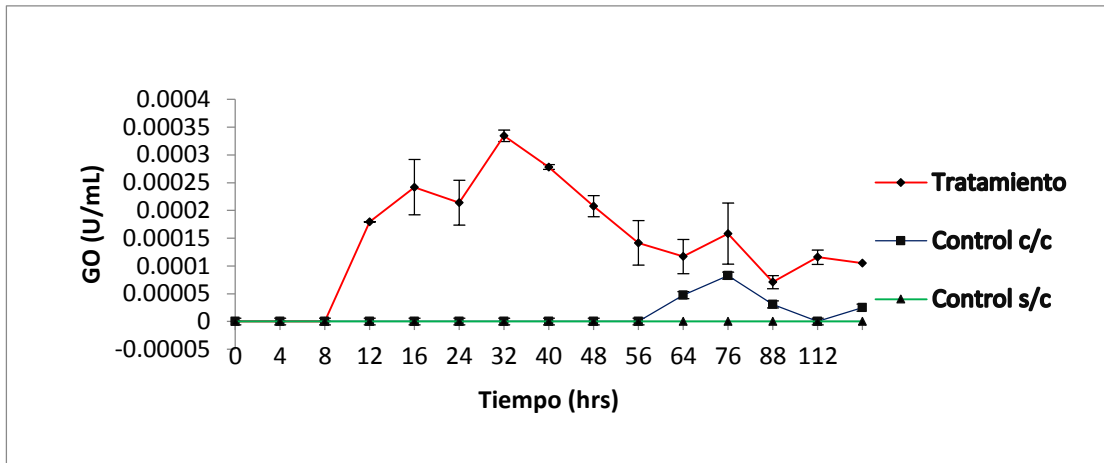
Figura 7.12.- Relación de los parámetros obtenidos.

## **7.3 Efecto de la relación C: N: P en la decoloración.**

### **7.3.1 Determinación de actividad enzimática de Glucosa oxidasa**

En el control sin colorante, no se observó actividad enzimática de 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 (Fernández-Sánchez *et al.*, 2001), debido a esporas que se puedan estar activando (Sylvia *et al.*, 1999). En el tratamiento como se observa en la figura (, 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.

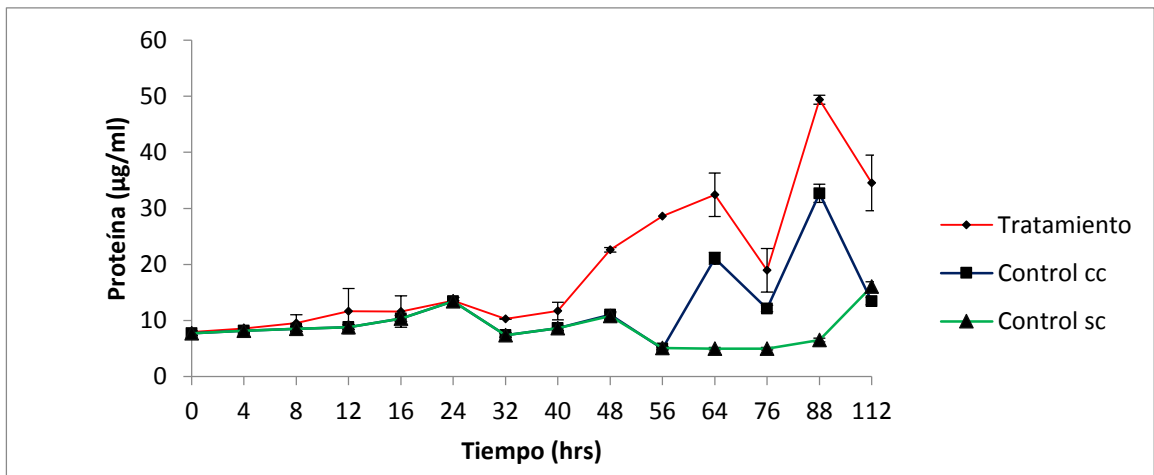
Se aprecia la diferencia entre el tratamiento y los controles, que aunque hubo actividad, esta no influyó en los resultados de la actividad de GO, excepto por las 64,76 y 88 horas en el control con colorante, lo que puede indicar que la actividad enzimática es debido a los microorganismos asociados al 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 7.13.-** Actividad específica glucosa oxidasa

### 7.3.2 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 h, 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 h, se tiene un comportamiento similar en los dos controles y el tratamiento, y los dos controles muestran el mismo comportamiento 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.

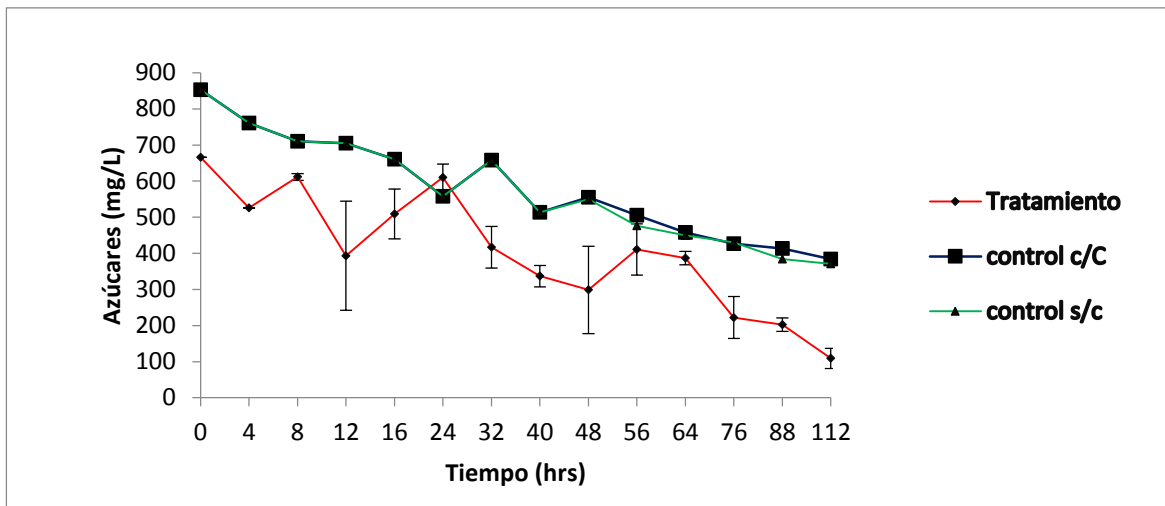


**Figura 7.14** Proteína total extracelular en función del Tiempo

### 7.3.3 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 lignocelulósico y el agua se esterilizó, por lo 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 presentes en la paja.

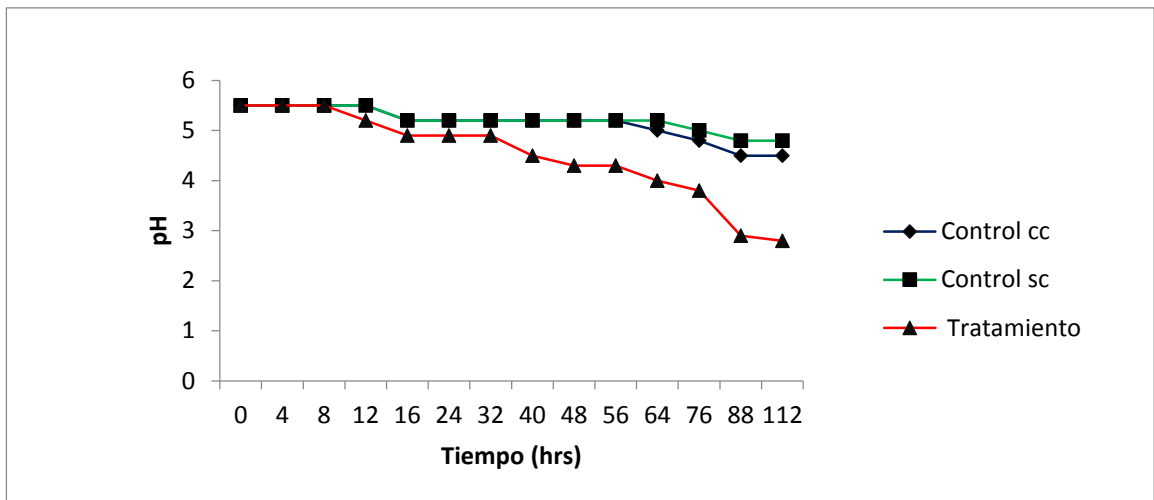




**Figura 7.15** Azúcares totales en función del tiempo

### 7.3.4 Determinación de pH

El pH en las muestras de los controles se comportó sin variación, 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 hora 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 orgánicos (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).

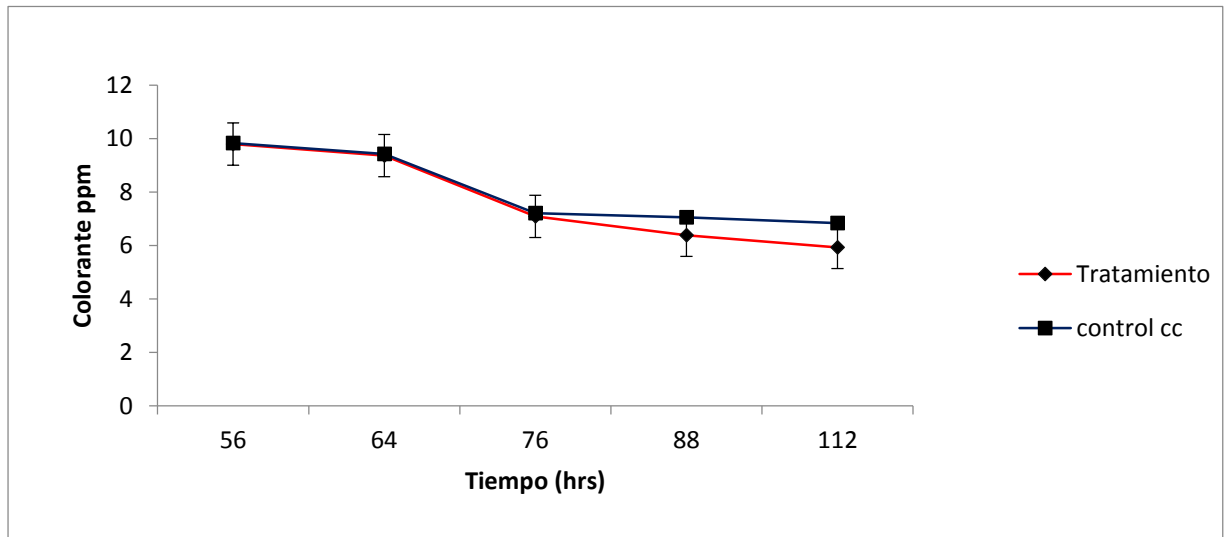


**Figura 7.16** Determinación del pH

### 7.3.5 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 encontraron que en el tratamiento, el medio de cultivo se redujo el color considerablemente (figura 7.17), no obstante al momento de filtrar la muestra, el color se tornaba visible nuevamente como (figura 7.18). 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 (Galagan y Su, 2008).

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



**Figura 7.17** Concentración de colorante en función del tiempo

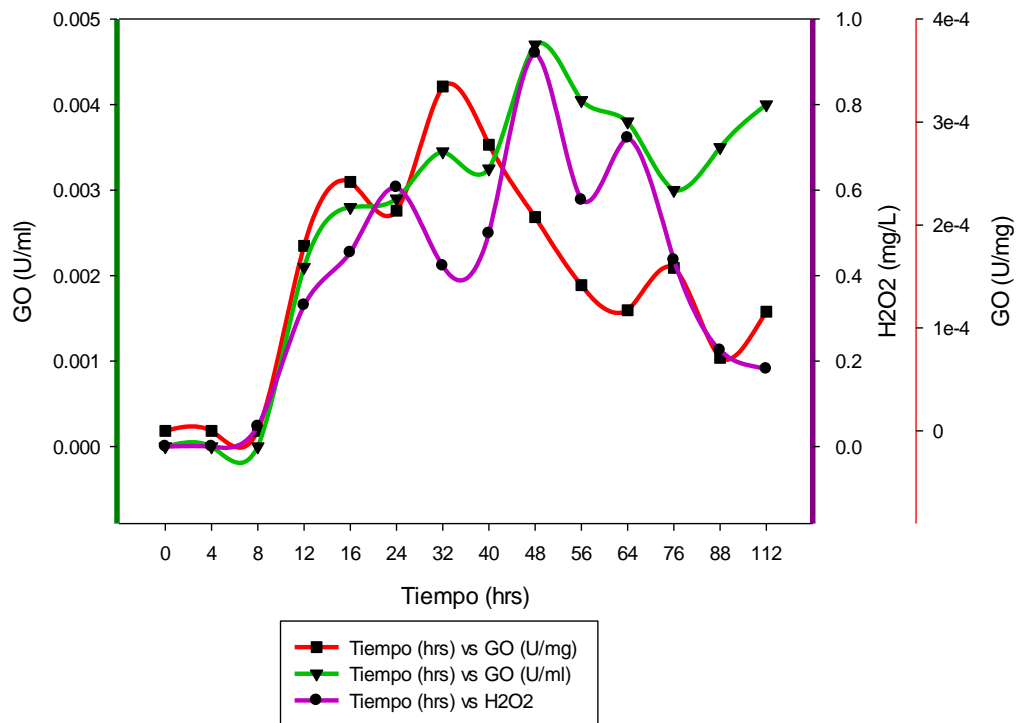


**Figura 7.18** Muestra filtrada y sin filtrar

### 7.3.6 Relación entre parámetros

En la figura 7.19 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 hidrógeno y a partir de las 48 horas se presenta una fluctuación en la actividad y en la producción del peróxido de hidrógeno.

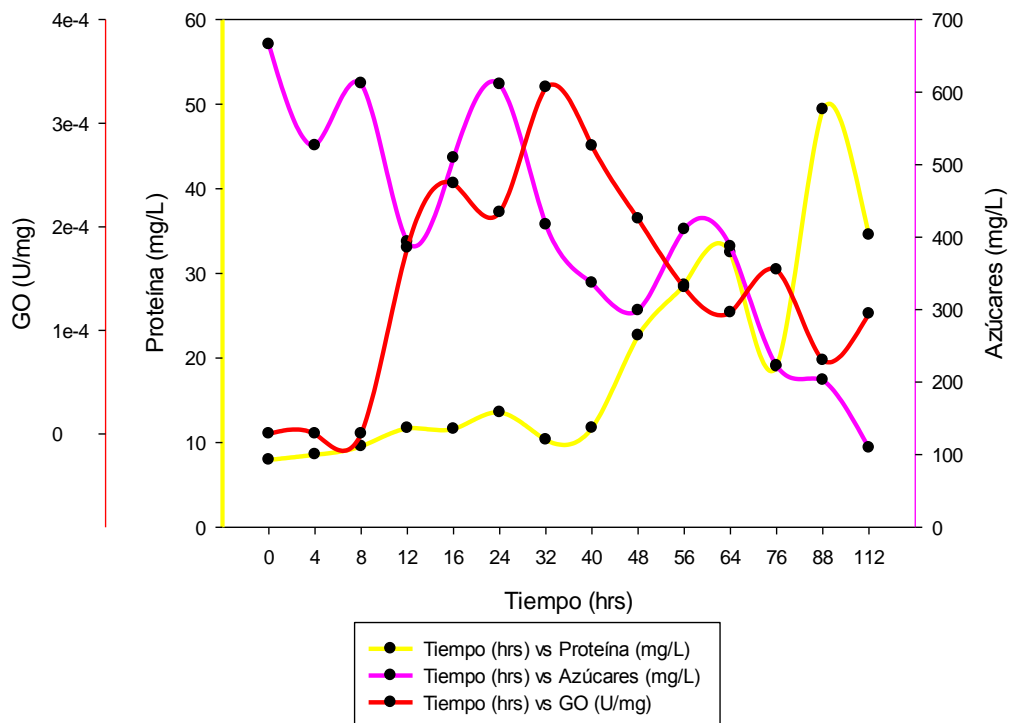


**Figura 7.19** GO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Actividad específica de GO en función del tiempo

En la figura 7.20 se observa la relación de la actividad enzimática específica de GO con los azúcares. Se aprecia que mientras los azúcares 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 la

paja para que el sistema se mantenga con la producción de azúcares en el medio de cultivo.

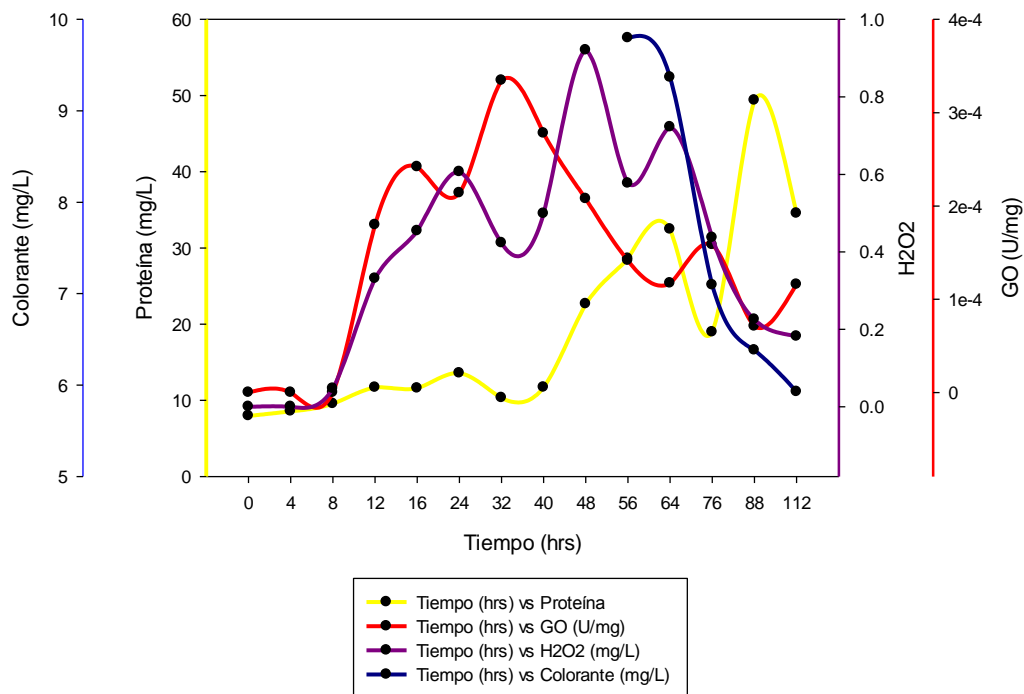
Dado que la proteína total extracelular es proporcional a los microorganismos existentes en el medio, se puede suponer que mientras los azúcares son consumidos la proteína total va en aumento y tienen un comportamiento similar. En la figura 7.20 se aprecia dicho comportamiento, sin embargo en la hora 76 los azúcares siguen disminuyendo y la proteína aumenta significativamente, esto podría indicar que los microorganismos están obteniendo su carbono de otra fuente.



**Figura 7.20** GO, Proteína 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 7.21, dicha

disminución de colorante pudo llevarse a cabo por la interacción con el peróxido de hidrogeno ya que éste presenta una disminución constante después de haberlo agregado, lo anterior incluyendo el consumo que se supone se dio por parte de los microorganismos hicieron que la reducción biológica fuera en total del 10%.



**Figura 7.21** Colorante, Proteína, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y GO en función del tiempo

## 7.4 DISEÑO PLACKETT BURMAN DEFINIDO

### 7.4.1 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 para cada uno de los diferentes medios de cultivo del diseño Plackett-Burman

Tratamiento	pH final	Ácido Oxálico (Área)
<b>1 (3-3)</b>	5.0	419184.33
<b>2 (1-6)</b>	5.5	170964.5
<b>3 (1-6)</b>	5.5	17828
<b>4 (3-6)</b>	5.5	556071
<b>5 (1-3)</b>	5,5	212122.33
<b>6 (3-3)</b>	5.5	508471.67
<b>7 (3-6)</b>	5.0	557821.67*
<b>8 (1-3)</b>	5.5	573696
<b>W (control) (1-3)</b>	3.5	0.0
<b>W (control) (1-6)</b>	4.2	0.0
<b>W (control)(3-3)</b>	3.5	0.0
<b>W (control)(3-6)</b>	4.0	0.0

**Dónde:** (1-3)= Un día de inmovilización y tres cubos

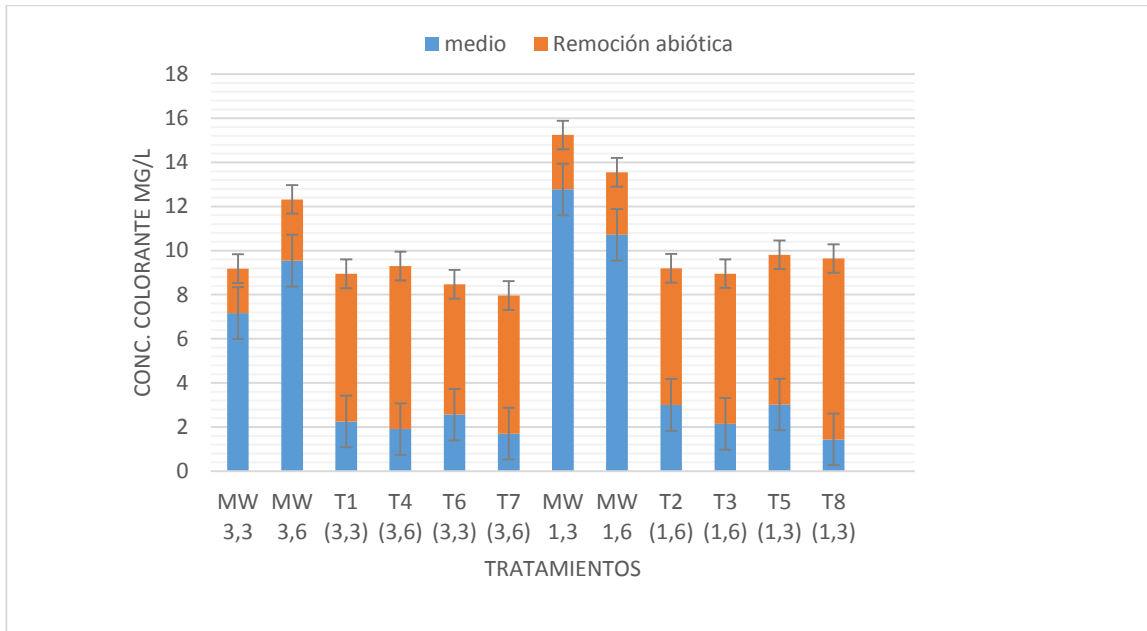
(1-6)= Un día de inmovilización y seis cubos

(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 sólo el ácido tartárico (véase los anexos). De acuerdo al análisis de varianza (ANOVA) realizado, las variables no tienen un efecto significativo.

### 7.4.2. Reducción de Colorante



**Figura 7.22** Reducción abiótica y sobrante del colorante en el medio

La reducción de colorante mediante el diseño Plackett-Burman, mostró mejores resultados que en los tratamientos anteriores, (figura 9.19); obteniendo una remoción de más 50% con un máximo de 60.10% en el tratamiento 7. En los controles positivos la mayoría se encuentra entre un 23% y 39 % (figuras 7.24 y 7.25).

Si bien el tratamiento T7 no presenta una diferencia significativa con otros tratamientos en la concentración del colorante residual, si presenta una menor remoción abiótica significativa.





Figura 7.23 Día inicial del experimento con 20 ppm de azul de metileno

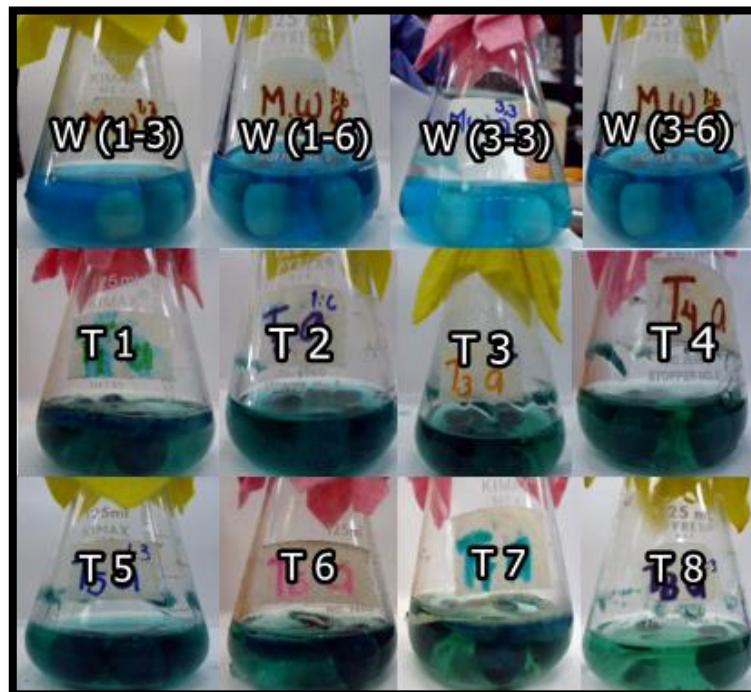


Figura 7.24 Día final de tratamiento

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.

## **CAPÍTULO 8**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

Con los análisis realizados en columnas de burbujeo y a nivel matraz, con inmovilización en paja, 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 bajo las condiciones investigadas.

En el experimento con medios definidos e inmovilizados en cubos de poliuretano, con varios componentes del medio de cultivo, se obtuvieron mayores reducciones del color. Por lo tanto los microorganismos asociados al grano verde de café son útiles para la decoloración del colorante Azul de metileno.

La producción de la 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.

#### **RECOMEDACIONES**

Es recomendable seguir investigando la mejora en las condiciones del cultivo.

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.

Posteriormente se podrían realizar experimentos en plata piloto ya con un método de inmovilización y condiciones de cultivo optimizados.

## BIBLIOGRAFIA

1. Antonella Anastai, V. Pringione, G. Vanese (2009), Industrial dye degradation and detoxification by basidiomycetes belonging to different eco-physiological groups, Journal of Hazardous materials.
2. Barragán, B., Costa, C., Peralta, J., Barrera, J., Esperanza, F., Rodríguez, R. (2007b). Biodegradation of organochlorine pesticides by bacteria grown in microniches of the porous structure of Green bean coffee. International Biodeterioration & Biodegradation.
3. Castillo, L., Gonzáles, K. Evaluación de tres soportes de inmovilización y dos condiciones nutricionales para *Trametes versicolor* en la remoción del colorante Negro Reactivo 5 en columna de burbujeo. Pontificia Universidad Javeriana Bogotá Colombia (2007)
4. Chang, J., Chien, Ch., Shan-Yu Ch. (2001) Decolorization of azo dyes with immobilized *Pseudomonas luteola*. Process Biochemistry.
5. Colindres-Bonilla, P. (2010) Tratamiento de residuales líquidos textiles mediante oxidación con ozono. Instituto Politécnico Nacional CICATA-LEGARIA.
6. Díaz-Sánchez, J. (2011) Reducción de contaminantes del agua residual del ramal 1 del CINVESTAV por *T. versicolor* inmovilizado y microorganismos asociados al grano verde del café. CINVESTAV unidad Zacatenco, Depto. De biotecnología y Bioingeniería.
7. Domínguez, A., Couto, S., Sanromán, Ma. (2005), Dye decolorization by *Trametes hirsuta* immobilized into alginate beads. World Journal of Microbiology & Biotechnology.

8. Fernández, J. & Henao, L. 2007. Evaluación de tres hongos basidiomicetos inmovilizados en *Iuffa Cylindrica* y fotocatalisis con TiO<sub>2</sub> para la remoción del Negro reactivo 5. Pontifica Universidad Javeriana. Facultad de ciencias.
9. Fernández-Sánchez J.M., R. Rodríguez-Vázquez, G. Ruiz-Aguilar & P.J.J. Alvarez. 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).
10. García O. C.F., (2002) Aplicación de la ósmosis inversa y la nanofiltración en el acondicionamiento de aguas para calderas. Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente, Universidad de Oviedo.
11. García-Gámez, C., P. Gortáres-Moroyoqui y P. Drogui (2011), Tratamientos biológicos y de oxidación avanzada combinados para una solución a la biotecnología ambiental.
12. Garzón-Jimenez R.C. 2009. Cinética de degradación de colorantes textiles de diferentes clases químicas por hongos y bacterias inmovilizados sobre fibra de Agave *tequilana webber*. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá Colombia.
13. Gomella, G. & Guerre, H. Tratamiento de aguas para abastecimiento público. Editores Técnicos Asociados, 1992.
14. Herrera, A. & Rosas, J. (2003). Estudio preliminar de la producción de enzimas ligninolíticas por los hongos *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* y *Pleurotus ostreatus* para el tratamiento de efluentes de la industria papelera. Pontifica Universidad Javeriana. Facultad de Ciencia. Depto. Microbiología.
15. Karel, s., Libicki, S., Robertson, C. (1985). The immobilization of whole cells engineering principles. Chemical Engineering Science.

16. Kindelbaver A, Guebitz G. (2005). Biorremediation For the Decolorization of Textile Dyes- A review, En: Environmental Chemistry, Green Chemistry and pollutants in Ecosystems.
17. Korano M, M. Lyberatos (2006), Biological treatment of wastewaters from a dye manufacturing company using a trickling filter.
18. Mansilla H.D., Limaza C., Gutarra A, y Rodríguez J. (2001) Tratamiento de residuos líquidos de la industria de celulosa y textil en eliminación de contaminante por fotocatalisis heterogénea, Blesa M.A. Editor, Editand CyTED La planta argentina.
19. Manzano A., León T., Arguelles, J. Leal, R. Chinae, R. Guerra, G. Casado, G. Sánchez, M. y Gómez B., 2004, Hongo de la pudrición blanca con capacidad ligninolítica y acción colorante sobre el violeta cristal. Revista Biológica.
20. Manzano, A., León, T., Arguelles, J., Leal, R., Chinae, R., Guerra, G., Casado, G., Sánchez, M. y Gómez, B. (2004) Hongos de la podredumbre blanca con capacidad ligninolítica y acción decolorante sobre el violeta cristal. Revista Biología.
21. Mazmaci, M., Unyayar, A. Decolourisation of reactive black 5 by *Funalia trogii* immobilised on *Iuffa cylindrical* sponge. Process Biochemistry. (2005)
22. 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.
23. Moeller, G. and Garzón, M. 2003, desarrollo de tecnología no convencionales para el tratamiento de efluentes de la fabricación de colorantes tipo azo.
24. Moreno Sandoval Nataly y Ospina Velandia. Evaluación de inductores Metálicos y Co-sustratos para la remoción de Negro Reactivo 5 empleando *Pleurotus ostreatus* inmovilizado en

- fique. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de ciencias 28 de Noviembre de 2008.
25. Neill, F., Hawkes, D., Hawkes, N. and Lorenco, M. 1999, *J chem, Technol, Biotechnol*.
  26. Otero Natalia Calviño, *Filtración de aguas residuales para la reutilización*, 2007, Servicio de publicaciones Universidad de la laguna.
  27. Pey Clemente J. *Aplicación de oxidación avanzada (Fotocatálisis solar) para tratamiento y reutilización de efluentes textiles*. Universidad Politécnica de Valencia
  28. Quintero R, *Área metropolitana el valle de aburrá (2007) Producción más limpia en el sector textil*, Medellín Colombia.
  29. Ramolho, R.S., *Tratamiento de aguas residuales*. Editorial Reverte. S.A., España 1996.
  30. 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.
  31. Rodríguez-Vazquez, 1991, *pretreatment of biomass and comparison with Brown rot decay mechanism*, PhD Depto. Forest and Wood Sciences. Colorado State University, Fort Collins Co, USA.
  32. Rodríguez-Vázquez R., Roldán-Martín G.A. y Del Río Galván C.P., *Patente Mexicana No. Número 291975: "Proceso de biorremediación en cultivo sólido con la adición de granos de café"*, otorgada el 9 de noviembre de 2011 por el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.
  33. 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 de 2006.



34. Salas Colotta G., Tratamiento físico-químico de aguas residuales de la industria textil. Facultad de Química e Ingeniería, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2003
35. Sandberg (1989), Indigo Textile Technique and History lark books Asheville, NC.
36. Sankar, E., Terre, I. & Blendill, F. (1999). Problems of dyes. International Journal of Canadá.
37. Sankar, E. Terre, I and Blendill, F, 1999, Problems of dyes, International Journal of Canada.
38. Sarria M., Parra, S., Rincón, G., Torre, R., Pulgarín, C. (2005). Nuevos sistemas electroquímicos y fotoquímicos para el tratamiento de aguas residuales y de bebida. Revista Colombiana de Química, Volumen 34.
39. Sen S., Demirer G (2003) anaerobic treatment of real textile wastewater with a fluidized bed reactor. Water Research.
40. Smith, M. (1990). The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria.
41. Solano, H., Zamora, D., Gámez V., García R., Gámez, V. (2008) Alina nueva variedad de cebada maltera para riego.
42. Swamy. J. & Ramsay. J.A. (1999) Enzyme and Microbial Technology.
43. Sylvia D.M., Furhmann J.J., Hartel P.G., and Zuberer D.A. Principles and Applications of Soil Microbiology. Prentice Hall, New Jersey, ISBN 0-13-4599991-8

# ANEXOS

## ANEXO A

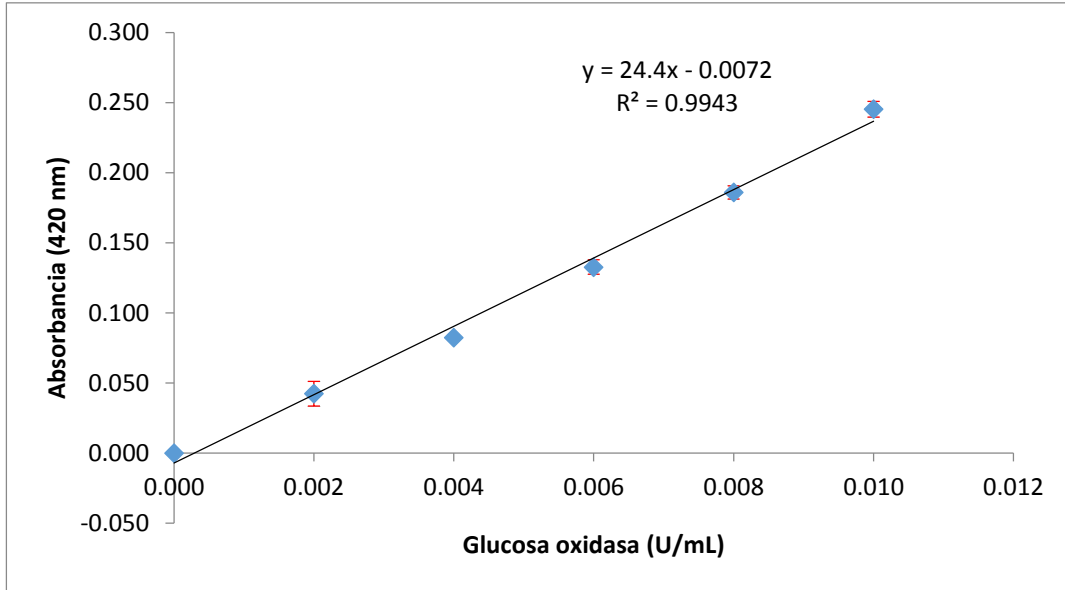


Figura A 1 CURVA PATRÓN GLUCOSA OXIDASA.

## ANEXO B

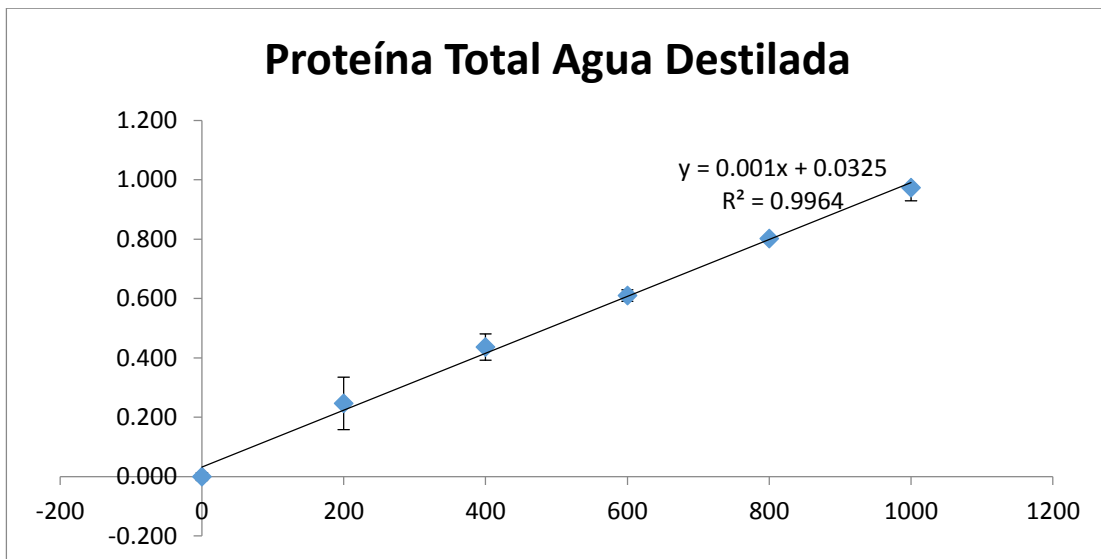


Figura B 1 CURVA PATRÓN DE PROTEÍNA TOTAL

### ANEXO C

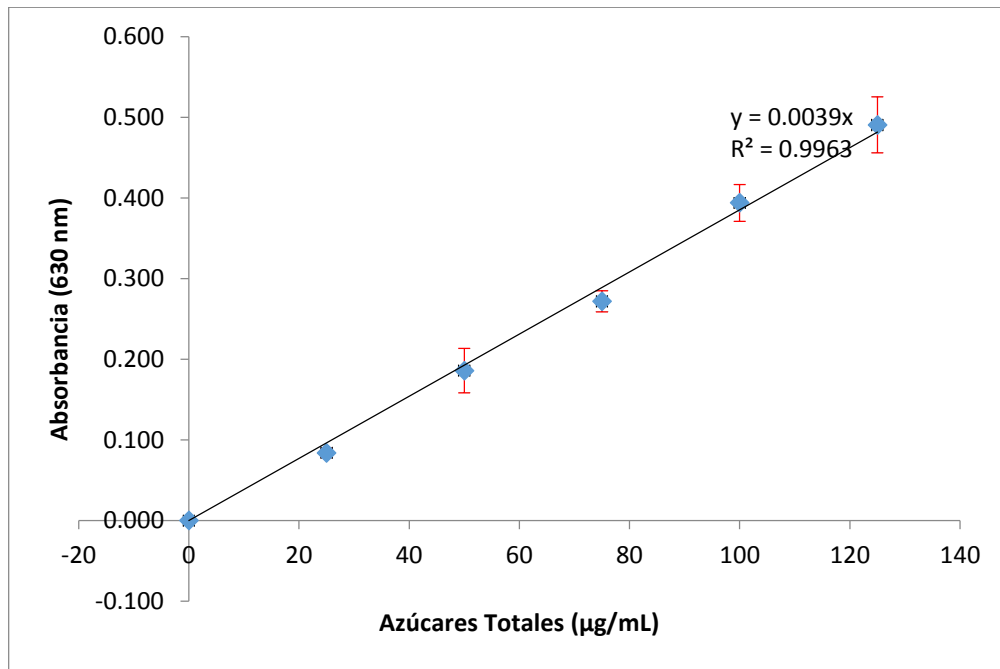


Figura C 1 CURVA PATRON DE AZUCARES TOTALES.

### ANEXO D

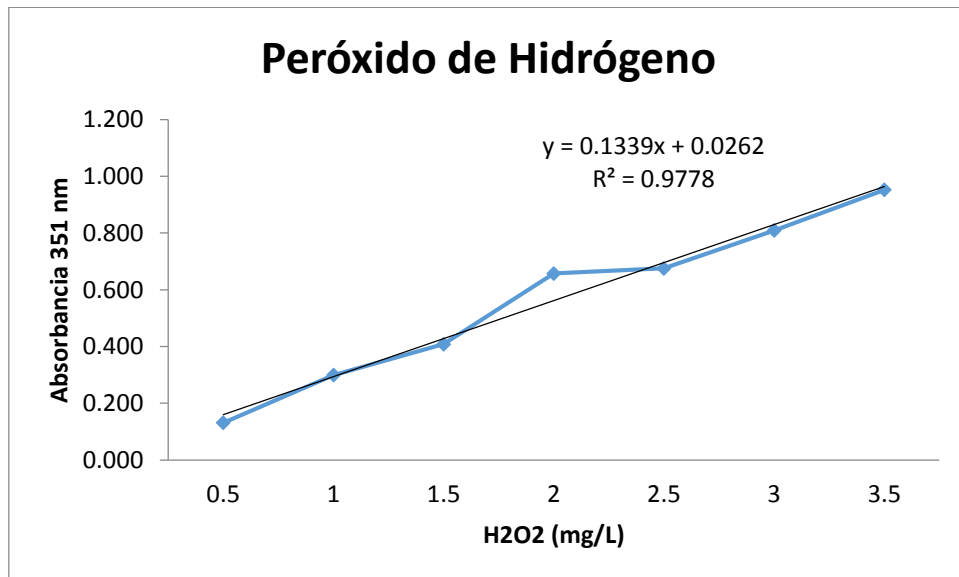
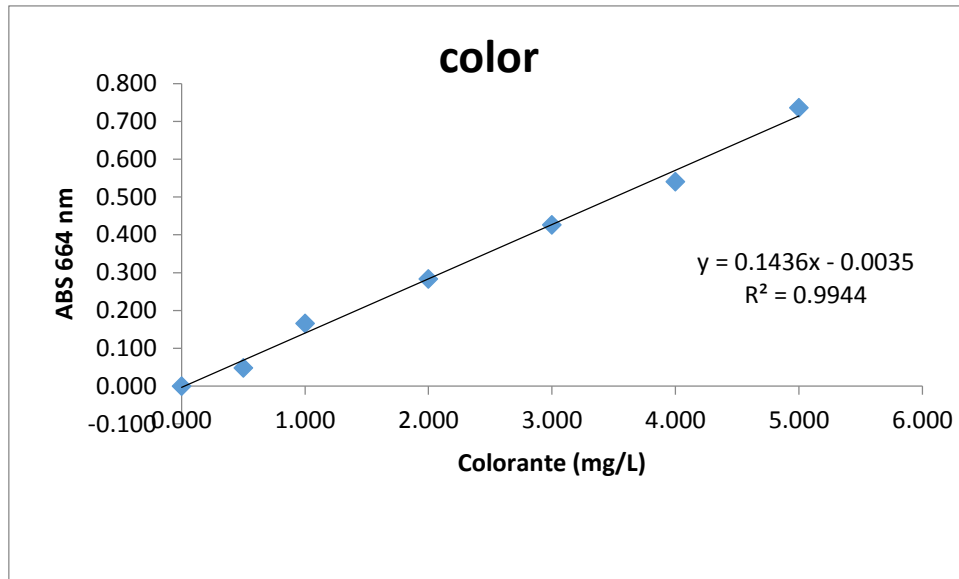


Figura D 1 CURVA PATRÓN PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

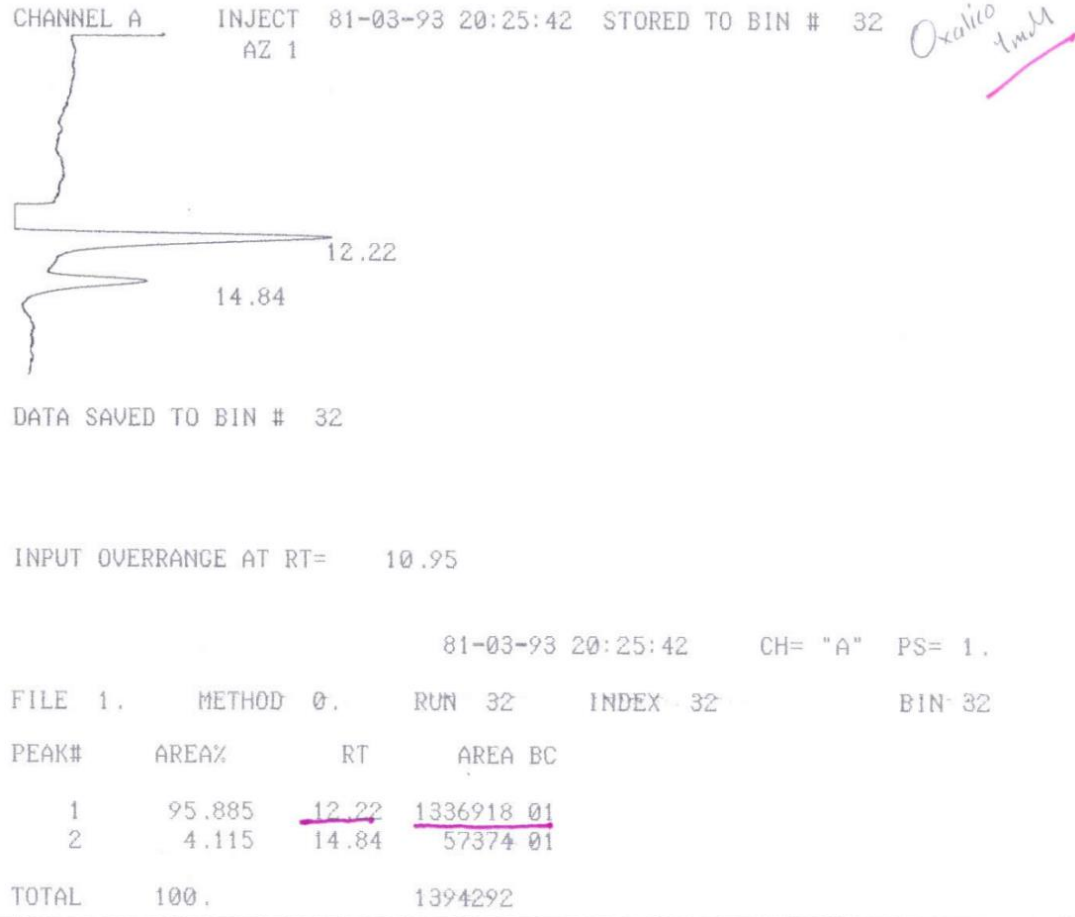
## ANEXO E



**Figura E 1 CURVA PATRÓN DE COLOR**

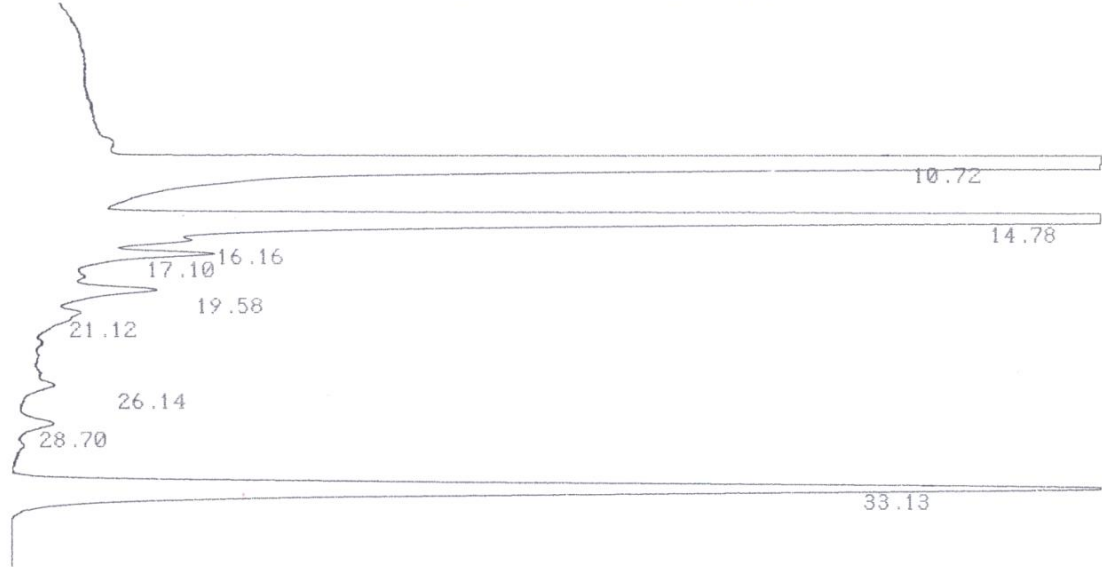
## Anexo F

### Cromatogramas para la determinación de ácidos orgánicos



**Figura F 1** Cromatograma de ácido oxálico estándar

CHANNEL A INJECT 87-03-93 15:06:09 STORED TO BIN # 3



DATA SAVED TO BIN # 3

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

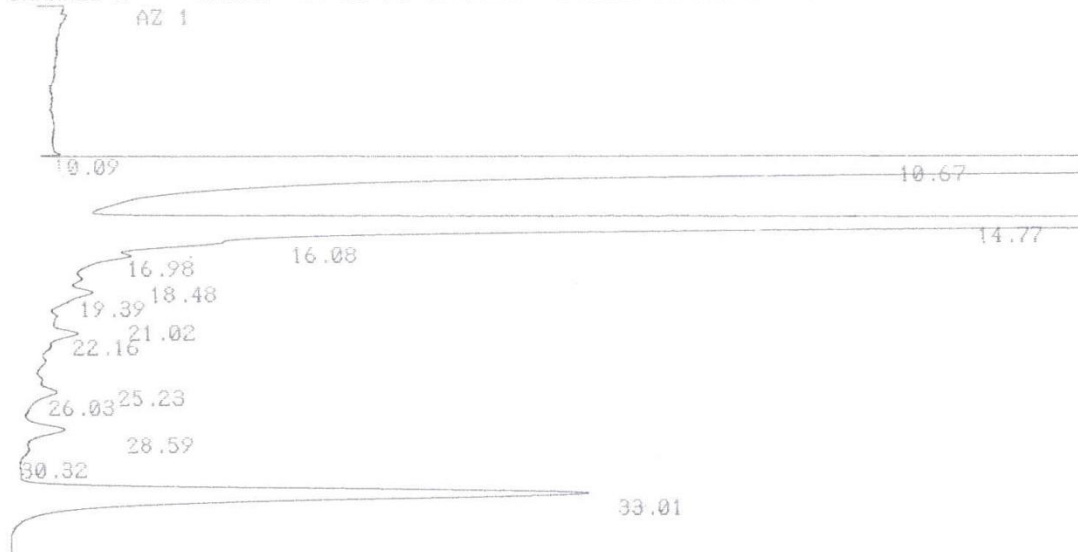
FILE 1. METHOD 0. RUN 3 INDEX 3 BIN 3

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

**Figura F 2** Cromatograma Medio wunder (1-6)

CHANNEL A INJECT 87-03-93 19:31:39 STORED TO BIN # 9



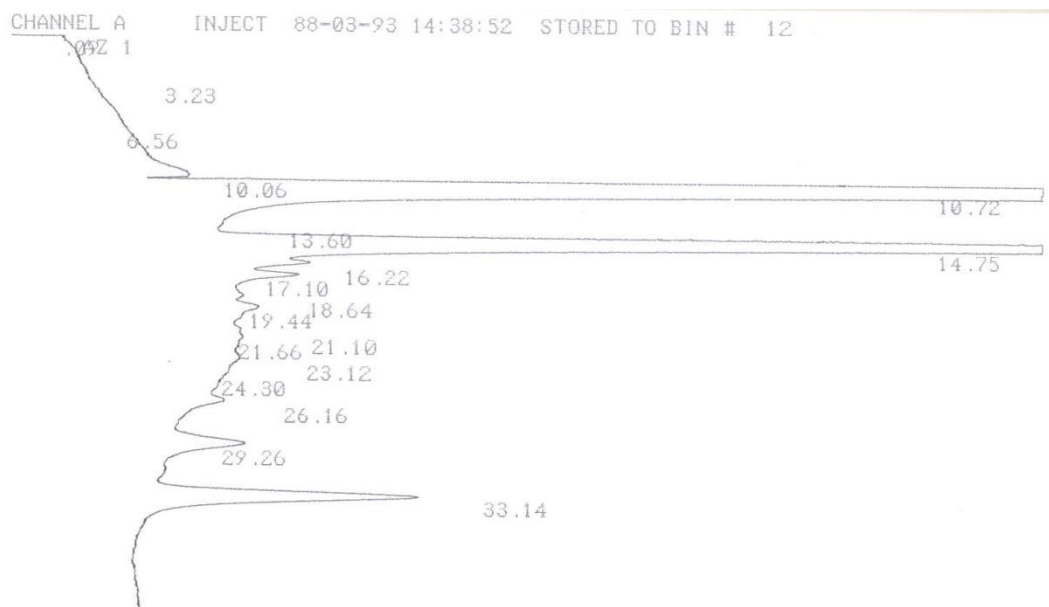
DATA SAVED TO BIN # 9

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	28017	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

Figura F 3 Medio wunder (3-3)



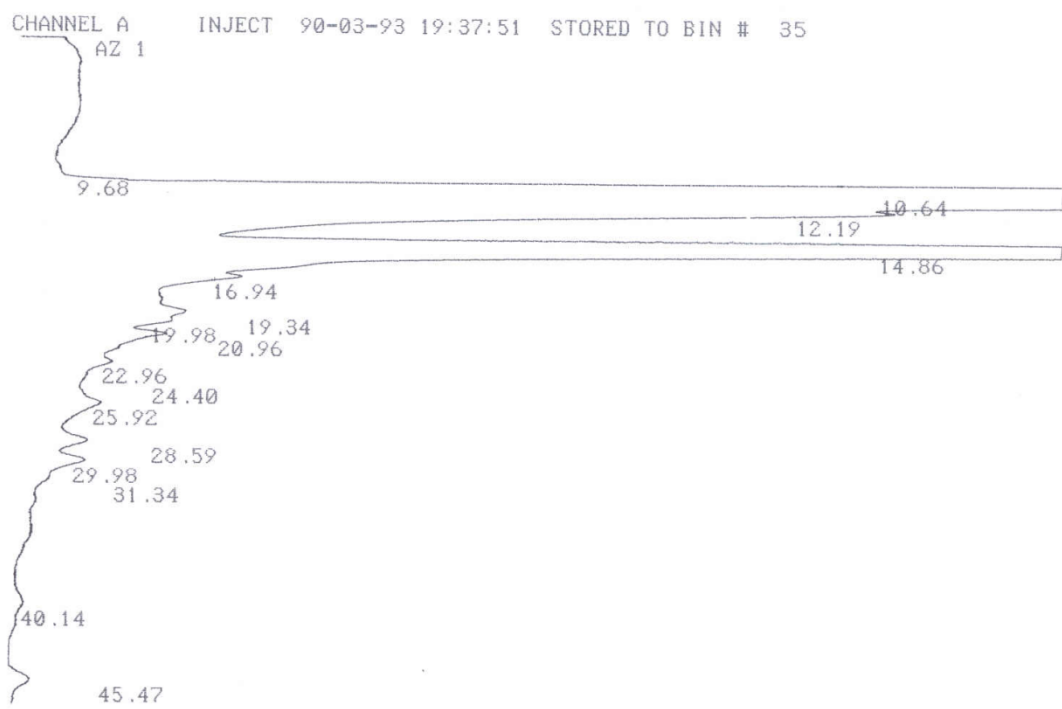
DATA SAVED TO BIN # 12

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

FILE 1.	METHOD 0.	RUN 11	INDEX 11	BW 12
PEAK#	AREA%	RT	AREA	DC
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	

Figura F 4 Medio Wunder (3-6)



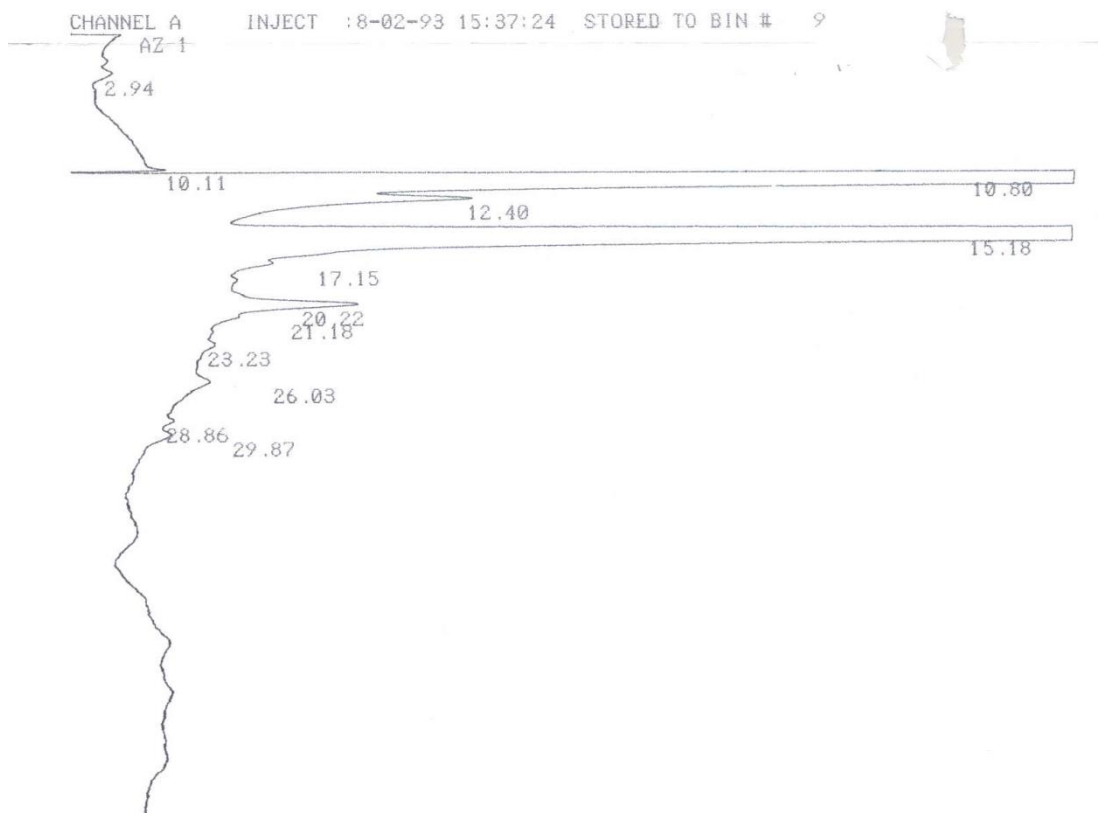


DATA SAVED TO BIN # 35

90-03-93 19:37:51 CH= "A" PG= 1.  
FILE 1. METHOD 0. RUN 34 INDEX 34 BIN 35  
PEAK# AREA% RT AREA BC

PEAK#	AREA%	RT	AREA BC
1	0.02	9.68	3615 02
2	76.978	10.64	14147538 02
3	<u>4.061</u>	<u>12.19</u>	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

**Figura F 5 Tratamiento 1**



DATA SAVED TO BIN # 9

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

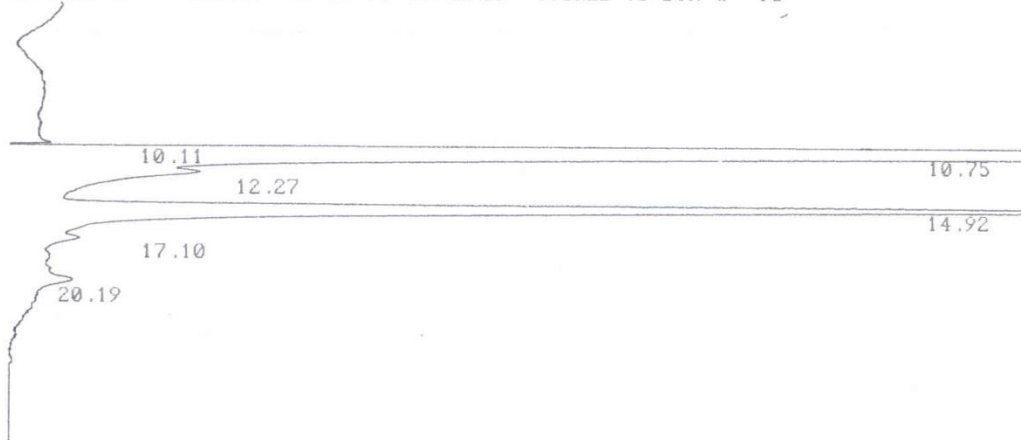
FILE	METHOD	RUN	INDEX	BIN
1.	0.	9	9	9

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

**Figura F 6 Tratamiento 2**

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

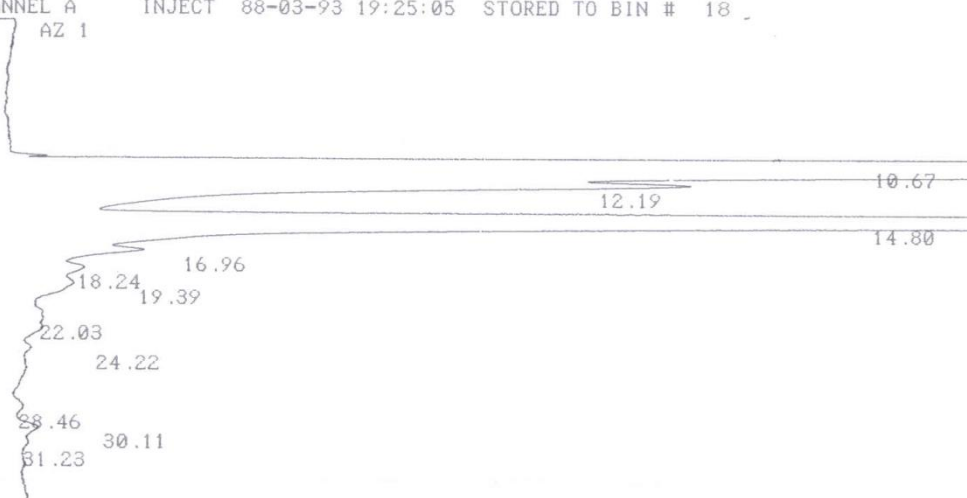
PEAK# AREA% RT AREA BC

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

Figura F 7 Tratamiento 3

CHANNEL A INJECT 88-03-93 19:25:05 STORED TO BIN # 18  
 AZ 1



DATA SAVED TO BIN # 18

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

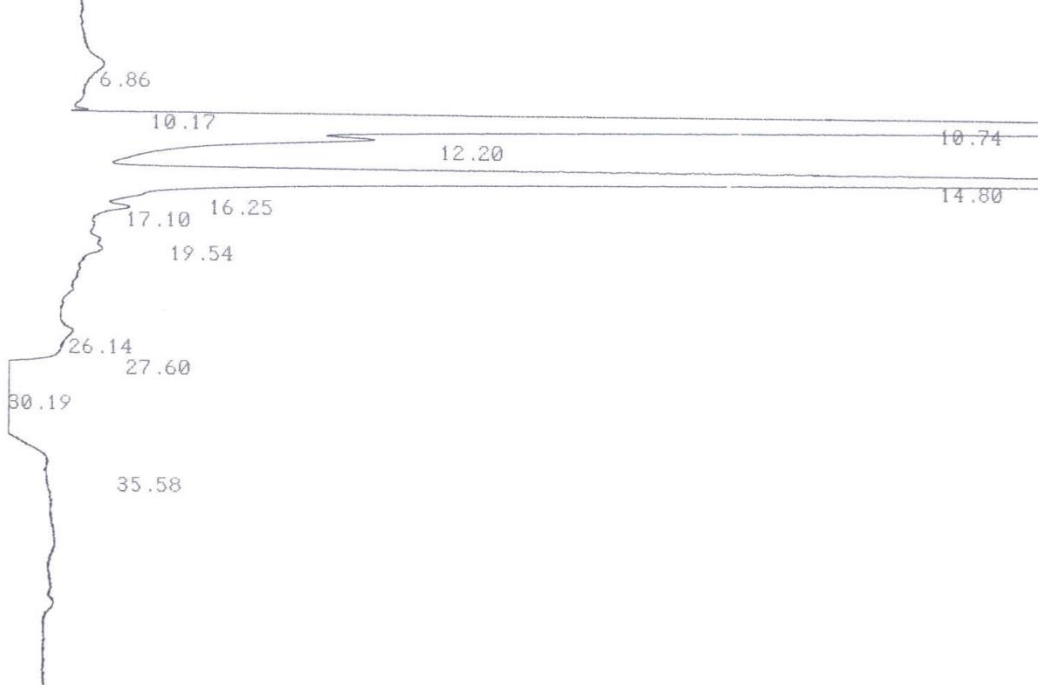
FILE 1. METHOD 0. RUN 17 INDEX 17 BIN 18

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

**Figura F 8 Tratamiento 4**

CHANNEL A INJECT 89-03-93 15:01:11 STORED TO BIN # 22  
AZ 1

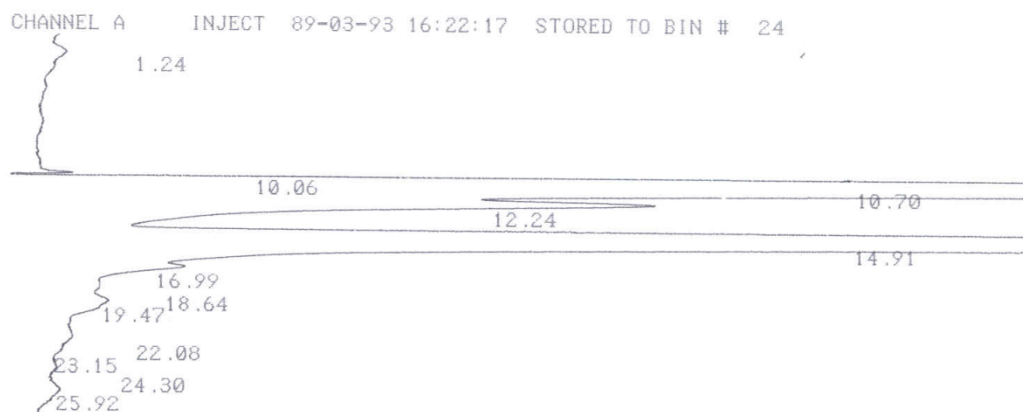


DATA SAVED TO BIN # 22

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

FILE	METHOD	RUN	INDEX	BIN
1.	0.	21	21	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

Figura F 9 Tratamiento 5



DATA SAVED TO BIN # 24

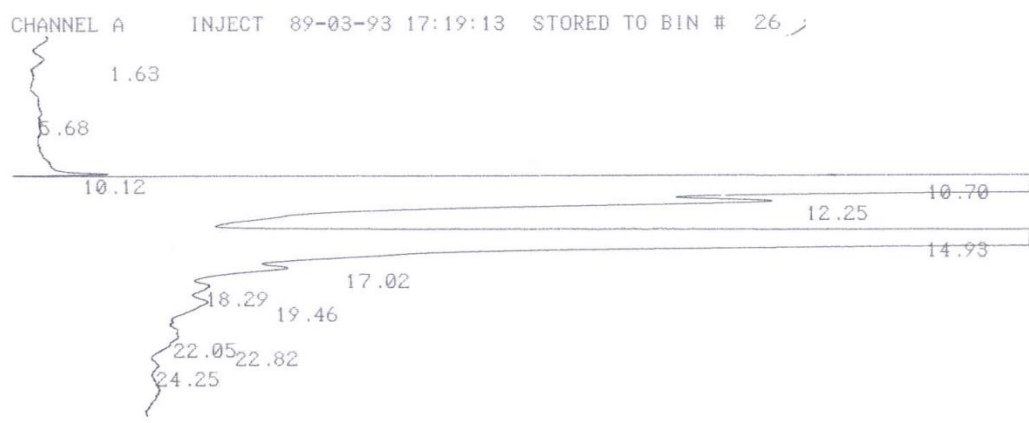
89-03-93 16:22:17 CH= "A" P# 1.

FILE	METHOD	Ø.	RUN	INDEX	BIN
1.			23	23	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

**Figura F 10 Tratamiento 6**



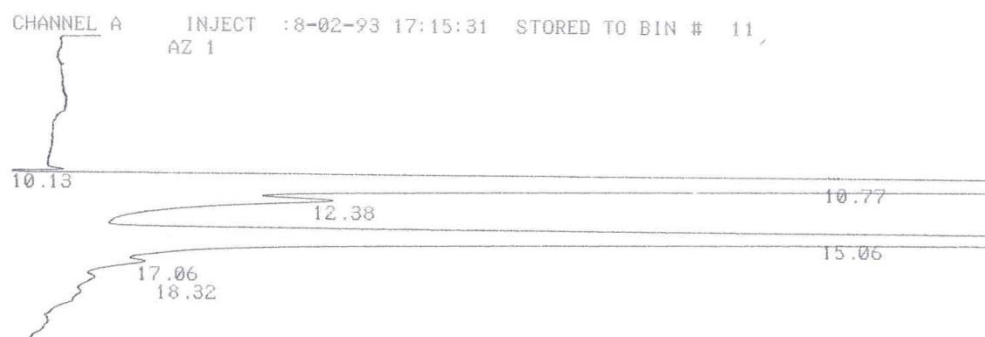
DATA SAVED TO BIN # 26

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

FILE 1. METHOD 0. RUN 25 INDEX 25 BN 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	

**Figura F 11** Tratamiento 7



DATA SAVED TO BIN # 11

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

FILE	METHOD	RUN	INDEX	BIN
1.	0.	11	11	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	

**Figura F 12 Tratamiento 8**