



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**Fitorremediación de compuestos fenólicos en
aguas residuales, con peroxidasas vegetales.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO

P R E S E N T A:

NANCY NAYELI DOMÍNGUEZ ALFARO

**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. LEONORA SÁNCHEZ GARCÍA- FIGUEROA**

México, D. F. Junio 2009





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Tere y Jorge

...por el infinito amor y el apoyo incondicional que me demuestran cada día.

A mis hermanos Jorge y Mónica

...por la felicidad, el cariño y la armonía que constantemente me contagian.

A mis abuelitos, tíos y primos

...por aceptarme como soy y por el afecto que nunca dejan de obsequiarme.

A mis compañeros de trabajo Rodrigo, Juan, Mario y amigos de la carrera en especial a Giovanna, Denisse, Rocío, Azrael, Fátima

...por esa amistad que me brindan siempre y por los momentos que pasamos.

A mi asesora de tesis, Dra. Leonora Sánchez García-Figueroa

... por su confianza, su guía, pero sobre todo por la gran oportunidad.

A los sinodales: Dra. Esther Matiana García Amador, Biól. Raúl Arcos Ramos, Q. Martha T. Julieta Oliveros García y Biól. Leticia López Vicente

... por sus consejos y la valiosa aportación en la mejora del trabajo.

A la FES Zaragoza, así como al Jefe de la Carrera de Biología, M. en C. Carlos Pérez Malvárez y al Secretario Técnico, Biól. Rubén Zulvarán Rosales

... por todas sus atenciones, por su orientación y por su paciencia.

POR TODO, MIL GRACIAS.

DEDICATORIA

A Dios con amor: por ser mi inspiración, mi fuerza, mi paciencia, mi compañía en cada día malo y bueno de la vida, por su eterna bondad y con el fin de devolverle un poquito de lo muchísimo que me da; le dedico este trabajo, este esfuerzo, el gran sueño, el deseo de siempre.

*“Naturaleza en lo vario
Tanto su poder mostró,
Siendo todo necesario,
Que un veneno aún no engendro
Sin engendrar su contrario”.*

Calderón de la Barca (1600-1681)

Militar, poeta y dramaturgo español.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
MARCO TEÓRICO	4
1. Biorremediación	4
1.1 Fitorremediación.....	5
1.2 Métodos de aplicación de fitorremediación.....	6
1.2.1 <i>In situ</i>	6
1.2.2 <i>In vivo</i>	6
1.2.3 <i>In vitro</i>	7
1.3 Aplicaciones de la fitorremediación.	8
1.4 Biorreactor	8
2. Desechos vegetales	10
3. Enzimas vegetales.....	10
3.1 Peroxidasas vegetales	10
3.2 Actividad enzimática	11
3.3 Importancia de las peroxidasas vegetales.....	12
4. Aguas de desecho industrial.....	13
4.1 Contaminantes: compuestos fenólicos.....	15
4.1.1 Fenol	17
4.1.2 p-clorofenol	19
4.1.3 Cuantificación de fenoles	20
PROBLEMÁTICA	21
JUSTIFICACIÓN	23

HIPÓTESIS	24
OBJETIVO GENERAL	25
OBJETIVOS PARTICULARES	25
METODOLOGÍA	26
1. Trabajo de campo.....	26
2. Trabajo de laboratorio.....	26
3. Trabajo de gabinete.....	31
4. Diagrama de flujo general	32
RESULTADOS	33
1. Actividad enzimática.....	33
2. Fitorremediación de agua contaminada con fenol	35
2.1 Cinética de remoción de fenol con vegetal en secciones	35
2.2 Cinética de remoción de fenol con vegetal en secciones, segundo uso.....	38
2.3 Cinética de remoción de fenol con vegetal en secciones, tercer uso.....	41
2.4 Cinética de remoción de fenol con vegetal en extracto	43
2.5 Cinética de remoción de fenol con vegetal en polvos acetónicos.....	46
2.6 Prueba de pH para remoción de fenol.....	49
3. Fitorremediación de agua contaminada con p-clorofenol	50
3.1 Cinética de remoción de p-clorofenol con vegetal en extracto.....	50
3.2 Prueba de pH para remoción de p-clorofenol	53
ANÁLISIS DE RESULTADOS	54
CONCLUSIONES	62
RECOMENDACIONES	63
REFERENCIAS CITADAS	64
ANEXO	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reacción entre el guayacol y el H ₂ O ₂ con peroxidasa.....	11
Figura 2. Estructura del fenol.....	18
Figura 3. Estructura del p-clorofenol	19
Figura 4. Reacción entre 4-AAP y fenol.....	20
Figura 5. Muestras de extracto vegetal.....	26
Figura 6. Muestras de polvo acetónico.....	27
Figura 7. Muestras de vegetal en secciones.....	28
Figura 8. Fitorremediación de vegetal en secciones.....	29
Figura 9. Ejemplo de curva estándar de la reacción entre 4-AAP y fenol.....	31

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Diluciones para fenol y p-clorofenol	30
Cuadro 2. Concentraciones de fenol utilizadas para la fitorremediación en milimoles y en mg/L.	54
Cuadro 3. Miligramos de fenol [0.5, 1.0, 5.0 mM] removidos con vegetal en secciones; en los tres usos a las 48 horas de reacción.....	55
Cuadro 4. Miligramos de fenol [0.5, 1.0, 5.0 mM] removidos con vegetal en extracto con buffer de fosfatos en tres horas de reacción.....	57
Cuadro 5. Miligramos de fenol [0.5, 1.0, 5.0 mM] removidos con vegetal en polvos acetónicos en dos horas de reacción.....	58
Cuadro 6. Comparación entre los resultados de la fitorremediación de fenol en otras investigaciones con los más altos obtenidos.....	59
Cuadro 7. Miligramos de 4-clorofenol [0.5, 1.0, 5.0 mM] removidos con vegetal en extracto con buffer de fosfatos en hora y media de reacción... ..	60
Cuadro 8. Comparación entre los resultados de la fitorremediación de 4-clorofenol en otras investigaciones con los obtenidos... ..	61
Cuadro 9. Cantidad de contaminante para preparación de agua contaminada.. ..	73
Cuadro 10. Cantidad de polvo acetónico obtenido y utilizado en la fitorremediación.....	74

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Actividad enzimática de las peroxidasas de sep-dic 2008 y enero 2009,.....	33
Gráfica 2. Actividad enzimática de las peroxidasas (de polvos acetónicos) de oct-nov 2008,.....	34
Gráfica 3. Remoción de fenol [0.5 mM] con vegetales en secciones.	35
Gráfica 4. Remoción de fenol [1.0 mM] con vegetales en secciones.	36
Gráfica 5. Remoción de fenol [5.0 mM] con vegetales en secciones.	37
Gráfica 6. Remoción de fenol [0.5 mM] con vegetales en secciones de segundo uso.....	38
Gráfica 7. Remoción de fenol [1.0 mM] con vegetales en secciones de segundo uso.....	39
Gráfica 8. Remoción de fenol [5.0 mM] con vegetales en secciones de segundo uso.....	40
Gráfica 9. Remoción de fenol [0.5 mM] con vegetales en secciones de tercer uso,..	41
Gráfica 10. Remoción de fenol [1.0 mM] con vegetales en secciones de tercer uso.....	42
Gráfica 11. Remoción de fenol [0.5 mM] con vegetales en extracto de buffer de fosfatos.....	43
Gráfica 12. Remoción de fenol [1.0 mM] con vegetales en extracto de buffer de fosfatos.....	44
Gráfica 13. Remoción de fenol [5.0 mM] con vegetales en extracto de buffer de fosfatos.....	45
Gráfica 14. Remoción de fenol [0.5 mM] con vegetales en polvos acetónicos.....	46
Gráfica 15. Remoción de fenol [1.0 mM] con vegetales en polvos acetónicos.....	47
Gráfica 16. Remoción de fenol [5.0 mM] con vegetales en polvos acetónicos.....	48
Gráfica 17. Efecto de pH en la transformación de fenol [1 mM] con vegetales en secciones..	49
Gráfica 18. Remoción de p-clorofenol [0.5 mM] con vegetales en extracto de buffer de fosfatos.....	50
Gráfica 19. Remoción de p-clorofenol [1.0 mM] con vegetales en extracto de buffer de fosfatos.....	51
Gráfica 20. Remoción de p-clorofenol [5.0 mM] con vegetales en extracto de buffer de fosfatos.....	52
Gráfica 21. Efecto de pH en la transformación de 4-clorofenol [1 mM] con vegetales en extracto.....	53

RESUMEN

La biorremediación es el proceso que emplea organismos para resolver problemas específicos medioambientales, como la contaminación; el uso de vegetales para eliminar o acumular contaminantes peligrosos es definido como fitorremediación. Las peroxidasas contenidas en el tejido vegetal median el acoplamiento oxidativo de contaminantes fenólicos, seguido por la precipitación de los polímeros formados en el medio acuoso.

Con base en lo anterior, el objetivo del trabajo fue el de evaluar la aplicación de las peroxidasas de desechos vegetales como la cáscara de rábano (*Raphanus sativus* L.), cáscara de tomate (*Physalis ixocarpa* Brof.), tallo de flor de calabaza (*Curcubita pepo clypeata* L.), tallo de brócoli (*Brassica oleracea* var *Itálica* L.), vaina de haba (*Vicia faba* L.). Los vegetales se utilizaron en secciones, en extracto de buffer y en polvos. Se determinó la actividad enzimática con guayacol como sustrato, se realizó la fitorremediación de fenol y p-clorofenol en agua, y por medio de la técnica de 4-aminoantipirina (4-AAP) se monitoreo la cantidad de fenoles; también se realizaron pruebas a diferentes valores de pH.

Se observó que con vegetal en extracto de buffer el tiempo de eliminación de contaminante fue menor; la mayor remoción de 4-clorofenol fue de 282 mg/L en 1.5 h por la cáscara de rábano y del tallo de flor de calabaza mientras que para el fenol fue de 470 mg/L en 48 h por el tallo de flor de calabaza en secciones. En agua contaminada con fenol [1 mM] a diferentes valores de pH la mayoría de los vegetales funcionan a pH 6, para 4-clorofenol [1 mM] en un pH 8 funcionan todos los vegetales a excepción de la vaina de haba que requiere un pH de 2.

INTRODUCCIÓN

Los fenoles y clorofenoles son sustancias extremadamente peligrosas, las cuales se encuentran en una variedad de elementos en el ambiente (aire, aguas superficiales, aguas subterráneas, suelos y sedimentos) debido principalmente a la descarga de efluentes industriales y de lixiviados de sitios de vertido (Santos de Araujo y col., 2006). Otras fuentes de fenoles las encontramos en la aplicación de pesticidas y en el uso de productos que contienen fenol como: desinfectantes, antisépticos y preparaciones medicinales, incluyendo enjuagues y pastillas para el dolor de garganta (Bayramoglu y Arica, 2008).

La exposición de fenoles puede tener como resultado daño en el hígado y anemia hemolítica. Los fenoles más comunes (fenol, 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,5-triclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, pentaclorofenol y cresoles) están en la lista US EPA de contaminantes prioritarios (US EPA 2004).

Técnicas físicas y químicas son utilizadas en laboratorio y adaptadas a plantas piloto para evaluar la remoción de fenol de agua contaminada. Para la eliminación de contaminantes fenólicos se han usado métodos, en los que se incluyen tratamientos microbianos o tratamientos enzimáticos (Santos de Araujo y col., 2006). Las preparaciones de peroxidasas libres e inmovilizadas han probado ser sistemas altamente eficientes en la degradación de fenoles y clorofenoles (Cooper y Nicell, 1996).

Se sabe que las peroxidasas oxidan compuestos aromáticos en presencia de peróxido de hidrógeno y forman productos poliméricos; estos polímeros tienen un alto peso molecular y son generalmente insolubles en medios acuosos, así,

éstos pueden ser fácilmente precipitados y removidos del cuerpo de agua tratado (Bayramoglu y Arica, 2008). La peroxidasa del rábano europeo se ha usado en muchos estudios para la remoción de compuestos fenólicos de medios acuosos; actualmente no se aplica a escala industrial, debido principalmente al alto costo del tratamiento enzimático (Dec y Bollag, 1996).

El propósito del estudio fue el de examinar la aplicación de las peroxidosas de varios materiales vegetales (cáscara de rábano, cáscara de tomate, tallo de brócoli, tallo de flor de calabaza, vaina de haba) en extracto, en polvo y en secciones para la remoción de fenol y 4-clorofenol en medio acuoso.

MARCO TEÓRICO

1. BIORREMEDIACIÓN

A mediados del siglo XX se desarrollaron las primeras investigaciones encaminadas a estudiar el potencial de los microorganismos para biodegradar contaminantes (Zobell, 1946; Davis, 1956). Este "uso" intencionado recibió entonces el nombre de biorremediación ("bioremediation"). Las primeras técnicas que se aplicaron fueron similares al "land farming" ("labranza") actual y sus demandantes, lógicamente, compostas petrolíferas. Las primeras patentes, fundamentalmente para remediación de vertidos de gasolina, aparecen en los años 70.

En los años 80 se generalizó el uso del aire y peróxidos para suministrar oxígeno a las zonas contaminadas, mejorando la eficiencia de los procesos degradativos; durante los años 90 el desarrollo de las técnicas de "air sparging" (burbujeo de oxígeno) hizo posible la biorremediación en zonas por debajo del nivel freático (Rodríguez y Sánchez, 2002). Al mismo tiempo, la implementación en la práctica de aproximaciones experimentales en el laboratorio, permitió el tratamiento de hidrocarburos clorados, los primeros intentos con metales pesados, el trabajo en ambientes anaerobios, etc. Paralelamente, se desarrollaron métodos de ingeniería que mejoraron los rendimientos de las técnicas más populares para suelos contaminados: "landfarming", "composting", etc. (Riser-Roberts, 1998).

Se entiende a la biotecnología como un conjunto de innovaciones tecnológicas basadas en la aplicación de procesos biológicos para obtener bienes y servicios para el desarrollo de actividades científicas de investigación, utilizada también para la limpieza del medio ambiente. Como parte de la

biotecnología existe la biorremediación, la cual es una técnica que puede utilizarse como auxiliar en la descontaminación, emplea procesos naturales para eliminar las sustancias químicas perjudiciales para el ambiente (Luna y col., 2005).

De esta forma, la botánica, la ingeniería y otras disciplinas se han asociado para proponer nuevas soluciones a estos problemas a través de tecnologías de biorremediación. Sin embargo, existe aún la necesidad de que los investigadores y organismos relacionados compartan las experiencias y resultados obtenidos en el campo y en laboratorio, para la búsqueda de las combinaciones y sistemas más efectivos que se adapten a las situaciones especiales de las zonas contaminadas (Luna y col., 2005). Dentro de la biorremediación es importante mencionar a la fitorremediación, que es una tecnología emergente que utiliza plantas para remediar aire, suelos, sedimentos, aguas superficiales y aguas subterráneas contaminadas con metales tóxicos, toxinas orgánicas y otros elementos (Luna y col., 2005).

1.1 FITORREMEDIACIÓN

La fitorremediación (*phyto* = planta y *remediación* = mal por corregir), se define como el proceso que utiliza plantas para remover, transferir, estabilizar, concentrar y/o destruir contaminantes, tanto orgánicos como inorgánicos, puede aplicarse ya sea *in situ* o *ex situ*. Entre los mecanismos que la llevan a cabo se encuentran: la rizodegradación, la fitoextracción, la fitodegradación y la fitoestabilización (Steven, 2005).

En la rizodegradación (degradación a través de la raíz) las sustancias excretadas de manera natural, suministran nutrientes para los microorganismos, mejorando su actividad biológica, se lleva a cabo en el

suelo que rodea a las raíces; en la fitoextracción, los contaminantes son captados por las raíces (fitoacumulación), para después ser traslocados y/o acumulados hacia los tallos y hojas (fitoextracción). Cuando se lleva a cabo la fitoestabilización, las plantas limitan la movilidad y biodisponibilidad de los contaminantes en el suelo ya que la producción en las raíces de compuestos químicos pueden adsorber y/o formar complejos con los contaminantes, inmovilizándolos así en la interfase raíces:suelo. Por último la fitodegradación es un proceso que consiste en el metabolismo de los contaminantes dentro de los tejidos de la planta, a través de enzimas que catalizan su degradación (Agudelo y Macías, 2005; Schnoor y col., 1995).

1.2 MÉTODOS DE APLICACIÓN PARA FITORREMEDIACIÓN

1.2.1 *In situ*

La fitorremediación *in situ* consiste en la colocación de plantas vivas en la superficie contaminada de agua o de suelo, o en el suelo que éste en contacto con agua subterránea contaminada, con el propósito de remediarla. Si la fitorremediación consiste sólo en la salida y acumulación de determinada transformación de un contaminante, las plantas pueden ser cosechadas y removidas del sitio después de la remediación para la eliminación o recuperación de los contaminantes. Un requisito de la aplicación *in situ* es que el contaminante debe estar físicamente accesible a las raíces. Esta aplicación generalmente es la estrategia de fitorremediación menos costosa (Susarla y col., 2002).

1.2.2 *In vivo*

Para sitios donde el contaminante no es accesible como en acuíferos profundos es posible un método alternativo para aplicar la fitorremediación. En esta aplicación el contaminante es extraído usando medios mecánicos, en

donde la materia contaminada es transferida temporalmente a un área de tratamiento donde es expuesta a plantas seleccionadas para su óptima fitorremediación. Después del tratamiento, el suelo o agua limpios, pueden ser regresados al sitio original y las plantas pueden ser cosechadas para eliminarse si es necesario. Esta aplicación es generalmente más cara que la mencionada anteriormente (*in situ*). Puede ocurrir que el tratamiento se lleve a cabo ya sea en el sitio de la contaminación o en otro lugar (Susarla y col., 2002).

1.2.3 *In vitro*

En las primeras dos aplicaciones (*in situ* e *in vivo*), plantas vivas son usadas para la fitorremediación. Un tercer método de aplicación para la fitorremediación es vía componentes de plantas vivas, como los extractos enzimáticos. En teoría este método puede ser aplicado *in situ* bajo alguna situación, aplicando extracto de planta a estanques contaminados o a tierra húmeda, o a través del uso de enzimas en una barrera porosa en un canal de agua contaminada. Probablemente este método puede también ser aplicado a material contaminado, que pueda ser colocado a un área de tratamiento temporal como se describió en el método anterior (*in vivo*). Teóricamente esta aplicación puede ser el método más caro de fitorremediación debido al costo de los preparados y extractos de enzimas vegetales; sin embargo, en algunas plantas, como el terragón (*Artemisa dracunculata* var. *satiya*), son liberados exudados de la misma planta, bajo estrés que se pueden obtener con bajos costos de producción. Un factor importante a considerar para esta aplicación es el tiempo que la enzima permanece activa para descomponer los contaminantes (Susarla y col., 2002).

1.3 APLICACIONES DE LA FITORREMEDIACIÓN

La fitorremediación es un acercamiento biológico prometedor para solucionar el problema de la contaminación con el uso de plantas superiores, combinando la ingeniería con la actividad natural. La intervención humana se puede requerir para establecer a la comunidad apropiada de planta/microbio en el sitio o para aplicar técnicas agronómicas para realzar la degradación natural. (Santos de Araujo y col., 2006).

En los últimos años los sistemas biológicos se han empleado con más frecuencia para diversos fines. Estos sistemas emplean asociaciones microbiológicas extraídas de las instalaciones de tratamientos convencionales, los cuales se inoculan directamente en el bioreactor (Luna y col., 2005).

1.4 BIORREACTOR

Un biorreactor es un dispositivo biotecnológico que suministra un ambiente controlado que garantiza y maximiza la producción y el crecimiento de un cultivo vivo (parte biológica), externamente el bioreactor protege ese cultivo del ambiente externo: contaminado y no controlado; en la parte tecnológica el bioreactor proporciona los controles necesarios para que la operación o proceso (bioproceso) se lleve a cabo con economía, alto rendimiento (productividad) y en el menor tiempo posible (Giorno y Drioli, 2000; Koshkin y Shirkévich, 1975).

El funcionamiento estable del reactor dependerá de los siguientes factores (Belhalteche, 1995; Metcalf, 1995):

- a) Concentración de los compuestos necesarios para el crecimiento y/o actividad biológica (nutrimentos y sustratos).

- b) Mantenimiento de parámetros físicos y químicos (temperatura, pH) del medio en rangos relativamente limitados para que la actividad del material biológico sea óptima.
- c) Diseño del sistema para que sea capaz de resistir variaciones de las condiciones normales de operación; así como una agitación que impida la formación de zonas sin tratar.

La biorremediación asistida con microalgas (géneros *Chlorella* y *Scenedesmus*) resulta particularmente atractiva debido a su capacidad fotosintética, que les permite convertir la energía solar en biomasa, misma que incorpora nutrientes como nitrógeno y fósforo causantes de la eutroficación, los procesos que utilizan microalgas y cianobacterias, están enfocados principalmente a la remoción de nutrientes (Terry y Ston, 2002; Toumi y col., 2000) y de metales pesados presentes en las aguas residuales. Los estudios a nivel piloto sobre el biotratamiento de residuales agropecuarios se han hecho casi exclusivamente (Travieso y col., 2004) en lagunas de tipo algal de alta tasa (uso de microalgas para tratamiento), en tanto que a nivel laboratorio se emplean bioreactores de diversos diseños, (Sánchez y col., 1995) entre los que se encuentran los cilíndricos, triangulares (González y col., 1997) y los de tipo carrusel (Cañizares y col., 1994a; Cañizares-Villanueva y col., 1994b;). No obstante, también se encuentra bien documentada su capacidad para remover elementos radioactivos a partir de efluentes (Ferrera-Cerrato y col., 2006).

En los últimos años los sistemas biológicos se han empleado con más frecuencia para diversos fines; estos sistemas emplean asociaciones microbiológicas extraídas de las instalaciones de tratamientos convencionales, los cuales se inoculan directamente en el bioreactor (Gómez, 1997).

2. DESECHOS VEGETALES

Se consideran desechos orgánicos vegetales de la producción agrícola a los residuos de cosecha que están formados por los órganos aéreos y subterráneos de las plantas. También se denomina rastrojos a los residuos de la parte aérea que permanecen en la superficie del suelo después de la cosecha. La cantidad de residuos de cosecha que se aporta a un suelo depende de la biomasa alcanzada en un ciclo de producción.

3. ENZIMAS VEGETALES

3.1 PEROXIDASAS VEGETALES

Las enzimas peroxidasas (EC 1.11.1.7) están ampliamente distribuidas en animales, plantas y microorganismos, presentan múltiples formas isoenzimáticas que difieren tanto en la secuencia de sus aminoácidos como en sus propiedades químicas (Grambow, 1982). Los resultados de numerosos estudios realizados con diferentes especies, determinaron que las peroxidasas están involucradas en procesos fisiológicos relevantes de las plantas superiores tales como lignificación (Gaspar y col., 1982), catabolismo de auxinas (Grambow, 1982), resistencia a patógenos (Reuvini y col., 1992), así como en diversos mecanismos de respuesta que éstas presentan a diferentes situaciones de estrés (Tarrago y col., 2003).

Para extraer las enzimas de las células que las contienen, es necesario dividir finamente el tejido, por medio de un homogeneizador o una licuadora; los tratamientos más enérgicos comprenden la molienda del tejido con arena, el empleo de vibraciones ultrasónicas, los procesos alternados de congelamiento y descongelamiento, la autólisis, el desecado con calor o el empleo de solventes como la acetona, el éter y el tolueno. El desecado con acetona y la

producción de los llamados polvos acetónicos constituyen un excelente ejemplo de rotura de la membrana celular y la obtención de un material rico en enzimas y de fácil conservación (Laguna, 1996).

3.2 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La peroxidasa es una hemoproteína (presenta como grupo prostético un grupo Hem) que cataliza la oxidación de compuestos dadores de hidrógeno, como o-fenilendiamina (aminas aromáticas), guayacol y pirogalol (fenoles) por medio de peróxidos (de ahí el nombre peroxidasa). El guayacol es el sustrato oxidable más usado para determinar la actividad de ésta enzima (figura 1), dicho sustrato es oxidado a un complejo coloreado de tetraguayacol (color rojo ladrillo) en presencia de peroxidasa, la velocidad de formación de coloración, es utilizada como medida de la actividad enzimática por lecturas espectrofotométricas de las absorbancias en relación con el tiempo (Fernández y col., 2003; Pérez y col., 2004; Santos de Araujo y col., 2006):

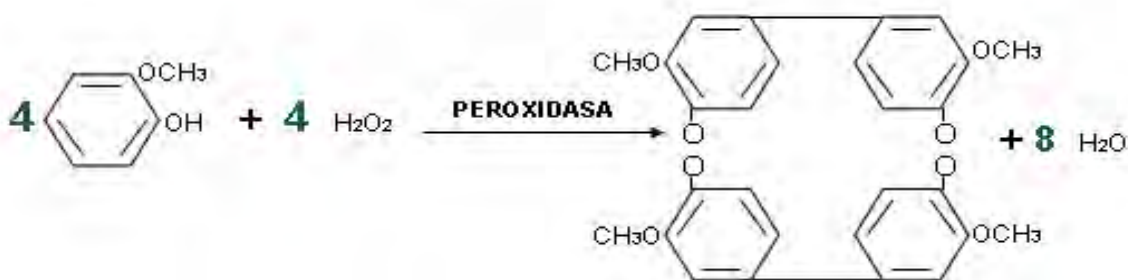


Figura 1 Ecuación en la cual se observa la reacción entre 4 moléculas de guayacol y 4 moléculas de peróxido de hidrógeno, gracias a la catálisis de la peroxidasa se obtiene un producto de tetraguayacol y 8 moles de agua.

La actividad enzimática depende del vegetal (los rábanos picantes son especialmente activos), del sustrato oxidable que se emplea como reactivo y del pH y temperatura a que se trabaja (Duran y Esposito, 2000; Karam y Nicell,

1997). Tratándose del vegetal depende del tipo de suelo donde fue cultivado, el pH del suelo, el tipo de agua de riego, condiciones ambientales donde se sembró (clima), etc.

Como la mayoría de las enzimas, la peroxidasa puede ser inactivada por el calor, siendo una de las que precisan mayor temperatura y más tiempo para su inactivación. Posee, además, la propiedad peculiar de la regeneración enzimática. Este fenómeno consiste en que al inactivarla por medio del calor recupera parcialmente su actividad después de un cierto tiempo. Esto ha sido explicado, aduciendo que la fracción proteica de la enzima sufre una desnaturalización sólo parcial, con pérdida de su estructura terciaria, si el calor se aplica un tiempo muy corto, produciéndose luego una reversión de la proteína a su estado normal por recombinación de sus grupos hidrógenos o sulfhidrilos.

Este efecto del calor sobre la actividad peroxidasa es importante en la industria de alimentos y la regeneración enzimática de la peroxidasa puede causar serios problemas en los caracteres organolépticos. Se ha demostrado en el laboratorio que esta actividad enzimática puede depender totalmente del calentamiento (Bayramoglu y Arica, 2008; González y col., 2006).

3.3 IMPORTANCIA DE LAS PEROXIDASAS VEGETALES

Las peroxidasas llevan a cabo reacciones de deshidrogenación oxidativa. El mecanismo de esta reacción comienza cuando una molécula de H_2O_2 hace que el Fe^{3+} pase a Fe^{4+} generando un derivado oxo-ferril (IV) con un radical libre en la porfirina, al cual se le llama compuesto I. La histidina y la arginina facilitan el rompimiento del H_2O_2 y para que el Fe^{3+} acepte el protón que el rompimiento le proporciona, donando un electrón (Kobayashi y col., 2001). En

el segundo paso del mecanismo y gracias a la presencia de un agente reductor externo, se forma un oxo-ferril (IV) porfirina catiónica o compuesto II. La catálisis oxidativa de la peroxidasa en solución acuosa da un incremento en la formación de compuestos oligoméricos, estos tienen baja solubilidad hacia el solvente, de tal modo que se forman polímeros de alto peso molecular que tienden a precipitarse (Akhtar y Husain, 2006; Buchanan y Nicell, 1997; Ghiourelotis y Nicell, 1999; Wright y Nicell, 1999; Kobayashi y col., 2001; Singh y col., 2006; Bayramoglu y Arica, 2008). La peroxidasa del rábano europeo puede catalizar la formación de radicales libres por medio de la polimerización de una variedad de compuestos aromáticos incluyendo al fenol (Cheng y col., 2006; Cooper y Nicell, 1996; Tatsumi y col., 1994), clorofenoles (Lai y Lin, 2005; Tatsumi y col., 1996) y otros compuestos fenólicos (García-Ochoa y col., 2007; Nicell y Wright, 1997). El uso de materiales vegetales como el rábano europeo (*Armoracia rusticana* L.) puede ser una alternativa viable para la desodorización de estiércol (Govere y col., 2007).

Para la Comisión Científica de la Unión Europea las peroxidasas por su aplicación para conservar el medio ambiente son de interés biotecnológico para el siglo XXI (Rodríguez y col., 2002).

4. AGUAS DE DESECHO INDUSTRIAL

Una gran parte de los vertidos residuales que genera la Industria Química, y otras industrias relacionadas con ella, están en forma de corrientes acuosas que, en muchos casos, contienen compuestos orgánicos en una concentración demasiado baja para que su recuperación sea rentable, pero es lo suficientemente elevada para constituir una fuente de contaminación importante (García-Ochoa y Santos, 1996).

Mientras el crecimiento demográfico continúe la contaminación del agua seguirá siendo un problema sobre el medio ambiente, la infiltración de residuos tóxicos en los acuíferos no se ha interrumpido; para eliminar a los contaminantes es necesario utilizar métodos para tratar y obtener en gran medida agua de calidad, creando una conciencia del reuso del agua a beneficio de todas las personas. Si se logra reusar toda el agua que se utiliza, sólo se requeriría un volumen mínimo de entrada de agua: recircular una y otra vez el agua empleada, buscando métodos alternativos para el tratamiento de aguas residuales, tanto de tipo municipal como industrial (Villegas y col., 2003).

En términos de las aguas residuales, en México se generan alrededor de 420 m³ cada segundo, de estas, las municipales generan 250 m³ /s y las no municipales 170 m³ /s. Las industrias que generan mayor cantidad en volumen son la acuicultura, la industria del azúcar, la industria del petróleo, la industria química y otros servicios, en cuanto a la cantidad de carga orgánica que aportan las industrias, la acuicultura prácticamente no contamina por lo que la industria del azúcar, petróleo y demás son las mayores contribuyentes (INE, 2008).

Se tiene una baja capacidad de tratamiento, aunque hay esfuerzos enormes por incrementar estos niveles de tratamiento (24% en los usos municipales, 13% en los no municipales, básicamente la industria), el marco legal y normativo tiene ciertas limitaciones, la información que se dispone en muchos de estos casos es escasa porque la propia industria no proporciona datos de lo que hace; el reúso es una de las cuestiones que está en bajo nivel y es una de las cosas que requiere mucho trabajo, las acciones de saneamiento son

frenadas por cuestiones económicas, políticas y sociales adversas a estos proyectos.

4.1 CONTAMINANTES: COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos son contaminantes orgánicos comunes en los ecosistemas marinos, principalmente en las zonas costeras donde son introducidos a partir de las descargas de aguas de desecho industriales de diversos tipos, así como los que provienen de la vegetación (González y col., 2006; Torres y Calva, 2002). Los fenoles presentes en estos sistemas son básicamente de origen artificial o sintético, más que naturales, y varios de ellos están considerados como contaminantes críticos prioritarios, representando un grave riesgo para los ecosistemas porque modifican sus características físicas y químicas, además por los efectos tóxicos, tanto crónicos como agudos, que tienen sobre los organismos que habitan en dichos ambientes. Aunque muchos de los compuestos fenólicos pueden ser degradados por los microorganismos aerobios y anaerobios, algunos tienen una gran persistencia en el medio ambiente y llegan a causar efectos dañinos (Ziemys y Kulys, 2005; Torres y Calva, 2002).

Algunos compuestos aromáticos como los fenoles se encuentran en aguas residuales de industrias como: la del papel, textil, farmacéutica, resinas y plásticos, refinamiento del petróleo, etc. (Maloney y col., 1984; Gimeno y col., 2005; Singh y Singh, 2002) las concentraciones típicas de fenoles varían entre 35 y 400 mg/L (Chen y col., 1997). El tratamiento biológico puede ser una manera económica de tratar estas aguas residuales peligrosas. Sin embargo, existen casos extremos como en algunas aguas residuales de petroquímicas, donde residuos como las sosas gastadas contienen concentraciones totales de

fenoles muy altas, las cuales pueden alcanzar valores de 30,000 a 50,000 mg/L (Olguin-Lora y col., 2003). Como ejemplo, en el caso de una refinería mexicana, que produce 14 m³/d de aguas residuales llamadas sosas gastadas, la concentración de fenoles es de 30,000 mg/L (Olguin-Lora y Razo-Flores, 2004).

La gran cantidad de estos que son liberados a los ambientes marinos como resultado de las diferentes actividades humanas, ha provocado que sean considerados contaminantes críticos prioritarios, entre los cuales están: fenol, 2-clorofenol, 4-clorofenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, tetraclorofenol, pentaclorofenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, 2,3-dinitrofenol, 4-metilfenol y 2,4-dimetilfenol (Alonso y col., 1998). Estas corrientes son especialmente dañinas, pues repercuten sobre la flora de las plantas tradicionales de tratamiento biológico de las aguas, afectando a su funcionamiento. Además, si el agua conteniendo fenoles se clora, aumenta su potencial tóxico, ya que se forman clorofenoles, cuyos niveles permitidos son mucho menores, más de un orden de magnitud, que los del fenol (García-Ochoa y Santos, 1996). Los compuestos fenólicos son considerados como contaminantes prioritarios debido a que son dañinos para la salud humana aun a bajas concentraciones (Lazo y col., 2007). Tales compuestos hidroxiaromáticos tóxicos cuando se encuentran en altos niveles se sospecha que son carcinogénicos (Klibanov y col., 1983, Dec y Bollag, 1994; Milánd y col., 1996).

Cuando el tratamiento biológico para la eliminación de compuestos orgánicos especialmente tóxicos es inviable, se han desarrollado una serie de métodos alternativos, usualmente denominados avanzados (García-Ochoa y Santos, 1996). Actualmente se aplican métodos para quitar compuestos fenólicos de aguas residuales en las que se incluye la degradación microbiana, la adsorción

en carbón activado, la oxidación química, la incineración, la extracción de solventes entre otras; aunque, presentan desventajas por ejemplo, el bajo rendimiento, la alta generación de productos que son aún más tóxicos que los fenoles originales (González y col, 2006). Algunos microorganismos del género *Candida* tienen un potencial de degradación de fenol de hasta 1700 mg/L (Fialova y col., 2004; Yang y col., 2005).

Los compuestos orgánicos aromáticos, de elevado peso molecular y baja degradabilidad, crean un problema en el tratamiento de las aguas residuales industriales que los contienen; debido a esto, se han generado trabajos de investigación enfocados a la degradación de dichos compuestos mediante procesos de oxidación avanzada que constituyen uno de los recursos tecnológicos más eficientes para su tratamiento (Ramírez y col., 2002). En la actualidad se están desarrollando métodos enzimáticos muy prometedores para la remoción de estos contaminantes, cuando no pueden ser eliminados por tratamientos biológicos o físicos, mediante el uso de peroxidases y peróxido de hidrógeno (Villalobos y Buchanan 2002, Villegas-Rosas y col., 2002).

4.1.1 FENOL

El fenol es un compuesto aromático con un grupo OH unido al anillo de benceno (figura 2). También conocido como ácido carbólico, ácido fénico, hidroxibenceno, hidróxido de fenilo. En su forma pura es un sólido incoloro, con tonos rosados, si no lo es; comercialmente se puede encontrar en disolución o fundido; su fórmula molecular es C_6H_5OH , de masa molecular UMA (Unidad de Masa Atómica), Dalton 94.11 g/mol. El fenol tiene una densidad 1.07 g/cm³, punto de fusión 40.5 °C, punto de ebullición 181.7 °C. Soluble en agua, punto de inflamabilidad 79 °C.

Su ingestión provoca irritaciones de las mucosas en la boca, faringe, esófago y tracto gastrointestinal; 1g puede resultar letal. Su inhalación irrita las mucosas, dificulta la respiración y provoca tos. La absorción en cantidades considerables provoca: cefaleas, aturdimiento, confusión, pérdida de conocimiento, efectos sobre el SNC (shock, narcosis), alteraciones del cuadro sanguíneo, paro respiratorio y muerte. Puede ser absorbido al contacto con la piel y provocar enrojecimiento y quemaduras. La exposición crónica produce daños renales y hepáticos; al contacto con los ojos produce enrojecimiento y quemaduras.

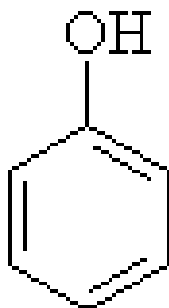


Figura 2 Estructura del fenol.

Se utiliza en la industria de plásticos (fenoplastos, poliepóxidos, policarbonatos), síntesis de bisfenol-A, en fibras sintéticas (poliamidas), en la refinación del petróleo, en la industria farmacéutica (desinfectante, anestésico), en la manufactura de detergentes, pesticidas (clorofenoles), colorantes, aditivos para aceites, como agente en análisis químicos, etc. Industrias como manufactura de colorantes desechan 190 g/L, manufactura de productos químicos de 0.1-0.3 mg/L, conversión de carbones 240 mg/L y refinería 0.2 mg/L, refinería 0.2 mg/L (Alvarado y Calva, 2002; Torres y Calva, 2002).

4.1.2 p-CLOROFENOL

El 4-clorofenol es un sólido húmedo de color blanco a amarillento, cristalino (similar a la arena). Se le utiliza para fabricar otras sustancias químicas y se le ha usado como antiséptico local, esterilizante tópico y como solvente.

También se le conoce como p-clorofenol (figura 3), 4-cloro-1-hidroxibenceno, 4-hidroxiclorobenceno, de peso molecular: 128.6 g/mol, el vapor es más denso que el aire. La sustancia se descompone al calentarla intensamente, produciendo humos tóxicos y corrosivos de cloro, cloruro de hidrógeno. Reacciona con oxidantes. Presión de vapor, Pa a 20°C: 13, punto de ebullición: 220°C, densidad relativa de vapor (aire = 1): 4.44, punto de fusión: 43°C, punto de inflamación: 121°C (c.c.), densidad relativa (agua = 1): 1.2, solubilidad en agua: Moderada (2.7 g/100 mL a Pow: 2.39 20°C).

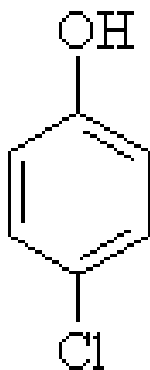


Figura 3 Estructura de p-clorofenol.

Su inhalación provoca tos, vértigo, dolor de cabeza, dificultad respiratoria, dolor de garganta. Al contacto con la piel puede absorberse y producir enrojecimiento por lo que su manejo requiere guantes protectores y traje de protección. En caso de contacto quitar las ropas contaminadas, aclarar y lavar la piel con agua y jabón y proporcionar asistencia médica. Al contacto con los ojos produce enrojecimiento si se da el caso se debe enjuagar con agua

abundante durante varios minutos quitar las lentes de contacto si puede hacerse con facilidad) y proporcionar asistencia médica. Su ingestión provoca dolor abdominal.

Muchos de los compuestos clorofenólicos presentes en aguas de desecho provienen de intermediarios o subproductos químicos de las industrias petroquímicas, papeleras, de plástico, de pesticidas e insecticidas y también de la desinfección convencional del agua potable; se sabe que las manufacturas de productos químicas desechan 0.02 mg/L (Gil y col., 2003; Torres y Calva, 2002).

4.1.3 CUANTIFICACIÓN DE FENOLES

Para determinar la concentración del fenol se realiza un análisis colorimétrico (Dalal y Nath, 2007; Fiamegos y col., 2002), en el cual los compuestos fenólicos dentro de una muestra reaccionan con 4-aminoantipirina (4-AAP) en presencia de ferricianuro de potasio bajo condiciones alcalinas (figura 4). La absorbancia de la mezcla se mide a 510 nm usando un espectrofotómetro después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente (González y col., 2006).

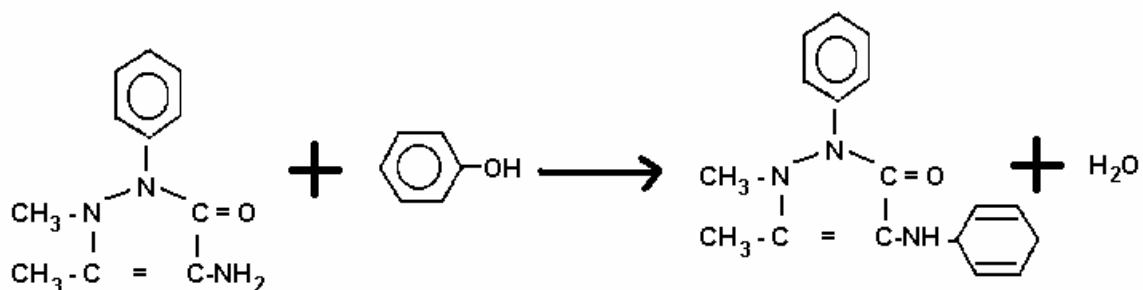


Figura 4 Ecuación en la cual se observa la reacción entre 4-aminoantipirina y fenol.

PROBLEMÁTICA

Según el Instituto Nacional de Ecología (2008), en México se generan 420 m³ de aguas residuales cada segundo, de estas las municipales generan 250 m³ /s y las no municipales generan el resto (170 m³ /s). Las aguas residuales son definidas como aquellas que contienen material disuelto y en suspensión, luego de ser usada por una industria o comunidad (INE, 2008).

En aguas residuales de industrias de papel, textil, farmacéutica, resinas y plásticos así como en las de refinamiento del petróleo se encuentran algunos compuestos aromáticos como los fenoles (Maloney y col., 1984; Gimeno y col., 2005; Singh y Singh, 2002). Los cuales son muy resistentes a la degradación biótica y abiótica en el medio ambiente llegan a causar efectos dañinos (Ziemys y Kulys, 2005; Torres y Calva, 2002), si el agua conteniendo fenoles se clora, aumenta su potencial tóxico (García-Ochoa y Santos, 1996). Alcanzan niveles de 30,000 a 50,000 mg/L (Olguin-Lora y col., 2003).

La descomposición en los cuerpos de agua superficiales se cumple en aproximadamente 7 días al 90% (aguas estancadas) y en el suelo alcanza la misma proporción en aproximadamente 1 día según la microflora y concentración (Rippen, 1989); son considerados como contaminantes prioritarios ya que son perjudiciales para la salud humana, debido a que por inhalación y vía cutánea provoca daños renales, hepáticos y dificultad respiratoria aun a bajas concentraciones (Alonso y col., 1998, Lazo y col., 2007), cuando se encuentran en altos niveles se sospecha que son carcinogénicos (Klibanov y col., 1983, Dec y Bollag, 1994; Milánd y col., 1996).

Se ha podido comprobar la presencia de compuestos fenólicos en diferentes tipos de aguas: subterráneas, de ríos, de mar, potable, de manantial e incluso de en precipitaciones de lluvia y nieve; su presencia en el medio ambiente puede dar lugar a entrada de fenoles en la cadena alimenticia, por ejemplo, se ha encontrado, pentaclorofenol, tetraclorofenol y otros compuestos orgánicos halogenados en mejillones (Hermoso, 2008). La presencia de fenol en aguas subterráneas también contamina el agua potable, la que ya no se podrá consumir debido a su sabor desagradable (Rippen, 1989)

Actualmente se aplican métodos para retirar los compuestos fenólicos de aguas residuales aunque, presentan desventajas en cuanto al bajo rendimiento y la alta generación de productos aún más tóxicos (González y col, 2006).

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad se desarrollan métodos enzimáticos muy prometedores para la remoción de contaminantes hidroxiaromáticos (fenoles), cuando no pueden ser eliminados por tratamientos físicos; mediante el uso de peroxidasas y peróxido de hidrógeno (Villalobos y Buchanan 2002, Villegas-Rosas y col., 2002).

Las peroxidasas son enzimas vegetales que tienen la capacidad de catalizar la formación de radicales libres por medio de la polimerización, estos productos poliméricos con alto peso molecular son insolubles en medios acuosos los cuales son fáciles de separa del cuerpo de agua tratado de forma mecánica filtración, precipitación o decantación (Akhatar y Husain, 2006; Buchanan y Nicell, 1997; Ghiourelotis y Nicell, 1999; Wright y Nicell, 1999; Kobayashi y col., 2001; Singh y col., 2006; Bayramoglu y Arica, 2008).

La peroxidasa de rábano europeo es la más utilizada para el proceso de descontaminación, sin embargo esta enzima tiene un costo elevado sobre todo para un tratamiento a escala industrial, por lo que resulta importante buscar otras peroxidasas más económicas para ser utilizadas en biorremediación de compuestos fenólicos (Cheng y col., 2006; Cooper y Nicell, 1996; Tatsumi y col., 1994).

HIPÓTESIS

Si las peroxidasas reaccionan con compuestos fenólicos produciendo polímeros que se separan por precipitación; entonces las peroxidasas vegetales se pueden usar para un proceso de fitorremediación de aguas residuales.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la aplicación de las peroxidasas de desechos agrícolas (vainas de haba, tallo de brócoli, tallo de flor de calabaza, cáscara de rábano, hoja de tomate) para abatir la contaminación de aguas residuales con compuestos fenólicos.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Extracción de la enzima peroxidasa (por dos métodos: con acetona y con solución buffer) de cada uno de los cinco tipos de desechos de vegetales a trabajar, por separado: vaina de haba, tallo de brócoli, tallo de la flor de calabaza, cáscara de rábano y hoja de tomate.
2. Determinación de la actividad peroxidasa con los extractos vegetales.
3. Realización de la fitorremediación de soluciones modelo de fenol y 4-clorofenol en forma individual (controlando la concentración de los mismos): utilizando cubos del material vegetal, con polvo de acetona y con extracto enzimático en solución buffer.
4. Realización de la cinética de consumo de fenoles por medio de la técnica de la 4-aminoantipirina, para encontrar: a) el pH óptimo para el acoplamiento orto oxidativo, b) concentración del sustrato a la cual la reacción es más eficiente c) presentación del material vegetal en la que se favorece el consumo de fenol d) y el número de veces que se podrá utilizar el tejido vegetal.

METODOLOGÍA

1. TRABAJO DE CAMPO.

OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO.

Se utilizaron en este trabajo: cáscara de rábano (*Raphanus sativus* L.), cáscara de tomate (*Physalis ixocarpa* Brof.), tallo de flor de calabaza (*Curcubita pepo clypeata* L.), tallo de brócoli (*Brassica oleracea* var *Itálica* L.), vaina de haba (*Vicia faba* L.), los cuales se compraron en el mercado, debido a esto se desconoce su procedencia así como las condiciones de cultivo y de almacenamiento.

2. TRABAJO DE LABORATORIO.

EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA CON BUFFER DE FOSFATOS.

La muestra vegetal se licua por un minuto 12 g de vegetal con 36 mL de solución buffer de fosfatos 10mM pH 6.1 (ver anexo), el homogenizado se filtra en gasa y se centrifuga a 3000 rpm por 15 min (Baltazar y Moreno, 2007). Se conserva bien tapado en refrigeración (fig. 5).



Figura 5 Muestras de extracto vegetal de la cáscara de rábano, tallo de flor de calabaza, vaina de haba, tallo de brócoli y cascara de tomate, en ese orden.

PREPARACIÓN DE POLVOS ACETÓNICOS.

La muestra vegetal se licua con la acetona fría cantidad suficiente para cubrirla inmediatamente el homogenizado se filtra al vacío (con el embudo de buchner y el kitasato), retirar lo mas rápido posible la acetona (Hernández y col., 2004); el sólido resultante de la filtración se pesa y se refrigera (Fig. 6).



Figura 6 Muestras de polvo acetónico de la vaina de haba, tallo de brócoli, cáscara de rábano, cascara de tomate y tallo de flor de calabaza, en ese orden.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PEROXIDASA.

En una celda se adiciona 1 mL. de un buffer de fosfato, 1 mL de agua destilada, 200 μ L de guayacol (1% en etanol), 200 μ L de H_2O_2 (0.5% en agua destilada), se agita manualmente (sin vortex) se lee en espectrofotómetro Génesis 10 UV ($t=0$); no dejar demasiado tiempo reaccionando el peróxido, en cuanto se agrega, leer enseguida; evitar burbujas en la muestra a leer, interfieren con la lectura real. Se adicionan los 5 μ l del extracto enzimático, se toman las lecturas de absorbancia cada 10 segundos durante 1 min (Baltazar y Moreno, 2007). Para la actividad enzimática de los polvos acetónicos el sólido se diluye en buffer fosfatos relación 0.1g en 3 mL de buffer fosfatos, de ésta solución se toman los 5 μ l de muestra.

FITORREMEDIACIÓN CON VEGETAL EN SECCIONES.

Colocar 6 g tejido vegetal cortado en cubos de 5 mm en 100 mL de agua contaminada artificial (ver anexo) y 100 μ L de peróxido de hidrógeno [0.5 %]. Mantener en agitación a 200 rpm (fig. 8), determinar la cantidad de fenoles cada 15-20 min (Santos y col., 2005; González y col., 2006). Para conservar los cubos de vegetal más de un día fue necesario envolverlos en papel aluminio bien empaquetados a -72°C en ultracongelador marca Revco (Fig. 7).

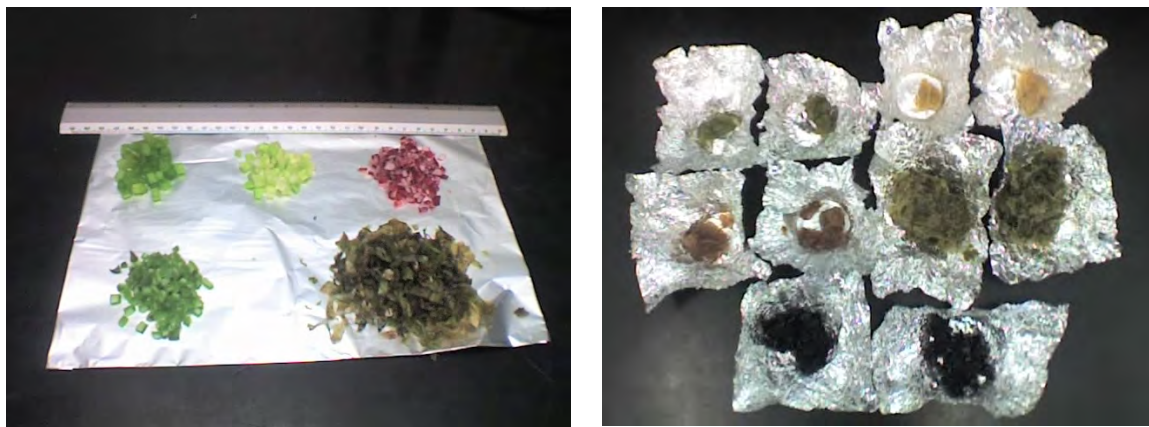


Figura 7 En la foto de la izquierda se observan las muestras de vegetal en secciones, en la parte de arriba se observan el tallo de flor de calabaza, tallo de brócoli y cáscara de rábano (en ese orden) y en la parte de abajo vaina de haba (izquierda) y la cascara de tomate (derecha). En la foto de la derecha se encuentran los vegetales en papel aluminio empaquetados para ultracongelador.

FITORREMEDIACIÓN CON VEGETAL EN EXTRACTO.

Colocar 18 mL de extracto de buffer en 100 mL de agua contaminada y 15 μ L de peróxido de hidrógeno [30%] cuando se usa extracto buffer. Mantener en agitación a 200 rpm y determinar la cantidad de fenoles cada 15-20 min (Santos y col., 2005; González y col., 2006).

FITORREMEDIACIÓN CON VEGETAL EN POLVO.

Colocar 0.2 g de polvos acetónicos en 100 mL de agua contaminada y 15 μ L de peróxido de hidrógeno [30%] cuando se usa extracto buffer. Mantener en agitación a 200 rpm y determinar la cantidad de fenoles cada 15-20 min (Santos y col., 2005; González y col., 2005).



Figura 8 En la foto se puede observar la fitorremediación de vegetales en secciones, los matraz Erlenmeyer deben estar cubiertos y bien etiquetados (vegetal, tipo de contaminante y concentración). El mismo procedimiento se realiza para la fitorremediación de vegetal en extracto y en polvos acetónicos.

CUANTIFICACIÓN DE FENOLES: MÉTODO DE LA 4-AAP.

Tomar una muestra diluida en H₂O destilada (según la concentración del agua contaminada, ver cuadro 1), 15 µL de buffer de amonio pH 10 (ver anexo), 15 µL de solución acuosa de ferricianuro de potasio, agitar y anotar la primera lectura (blanco) en el espectrofotómetro Génesis 10 UV a 510 nm; adicionar 15 µL de solución 4-AAP, agitar, esperar 15 minutos y tomar la lectura en el espectro. Para obtener la absorbancia final restar a la segunda lectura (con 4-AAP) el blanco; lectura de la absorbancia del agua contaminada inicial (tiempo cero) y adicionar los reactivos para el método de la 4-aminoantipirina (Baymaroglu y Arica, 2008; González y col., 2006).

Cuadro 1. Cantidad de muestra y de agua destilada por celda para la cuantificación de fenoles.

DILUCIONES PARA FENOL		
Concentración de fenol (mM)	Cantidad de muestra (mL)	Cantidad de H₂O destilada (mL)
0	0.00	2.55
0.5 y 1.0	0.16	2.40
5	0.04	2.52
DILUCIONES PARA 4-CLOROFENOL		
0.5 y 1.0	0.64	1.91
5	0.16	2.40

PRUEBA DE pH.

Preparar la fitorremediación con agua contaminada artificial [1.0 mM] a diferentes pH 2, 4, 6 y 8 (ver anexo); tomar una muestra diluida (al tiempo en que la remoción sea más alta) en H₂O destilada (según la concentración del agua contaminada, ver cuadro 2) y cuantificar los fenoles por medio del método de 4-aminoantipirina (Dec y Bollag, 1994).

CURVA ESTANDAR.

Determinar la absorbancia de soluciones de fenol y 4-clorofenol a 5 diferentes concentraciones (ver anexo) en el espectrofotómetro con la técnica de 4-aminoantipirina (González y col., 2005). Calculando la línea de tendencia (lineal), ecuación del gráfico y la R cuadrada en el Programa Excel (figura 9).

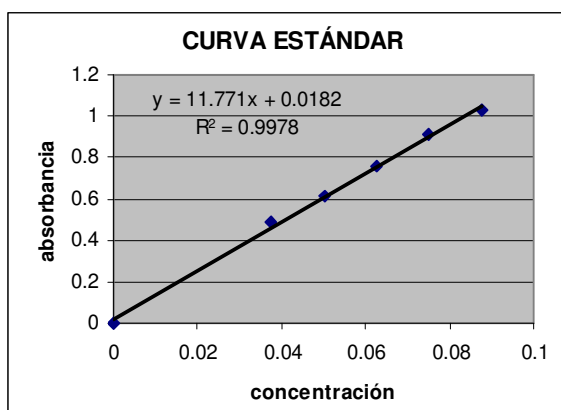
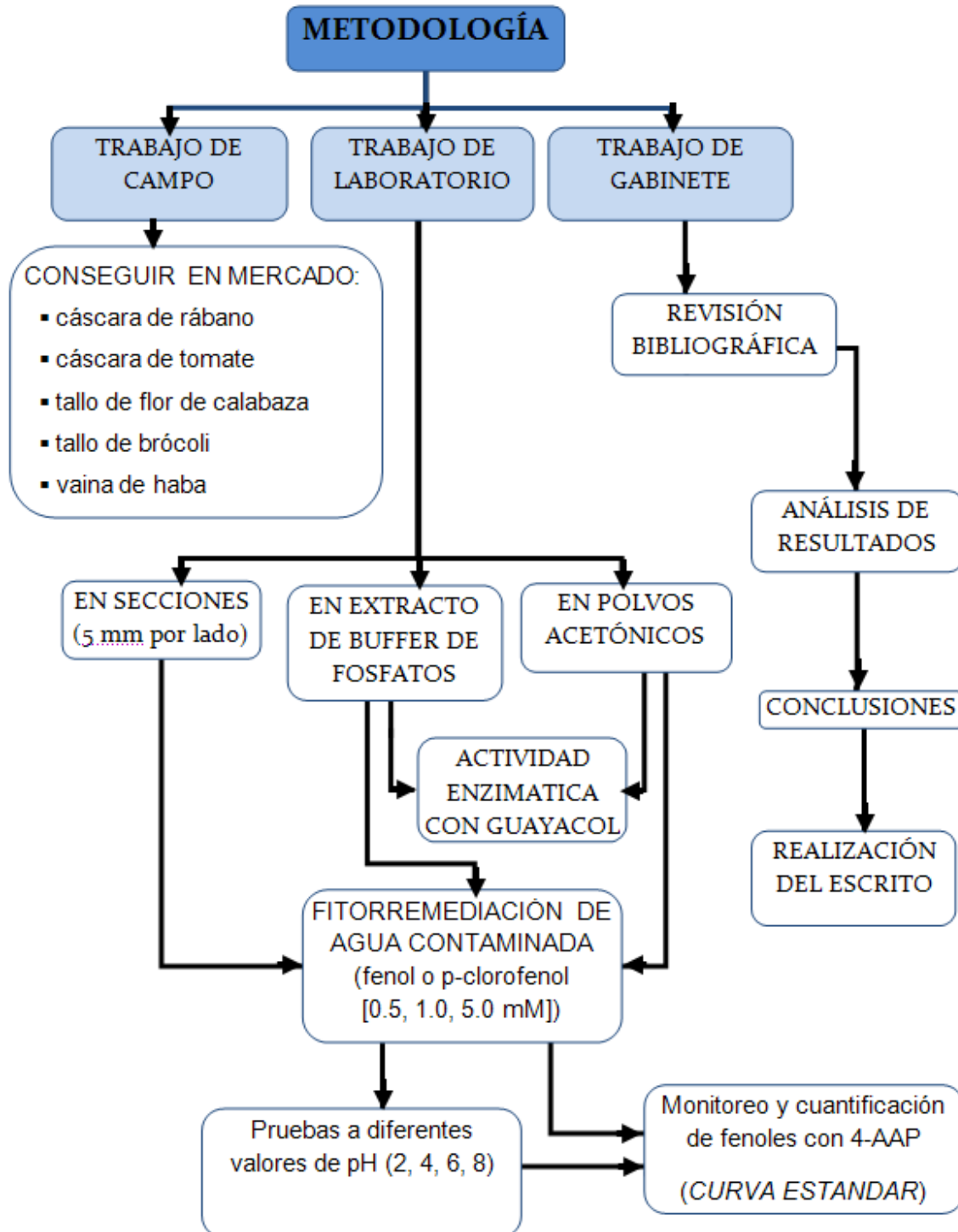


Figura 9 Ejemplo de curva estándar realizada en el programa Excel.

3. TRABAJO DE GABINETE

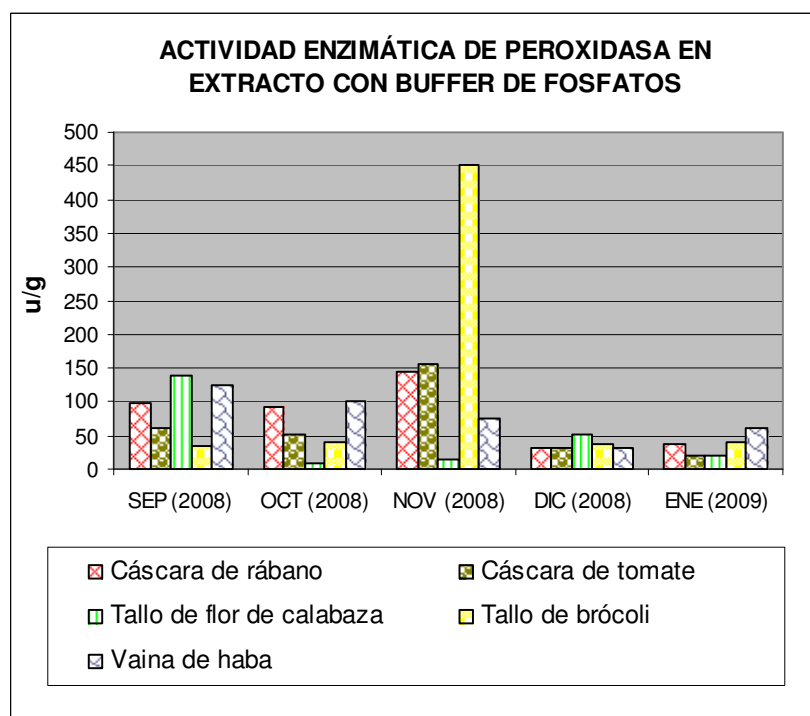
Todos los experimentos se realizaron por duplicado cuando el comportamiento en ambos no fue similar se repitió el tratamiento. Se realizó un promedio con los datos obtenidos tanto para la actividad enzimática como para la fitorremediación. Finalmente con ayuda del programa Excel de Office se realizaron las gráficas de cinética de remoción (en % de contaminante removido) con los datos que se obtuvieron (Bayramoglu, 2008).

4. DIAGRAMA DE FLUJO GENERAL



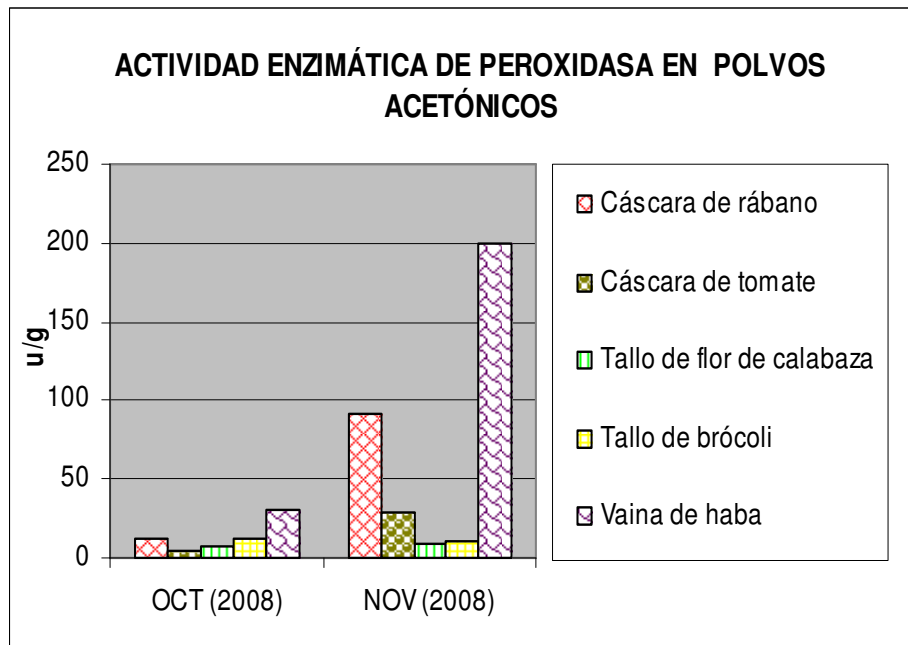
RESULTADOS

1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA



Gráfica 1 Actividad enzimática de la peroxidasa (de extracto en buffer de fosfatos pH 6) en los meses de sep-dic 2008 y enero 2009. La actividad de la enzima se presenta en u/g.

En la gráfica 1 se presenta la actividad enzimática de la peróxidasa extraída con buffer de fosfatos, en el mes de septiembre (la mayor actividad enzimática la presentó el tallo de la flor de calabaza con 148 u/g. En el mes de octubre la actividad más alta la tuvieron la vaina de haba y la cáscara de rábano 100 u/g, en el mes de noviembre la actividad mas alta fue de 449 u/g (tallo de brócoli) le sigue la cáscara de rábano y a cáscara de tomate con 148 u/g. Finalmente para el mes de diciembre la actividad enzimática de todos los vegetales varió entre las 25-50 u/g (todas bajas).

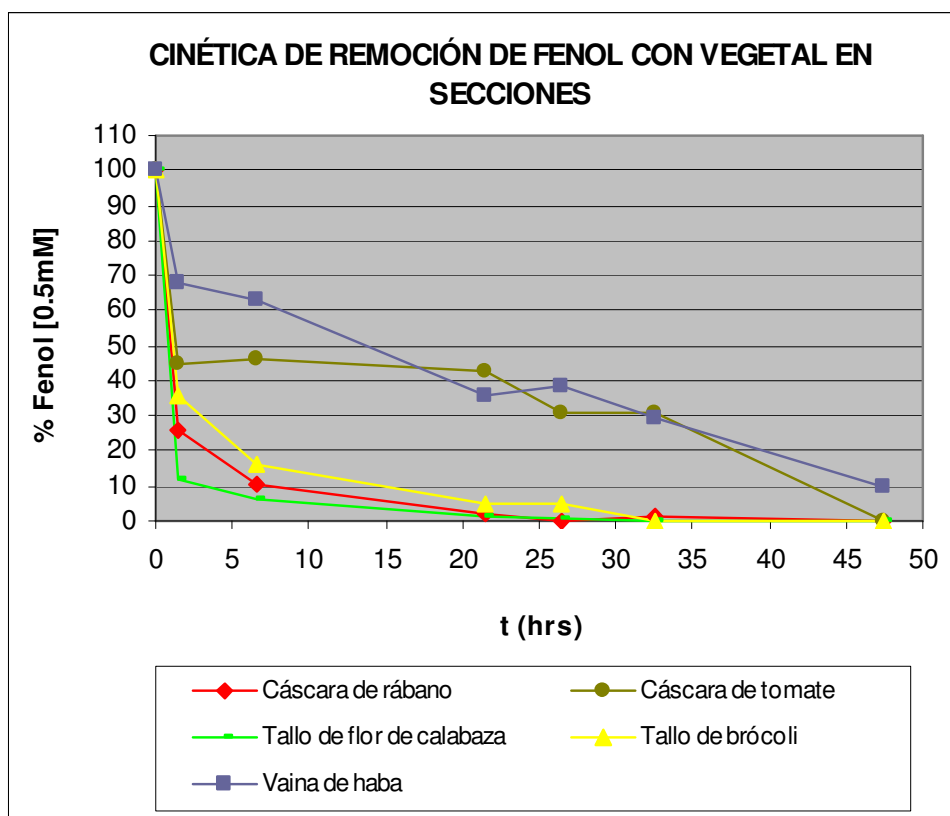


Gráfica 2 Actividad enzimática de la peroxidasa (de polvos acetónicos) en los meses de oct-nov 2008. La actividad de la enzima se presenta en u/g.

En la gráfica 2 se presenta la actividad enzimática de la peroxidasa en los polvos enzimáticos, en el mes de octubre el valor más alto corresponde a la vaina de haba es de 30 u/g, en el mes de noviembre la mayor actividad enzimática la presentó la vaina de haba con 40 u/g.

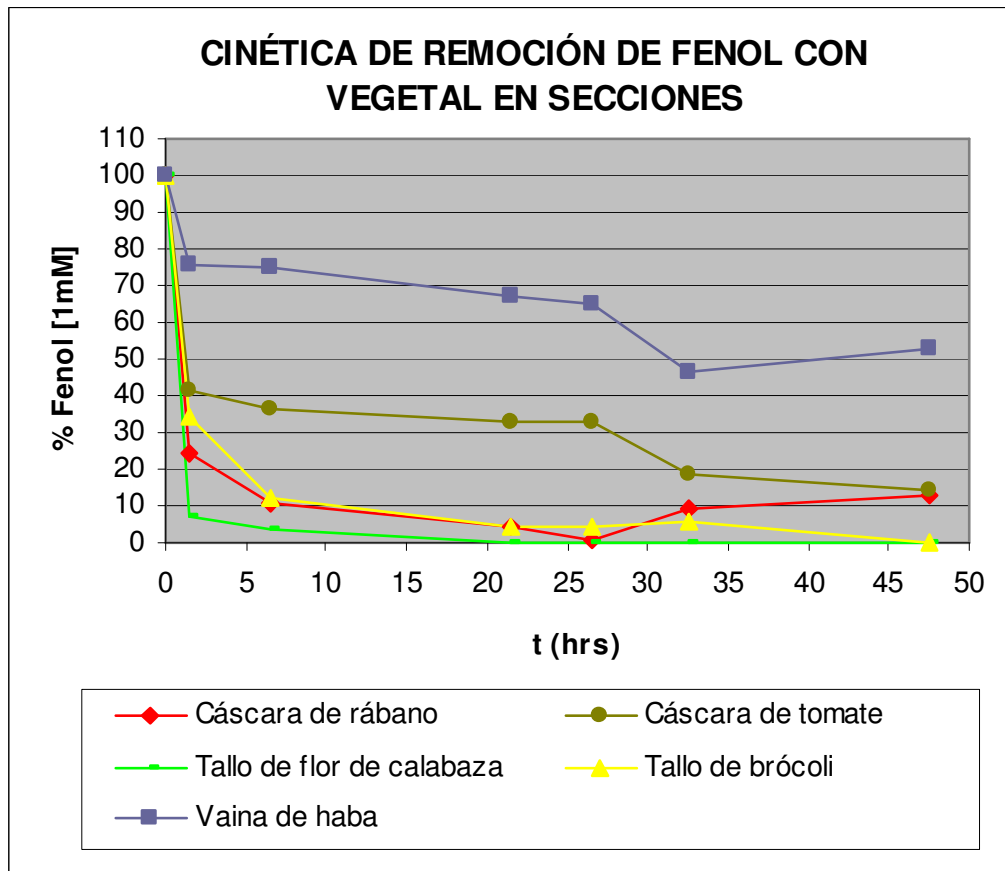
2. FITORREMEDIACIÓN DE AGUA CONTAMINADA CON FENOL

2.1 CINÉTICA DE REMOCIÓN DE FENOL CON VEGETAL EN SECCIONES



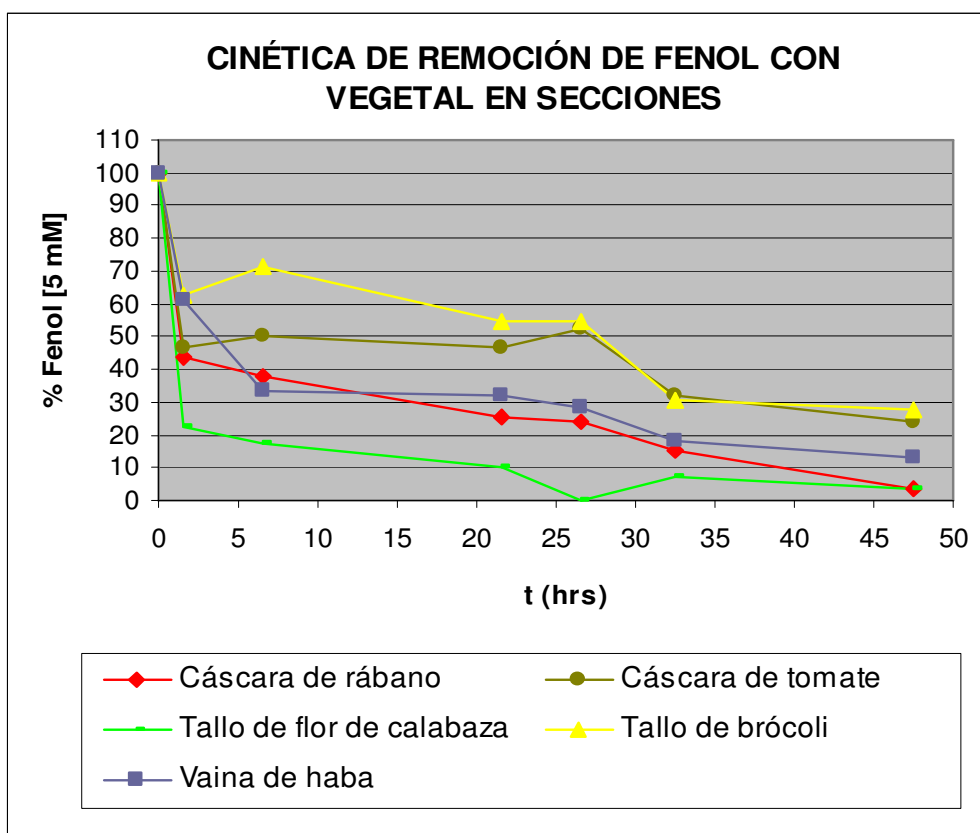
Gráfica 3 Porcentaje de remoción de fenol [0.5 mM] con vegetales en secciones (6g de 5 mm por lado) en 100 mL de agua contaminada adicionada con H_2O_2 (100 μ L [0.5 %]) realizado en diciembre del 2008.

En la gráfica 3 se puede observar que a partir de las 24 horas tanto la cáscara del rábano como el tallo de la flor de calabaza tuvieron un 0% de fenol por lo que se logró un 100% de remoción del contaminante, el tallo de brócoli a las 32 horas alcanza el mismo porcentaje, mientras que para la cáscara de tomate el 100% de remoción lo logra hasta las 48 horas. La vaina de haba con 10% de fenol sólo alcanza un 90% de remoción hasta las 48 horas de reacción.



Gráfica 4 Porcentaje de remoción de fenol [1 mM] por medio de vegetales en secciones (6g de 5 mm por lado) en 100 mL de agua contaminada adicionada con H_2O_2 (100 μ L [0.5 %]) realizado en diciembre del 2008.

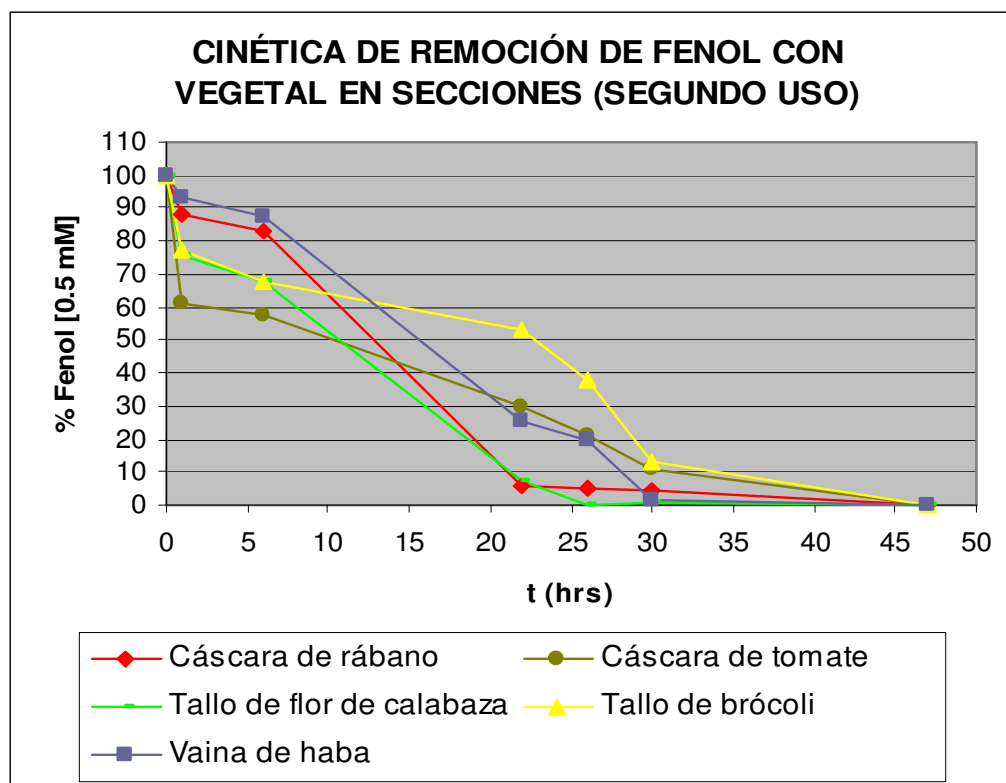
En la gráfica 4 se observa que a las 24 horas de reacción, el tallo de la flor de calabaza con 0% de contaminante obtiene 100% de remoción de fenol [1 mM], el tallo de brócoli alcanza el mismo porcentaje hasta las 48 horas. Finalmente a las 48 horas la vaina de haba tiene 50% de remoción, la cáscara de tomate y la cáscara de rábano con 15% del contaminante, remueven al fenol [1 mM] hasta un 85%.



Gráfica 5 Porcentaje de remoción de fenol [5 mM] por medio de vegetales en secciones (6g de 5 mm por lado) en 100 mL de agua contaminada adicionada con H_2O_2 (100 μ L [0.5 %]) realizado en diciembre del 2008.

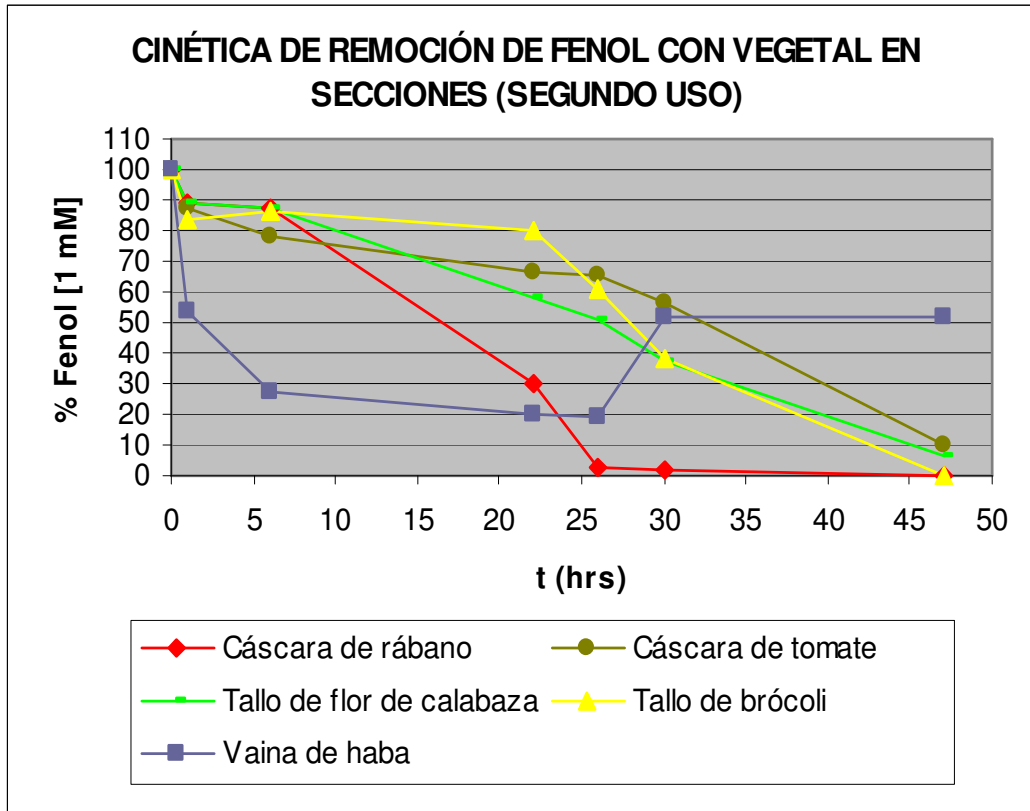
En la gráfica 5 se observa que a las 48 horas de reacción tanto el tallo de brócoli, como la cáscara de tomate tienen un 25% de contaminante, es decir, un porcentaje de remoción de 75, la vaina de haba con 15% de fenol logra un 90% de remoción; la cáscara de rábano y el tallo de flor de calabaza con 12% de contaminante son los que más logran remover al fenol [5 mM] con 98%.

2.2 CINÉTICA DE REMOCIÓN DE FENOL CON VEGETAL EN SECCIONES, SEGUNDO USO



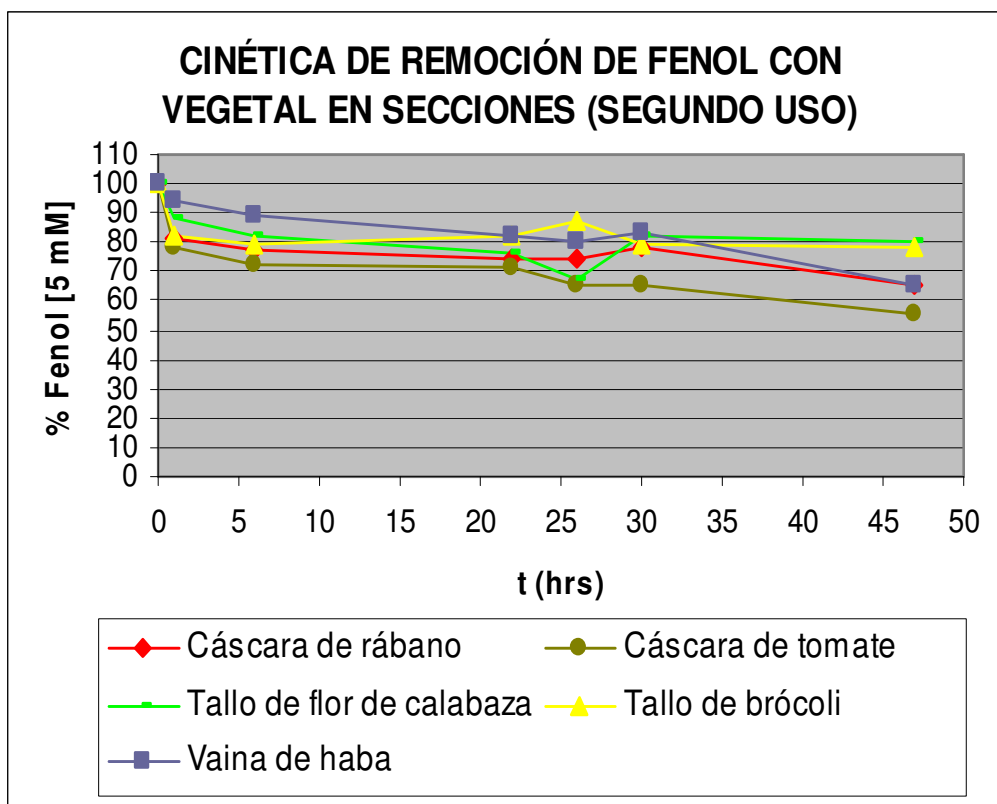
Gráfica 6 Porcentaje de remoción de fenol [0.5 mM] por medio de vegetales en secciones de segundo uso (conservados en ultra congelador a -72°C) en 100 mL de agua contaminada adicionada con H_2O_2 (100 μL [0.5 %]) realizado en diciembre del 2008.

En la gráfica 6 se puede observar que a las 26 horas de reacción el tallo de la flor de calabaza con 0% alcanza un 100% de remoción, la vaina de haba logra el mismo porcentaje hasta las 30 horas, tanto la cáscara de tomate como el tallo de brócoli y la cáscara de rábano a las 48 horas obtuvieron el 100% de remoción de fenol [0.5 mM], por lo que a las 48 horas todos los vegetales removieron al contaminante por completo.



Gráfica 7 Porcentaje de remoción de fenol [1 mM] por medio de vegetales en secciones de segundo uso (conservados en ultra congelador a -72°C) en 100 mL de agua contaminada adicionada con H_2O_2 (100 μL [0.5 %]) realizado en diciembre del 2008.

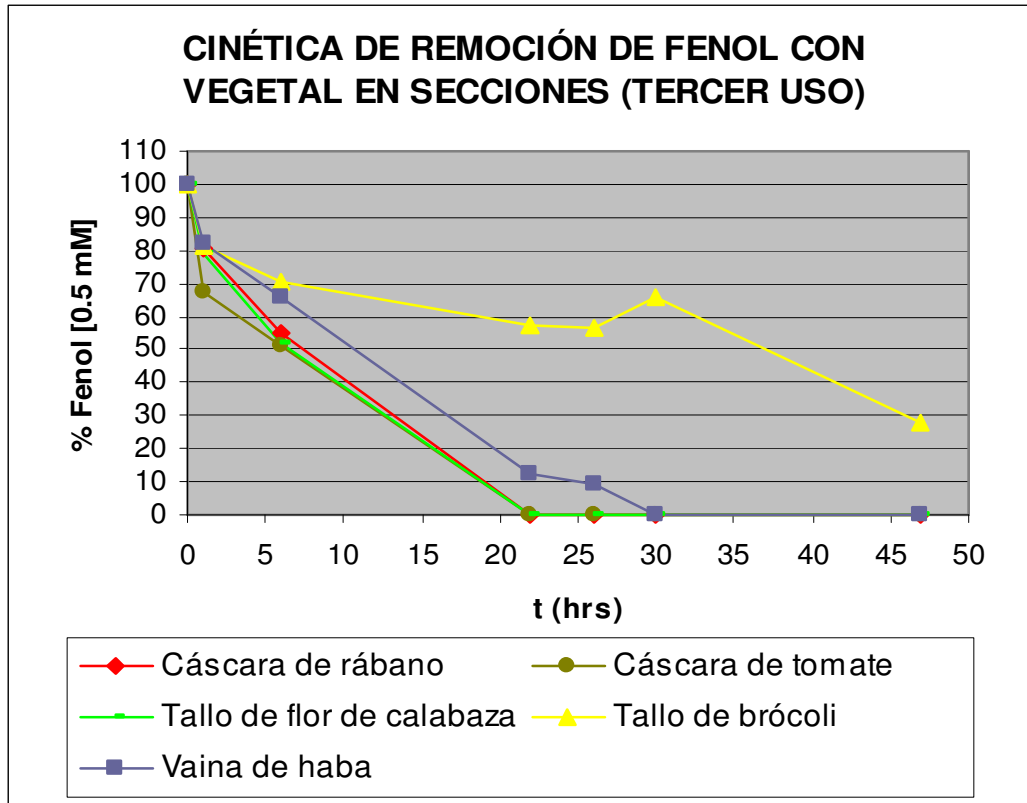
En la gráfica 7 se observa que a las 26 horas de reacción la cáscara de rábano con 0% del contaminante alcanza un 100% de remoción, el tallo de brócoli logra el mismo porcentaje hasta las 48 horas, tanto la cáscara de tomate como el tallo flor de calabaza con 10% a las 48 horas obtuvieron el 90% de remoción de fenol [1 mM]; la vaina de haba sólo logra el 50%.



Grafica 8 Porcentaje de remoción de fenol [5 mM] por medio de vegetales en secciones de segundo uso (conservados en ultracongelador a -72°C) en 100 mL de agua contaminada adicionada con H_2O_2 (100 μL [0.5 %]) realizado en diciembre del 2008.

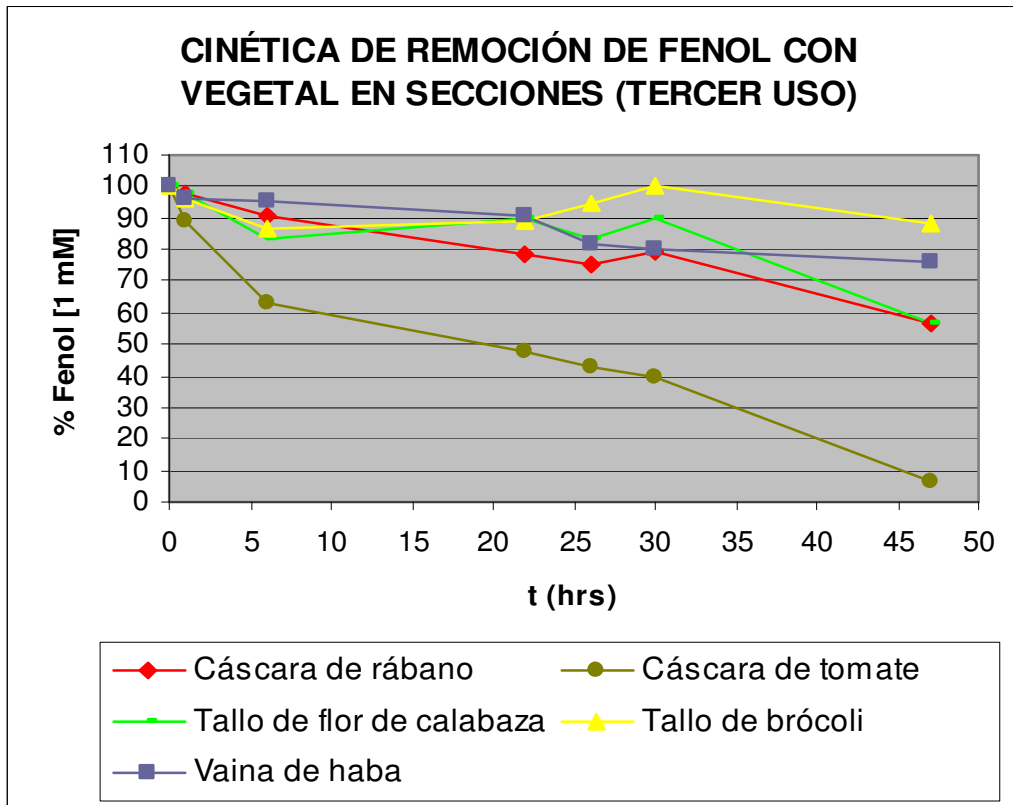
En la gráfica 8 se puede observar que a las 48 horas de reacción (fig. 11) la cáscara de tomate 55% del contaminante alcanza un 45% de remoción, la vaina de haba y la cáscara de rábano con el 65% sólo logran remover hasta un 35% de fenol [5 mM], tanto el tallo de brócoli como el tallo flor de calabaza a las 48 horas con 80% obtuvieron sólo el 20% de remoción de fenol [5 mM].

2.3 CINÉTICA DE REMOCIÓN DE FENOL CON VEGETAL EN SECCIONES, TERCER USO.



Gráfica 9 Porcentaje de remoción de fenol [0.5 mM] por medio de vegetales en secciones de tercer uso, sin llevar a ultra congelador se agregó una muestra nueva de agua contaminada (100 mL) a las cuales se le adiciono H_2O_2 (100 μ L [0.5 %]) realizado en diciembre del 2008.

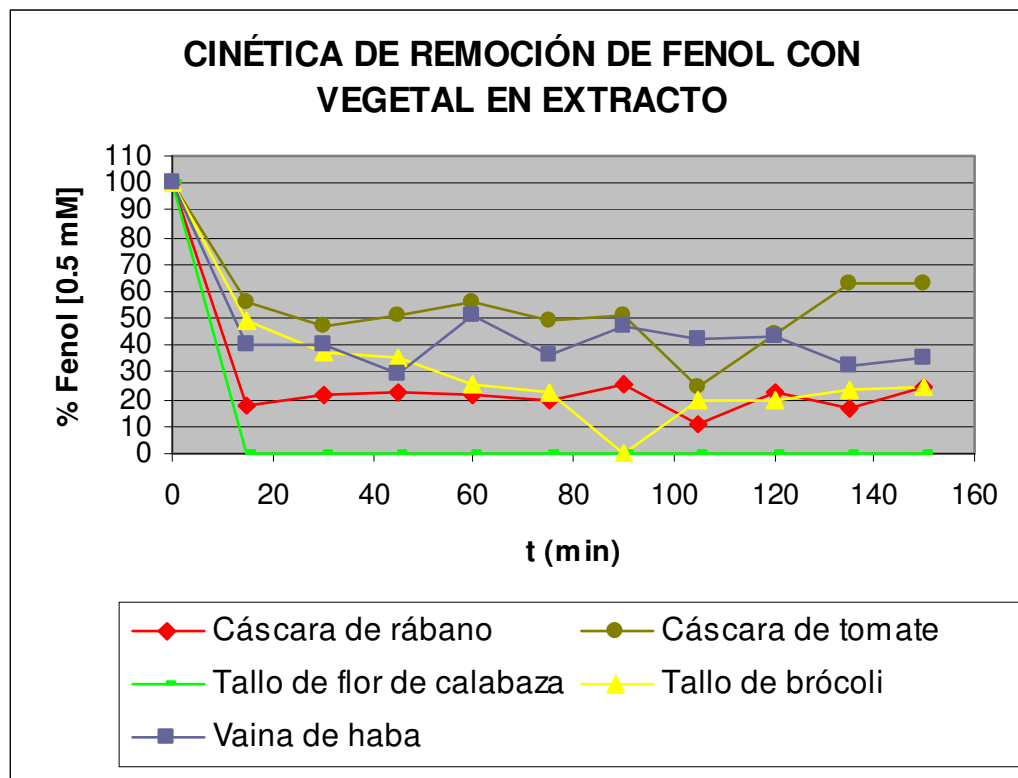
En la gráfica 9 se observa que a las 22 horas de reacción la cáscara de tomate, cáscara de rábano y tallo de flor de calabaza con 0% de fenol alcanza el 100% de remoción, la vaina de haba a las 30 horas alcanzó el mismo porcentaje; el tallo de brócoli con 25% del contaminante a las 48 horas sólo logró el 75% de remoción de fenol [0.5 mM].



Gráfica 10 Porcentaje de remoción de fenol [1 mM] por medio de vegetales en secciones de tercer uso, sin llevar a ultracongelador se agregó una muestra nueva de agua contaminada (100 mL) a las cuales se le adicionó H_2O_2 (100 μ L [0.5 %]) realizado en diciembre del 2008.

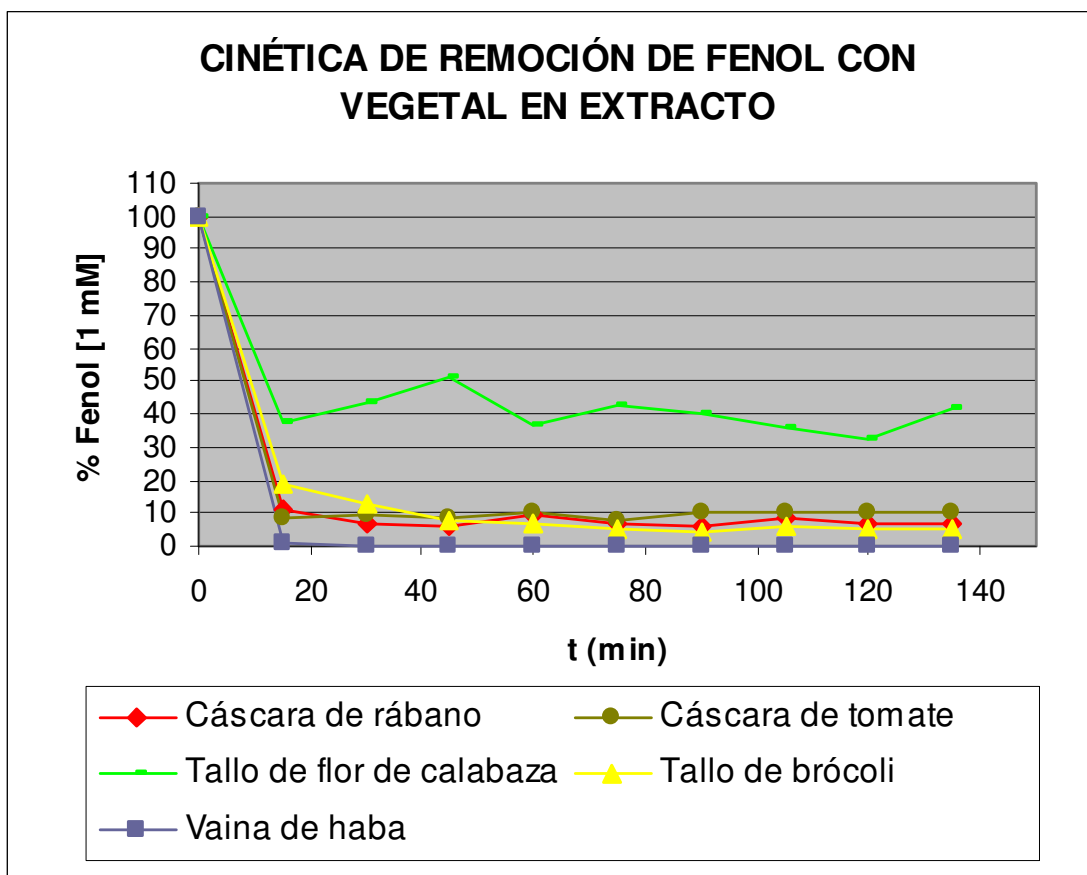
En la grafica 10 se puede observar que a las 48 horas de reacción, la cáscara de tomate con 10% de fenol [1 mM] logró remover al contaminante hasta un 90%, la cáscara de rábano y tallo de flor de calabaza 55% de contaminante alcanza el 45% de remoción, la vaina de haba 15% alcanzó el 85% de remoción; el tallo de brócoli a las 48 horas con 85% solo logró el 15% de remoción de fenol [1 mM]. El tejido vegetal que se usó para la remoción de fenol [5 mM] por medio de vegetales en secciones después del segundo uso, estaba completamente desintegrado y se disolvía en el liquido al filtrarse para adicionar la nueva muestra de agua contaminada por lo que no se pudo realizar un tercer uso por pérdida de la mayor parte del tejido.

2.4 CINÉTICA DE REMOCIÓN DE FENOL CON VEGETAL EN EXTRACTO



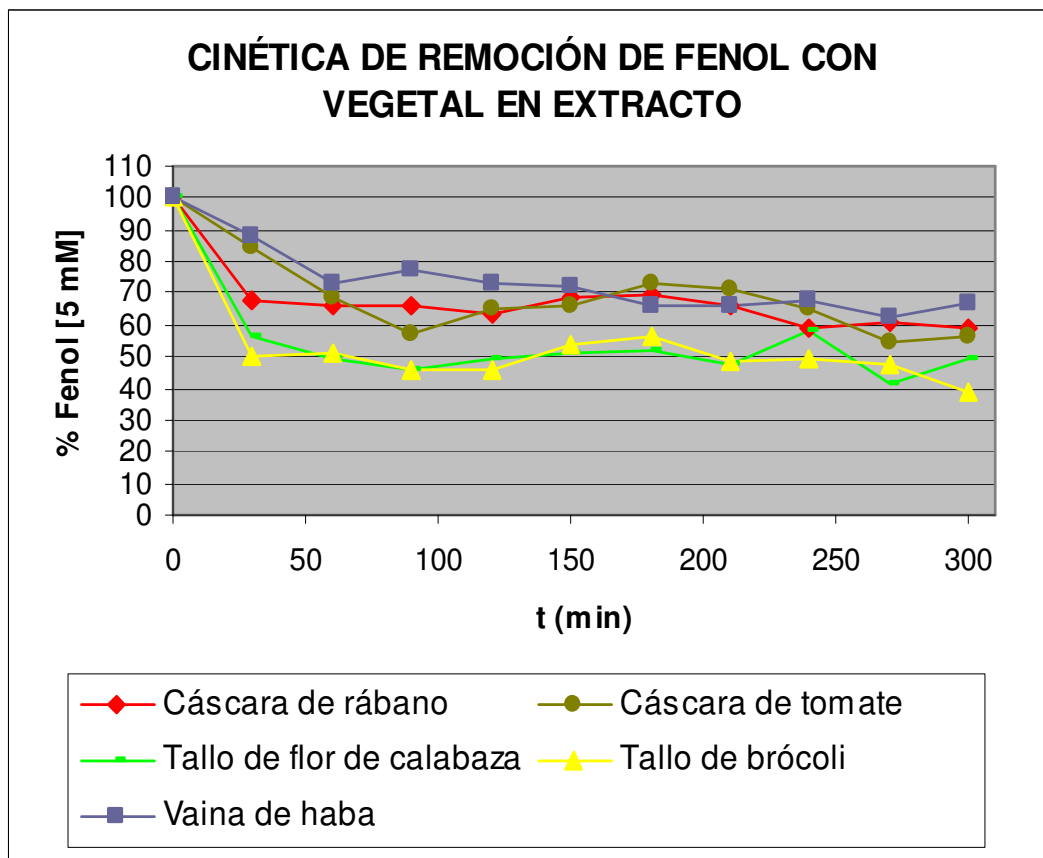
Gráfica 11 Porcentaje de remoción de fenol [0.5 mM] por medio de vegetales en extracto de buffer de fosfatos (18 mL), en una muestra de agua contaminada (50 mL) a las cuales se le adicionó H_2O_2 (7 μ L [30 %]) realizado en octubre del 2008.

En la gráfica 11 se observa que a los primeros 15 min de reacción el extracto de peroxidasa del tallo de la flor de calabaza con 0% de contaminante alcanza una remoción de fenol [0.5 mM] del 100%, a los 150 min (2.5 horas) el extracto de cáscara de rábano y el extracto del tallo de brócoli tienen un 22%, es decir, 78 % de remoción; la peroxidasa (en extracto) de la vaina de haba con 57% del contaminante y 43% de remoción, finalmente el extracto enzimático de la cáscara de tomate con 62% solo tiene un 38% de remoción de fenol.



Gráfica 12 Porcentaje de remoción de fenol [1 mM] por medio de vegetales en extracto de buffer de fosfatos (18 mL), en una muestra de agua contaminada (50 mL) a las cuales se le adicionó H_2O_2 (7 μ L [30 %]) realizado en noviembre del 2008.

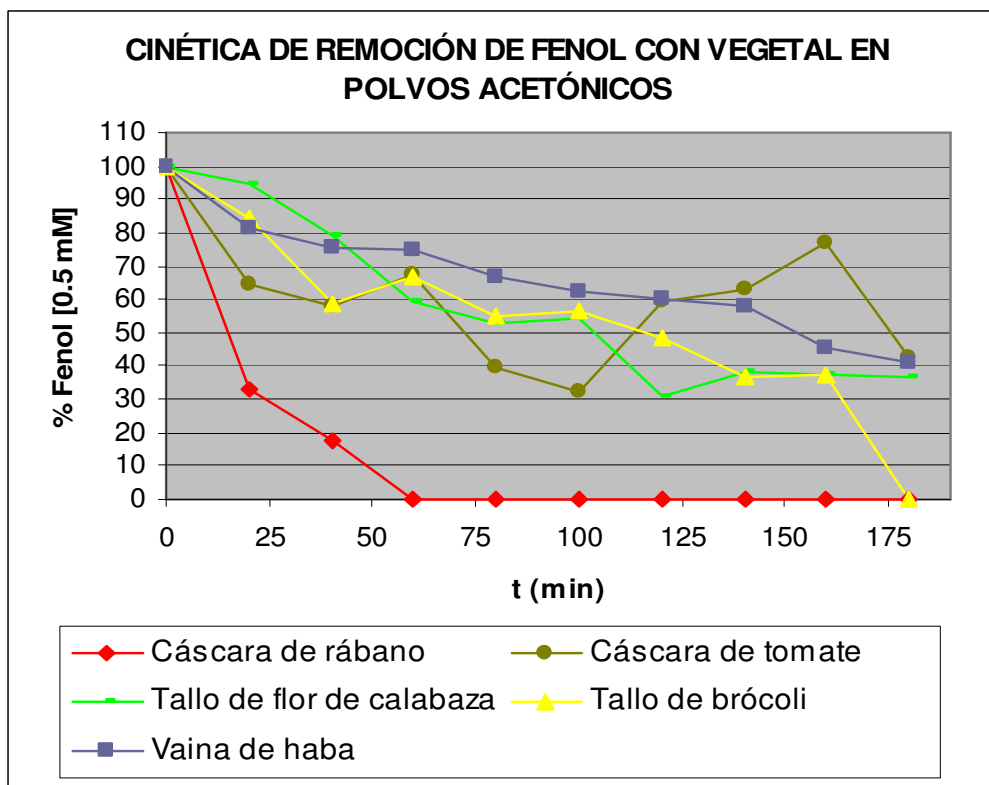
En la grafica 12 se puede observar que en los primeros 15 min de reacción, el extracto del tallo de flor de calabaza con 38% alcanza un 62% de remoción de fenol (1mM), el extracto del tallo de brócoli con 20% del contaminante, es decir, 80% de remoción, los extractos de la cáscara de rábano y de la cáscara de tomate con 10% logran un 90% de remoción, mientras que la vaina de haba con 0% del contaminante tuvo un 100% de remoción, siendo el más eficiente.



Grafica 13 Porcentaje de remoción de fenol [5 mM] por medio de vegetales en extracto de buffer de fosfatos (18 mL), en una muestra de agua contaminada (50 mL) a las cuales se le adicionó H_2O_2 (7 μ L [30 %]) realizado en noviembre del 2008.

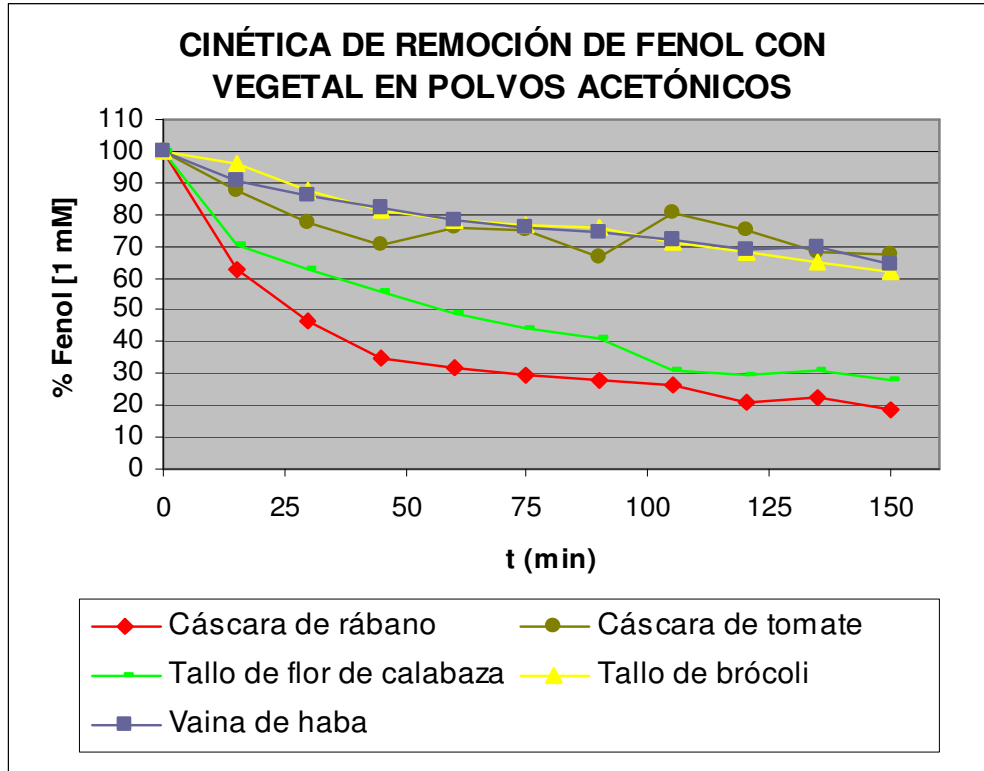
En la gráfica 13 se observa que a los 300 min (5 horas) de reacción el extracto de la vaina de haba con 70% de contaminante logra un 30% de remoción de fenol [5 mM], los dos extractos de las cáscaras de rábano y de tomate con 60% tienen un 40% de remoción, el extracto del tallo de la flor de calabaza 50%, finalmente el extracto del tallo de brócoli con 40% del contaminante y 60% de remoción de fenol [5 mM].

2.5 CINÉTICA DE REMOCIÓN DE FENOL CON VEGETAL EN POLVOS ACETÓNICOS



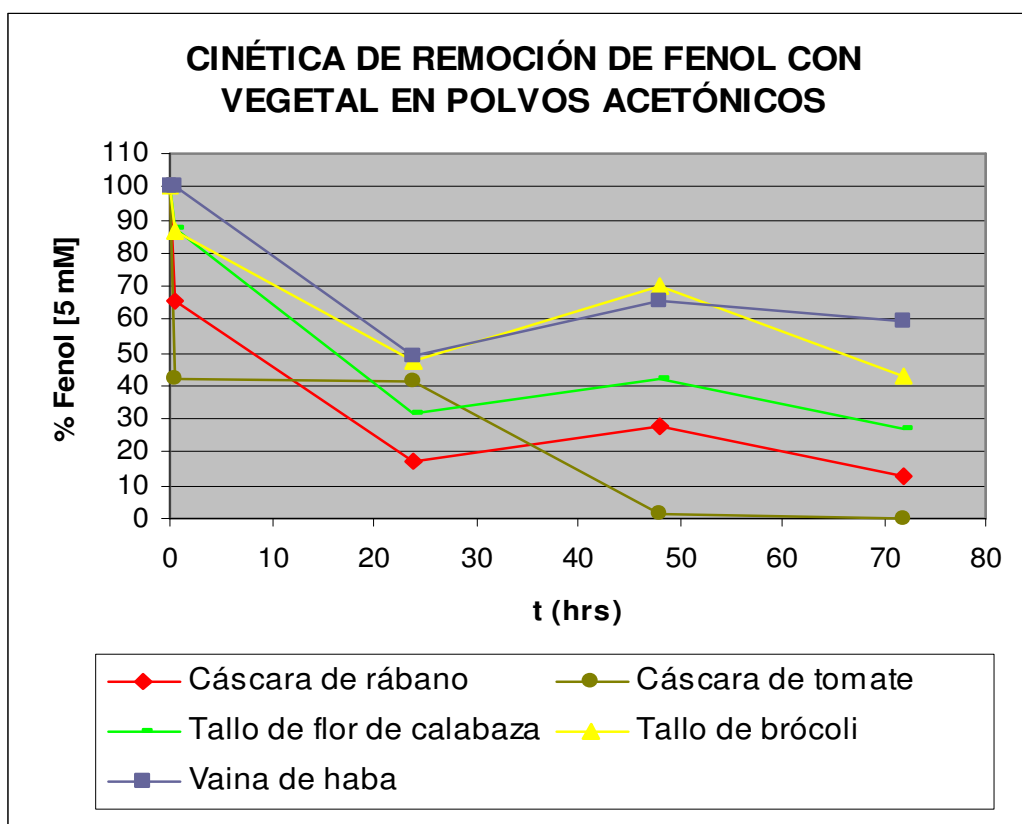
Gráfica 14 Porcentaje de remoción de fenol [0.5 mM] por medio de vegetales en polvos acetónicos (0.1 g), en una muestra de agua contaminada (25 mL) a las cuales se le adiciono H_2O_2 (7 μ L [30 %]) realizado en noviembre del 2008.

En la grafica 14 se puede observar que a los 180 min de reacción (6 horas) los polvos acetónicos de la cáscara de tomate, la vaina de haba y del tallo de la flor de calabaza con 40% del contaminante alcanzan un 60% de remoción de fenol (0.5mM), los polvos acetónicos del tallo de brócoli con 0% logran remover hasta un 100%, finalmente los polvos acetónicos de la cáscara de rábano tienen el mismo porcentaje desde los primeros 60 min (primera hora de reacción); es importante mencionar que se utilizó una medida estándar para la fitorremediación (0.1 g de polvos acetónicos), sin embargo la cantidad equivalente de vegetal es variable (ver anexo).



Gráfica 15 Porcentaje de remoción de fenol [1 mM] por medio de vegetales en polvos acetónicos (0.1 g), en una muestra de agua contaminada (25 mL) a las cuales se le adiciono H_2O_2 (7 μ L [30 %]) realizado en noviembre del 2008.

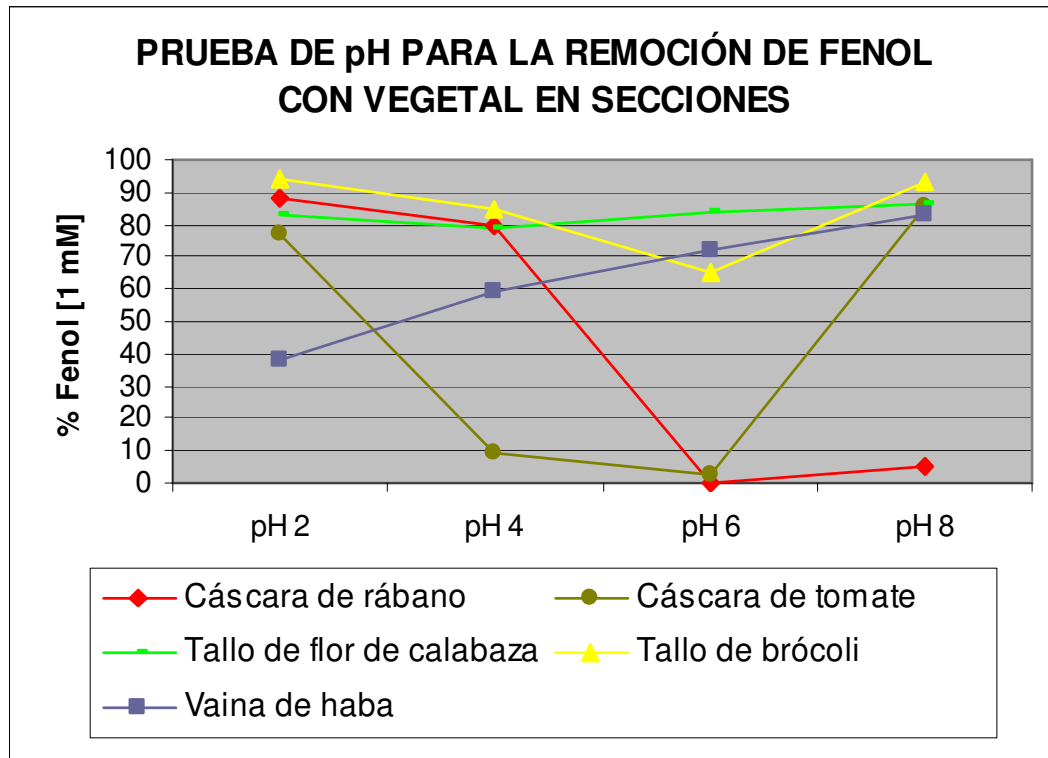
En la gráfica 15 se observa que a los 150 min de reacción (2.5 horas) los polvos acetónicos de la cáscara de tomate con 70% del contaminante lograron remover un 30% de fenol [1mM], los polvos acetónicos de la vaina de haba con 65% alcanza el 35% de remoción, los polvos acetónicos del tallo de brócoli con 60% logran el 40% de remoción, los polvos acetónicos del tallo de la flor de calabaza tienen 30% de contaminante con 70% de remoción y los polvos acetónicos de la cáscara de rábano 20% y 80% de remoción de fenol [1 mM].



Gráfica 16 Porcentaje de remoción de fenol [5 mM] por medio de vegetales en polvos acetónicos (0.1 g), en una muestra de agua contaminada (25 mL) a las cuales se le adiciono H_2O_2 (7 μ L [30 %]) realizado en noviembre del 2008.

En la gráfica 16 se observa que a las 72 horas, los polvos acetónicos de la vaina de haba con 60% del contaminante alcanzaron un 40% de remoción de fenol [5 mM], los del tallo de brócoli con 42% y 58% de remoción, los del tallo de la flor de calabaza con 30% del contaminante y 70% de remoción, los de la cáscara de rábano tienen 10% con una remoción del 90%, finalmente los polvos acetónicos de la cáscara de tomate con 0% del contaminante, es decir, 100% de remoción desde las primeras 48 horas de incubación.

2.6 PRUEBA DE pH PARA REMOCIÓN DE FENOL



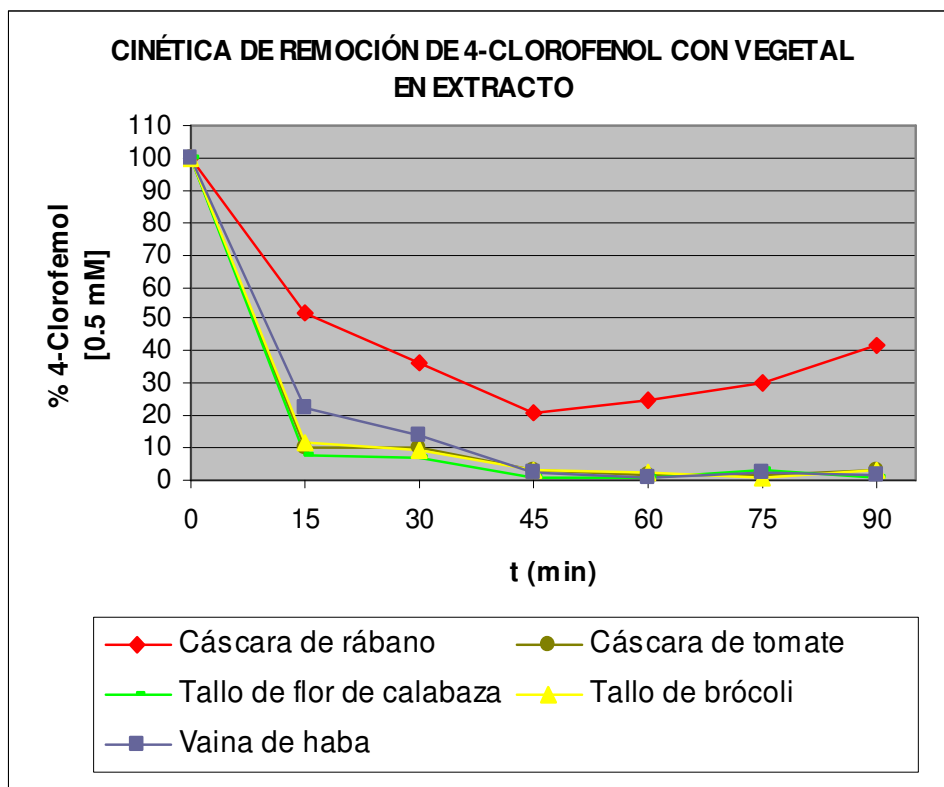
Gráfica 17 Efecto de pH en la transformación de fenol [1 mM] por medio de vegetales en secciones (5 mm por lado) después de 19 horas de incubación a temperatura ambiente (23°C) realizado en enero del 2009.

En la gráfica 17 se puede observar que en la prueba de pH se para la cáscara de rábano y la cáscara de tomate a un pH de 6 se logra un 98% de remoción de fenol [1 mM], a diferencia de los pH 2, 4, 8 que no resultan igual de eficientes; igualmente para el tallo de brócoli el pH 6 a las 19 horas de reacción sólo logra remover el 35% del contaminante, mientras que a pH 2, 4, 8 el porcentaje de remoción es menor a 20%. Para el tallo de flor de calabaza los diferentes pH no parecen tener un efecto significativo, se observó que el pH 4 era el indicado en esta prueba con un 20% de remoción de fenol [1 mM]. Finalmente el haba obtuvo un 60% de remoción a un pH de 2.

3. FITORREMEDIACIÓN DE AGUA CONTAMINADA CON p-CLOROFENOL

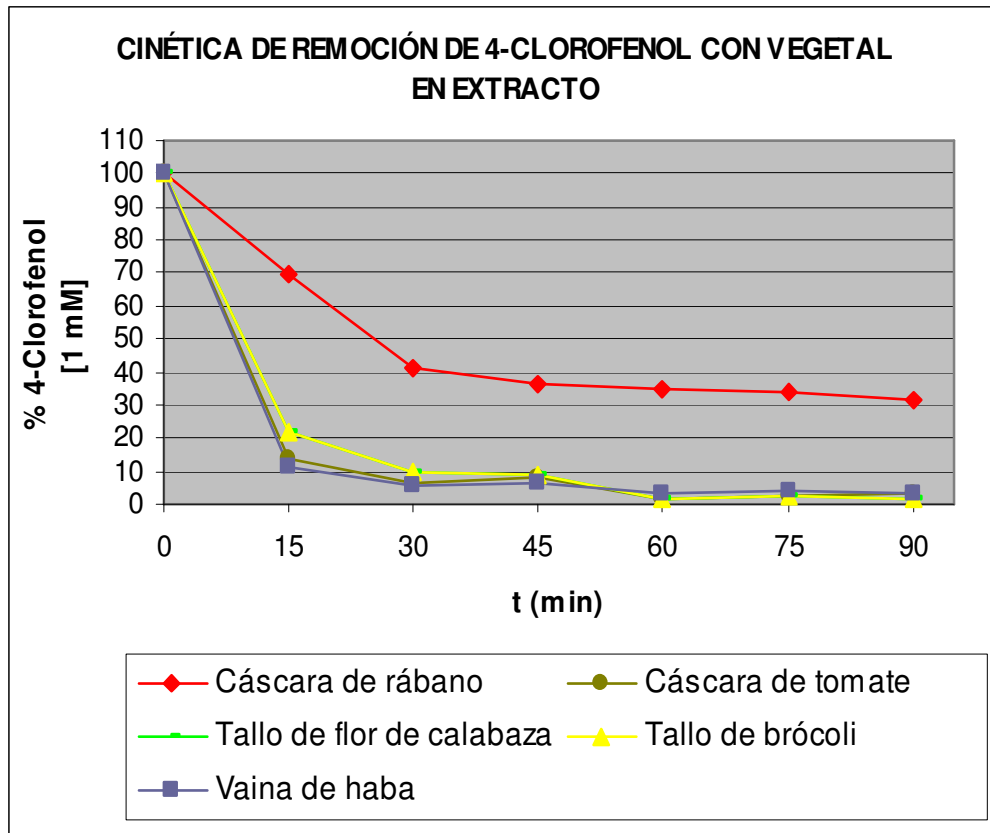
3.1 CINÉTICA DE REMOCIÓN DE 4-CLOROFENOL CON VEGETAL EN EXTRACTO

Se encontró que el vegetal en extracto remueve más fenol en menor tiempo, así que las pruebas del 4-clorofenol se realizaron sólo con extracto en buffer de fosfatos.



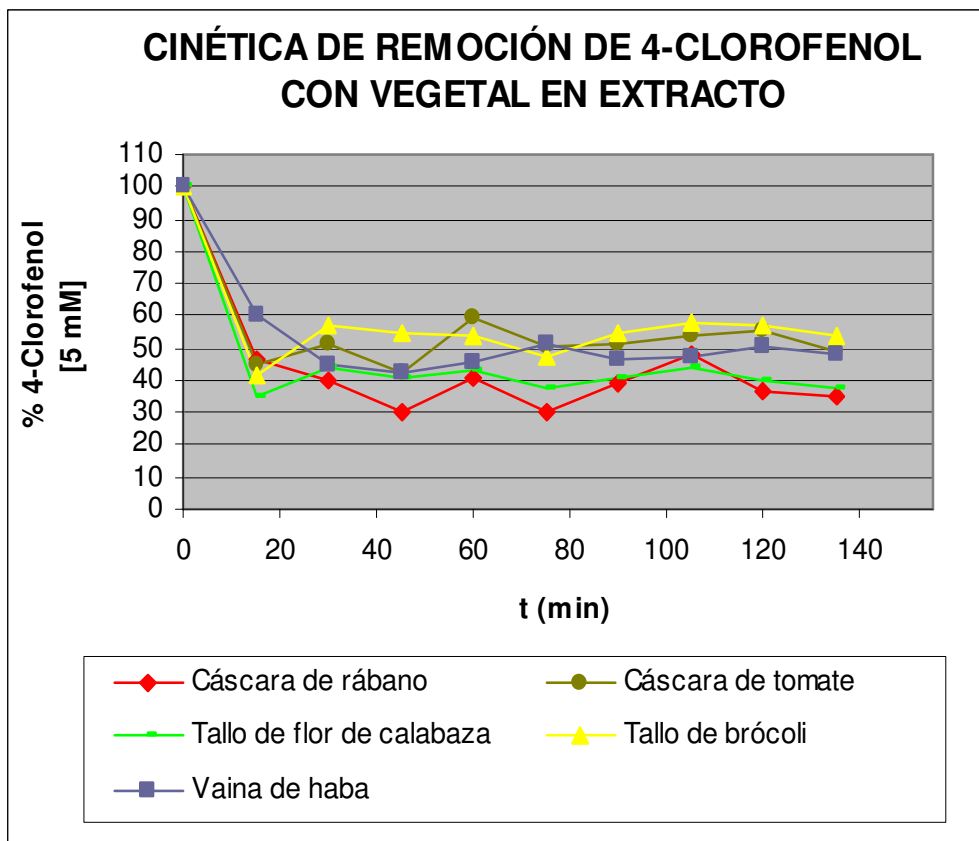
Gráfica 18 Porcentaje de remoción de p-clorofenol [0.5 mM] por medio de vegetales en extracto de buffer de fosfatos (18 mL), en una muestra de agua contaminada (50 mL) a las cuales se le adicionó H_2O_2 (7 μ L [30 %]) realizado e enero del 2009.

En la gráfica 18 e observa que a los primeros 45 min de reacción el extracto de peroxidasa del tallo de la flor de calabaza, el tallo de brócoli, la vaina de haba y la cáscara de tomate con 0% del contaminante alcanzan una remoción de 4-clorofenol [0.5 mM] del 100%, a los 90 min (1.5 horas) el extracto de cáscara de rábano con 42% tiene un 58 % de remoción de fenol.



Gráfica 19 Porcentaje de remoción de p-clorofenol [1 mM] por medio de vegetales en extracto de buffer de fosfatos (18 mL), en una muestra de agua contaminada (50 mL) a la cual se le adicionó H_2O_2 (7 μ L [30 %]) realizado en enero del 2009.

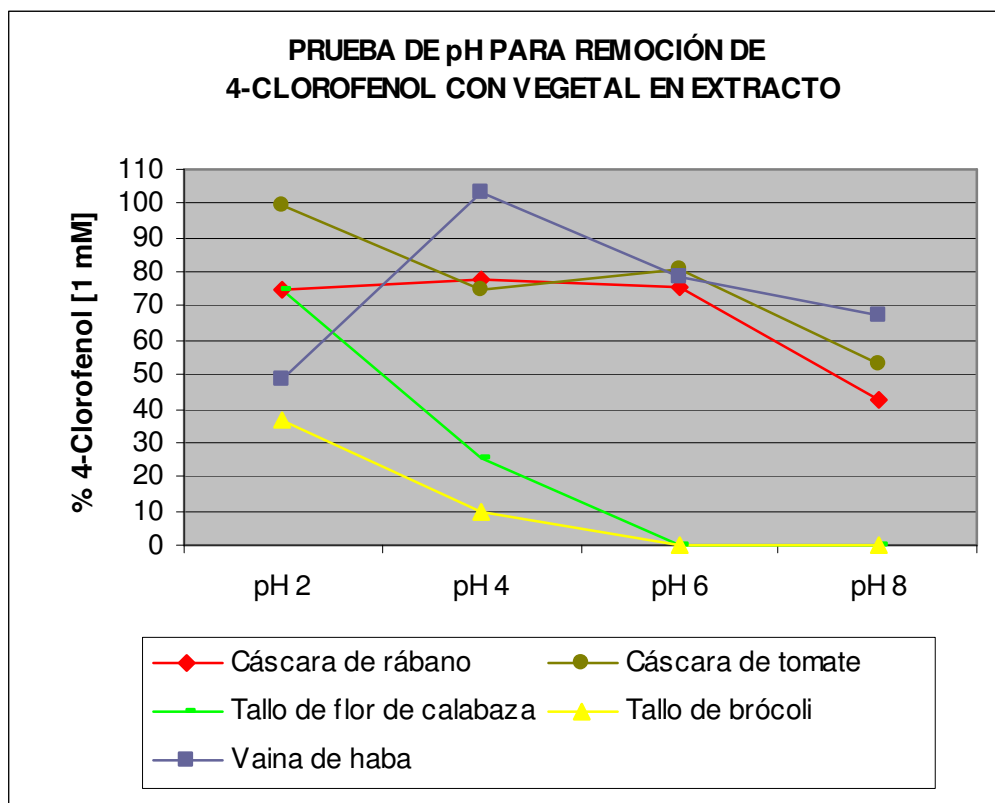
En la gráfica 19 se puede observar que en los primeros 60 minutos de reacción el extracto de peroxidasa del tallo de la flor de calabaza, el tallo de brócoli, la vaina de haba y la cáscara de tomate con 5% del contaminante alcanzaron una remoción de 4-clorofenol [0.5 mM] del 95%, a los 90 min (1.5 horas) el extracto de cáscara de rábano con 30% de contaminante tiene un 70 % de remoción de fenol.



Gráfica 20 Porcentaje de remoción de p-clorofenol [5 mM] por medio de vegetales en extracto de buffer de fosfatos (18 mL), en una muestra de agua contaminada (50 mL) a la cual se le adicionó H_2O_2 (7 μ L [30 %]) realizado en enero del 2009.

En la gráfica 20 se puede observar que a los 135 minutos de reacción (2.25 horas) el extracto de peroxidasa de la cáscara de rábano tiene un 35% y 65% de remoción de 4- clorofenol [5 mM], el tallo de la flor de calabaza con 38% y 62% de remoción, la vaina de haba y la cáscara de tomate 50%, finalmente el tallo de brócoli con 52% del contaminante alcanza una remoción de 4- clorofenol [0.5 mM] del 48%.

3.2 PRUEBA DE pH PARA REMOCIÓN DE 4-CLOROFENOL



Gráfica 21 Efecto de pH en la transformación de 4-clorofenol [1 mM] por medio de vegetales en extracto después de 2 horas de incubación a temperatura ambiente (23°C) realizado en enero del 2009.

En la grafica 21 se observa la prueba de pH en la que tanto para el tallo de brócoli y el tallo de la flor de calabaza en un pH de 6 y el pH 8 logran un 100% de remoción de 4-clorofenol [1 mM] a diferencia de los pH 2 y 4 que no resultan igual de eficientes; para la cáscara de rábano y la cáscara de tomate el pH 8 resulta ideal aunque en las 2 horas de incubación sólo logra remover el 58% y 65% respectivamente. Para la vaina de haba el pH 2 es el indicado en esta prueba con un 50% de remoción de 4-clorofenol [1 mM].

ANÁLISIS DE RESULTADOS

En el cuadro 2 se indican las concentraciones equivalentes de fenol utilizadas para la fitorremediación; es importante recordar que las concentraciones típicas de fenoles expuestas en aguas residuales varían entre 35 y 400 mg/L (Chen y col., 1997), mientras que en el presente estudio el rango de contaminante que se manejó fue mayor, de 47-470 mg/L.

Cuadro 2 Concentraciones utilizadas para la fitorremediación en milimolar y en mg/L.

mM	mg/L
0.5	47.05
1.0	94.11
5.0	470.55
Típica de fenol en aguas residuales: 35-400 mg/L	

Los vegetales en secciones en agua contaminada con fenol [47 mg/L] logró la remoción completa en 48 horas de reacción (cuadro 3). Con agua contaminada a [94 mg/L] pocos vegetales pudieron removerlo por completo (cáscara de rábano, tallo de flor de calabaza y tallo de brócoli), cuando el fenol se encuentra a [470 mg/L] solo el tallo de la flor de calabaza logra su remoción.

El vegetal pudo usarse más de una vez sin embargo su eficiencia en biorremediación no fue la misma en las tres concentraciones; cuando el contaminante (fenol) se encontraba a la más baja concentración [47 mg/L] la cáscara de rábano, la cáscara de tomate y el tallo de la flor de calabaza pudieron remover los 47 mg/L en 48 h en las tres veces que se usó.

Cuadro 3. Miligramos de fenol [0.5, 1.0, 5.0 mM] removidos con vegetal en secciones (5mm por lado); primero, segundo y tercer uso a las 48 horas de reacción.

VEGETAL EN SECCIONES	Fenol [0.5mM]			Fenol [1.0mM]			Fenol [5.0 mM]		
	Uso 1°.	Uso 2°.	Uso 3°.	Uso 1°.	Uso 2°.	Uso 3°.	Uso 1°.	Uso 2°.	Uso 3°.
Cáscara de rábano	47	47	47	85	94	61	446	164	-
Cáscara de tomate	47	47	47	85	85	85	352	291	-
Tallo de flor de calabaza	47	47	47	94	86	21	470	94	-
Tallo de brócoli	47	47	34	94	94	9	423	103	-
Vaina de haba	42	47	47	47	45	89	329	164	-

- El tratamiento del tercer uso no fue posible, debido a que el tejido del material vegetal se disolvió en el líquido después del segundo uso.

Para Santos de Araujo y col. (2006) los cuales utilizaron 0.1 g de raíz peluda de camote (*Ipomoea batatas*) para fitorremediación con fenol [47 mg/L], encontraron que dicho vegetal remueve 0.027 mg/L en 72 h. El tallo de brócoli disminuyó su capacidad de biorremediación, la tercera vez bajó de 47 mg/L a 34 mg/L, al parecer la enzima ya no podía remover la misma cantidad de fenol; para la vaina de haba el resultado fue lo contrario después del segundo uso su remoción aumentó de 42 mg/L a 47 mg/L, es probable que a diferencia de los otros vegetales su descomposición en fracciones (del tejido) dejara a la enzima descubierta para remover mas fenol que en su primer uso en donde el tejido vegetal se hallaba más entero.

A una concentración de fenol [94 mg/L] el tallo de brócoli mantuvo su eficiencia en los dos primeros usos, para la tercera vez la enzima no logró remover la misma cantidad de fenoles disminuyendo su cantidad de remoción de los 94 mg/L a los 9 mg/L lo mismo le sucedió a el tallo de la flor de calabaza pero desde el segundo uso; aún así el resultado es satisfactoriamente alto en comparación con el realizado por Santos de Araujo y col. (2006) quienes utilizaron 0.1 g de raíz peluda de zanahoria (*Daucus carota*) para fitorremediación con fenol [94 mg/L] comprobaron que remueve 0.068 mg/L en un tiempo de reacción de 72 h.

La cáscara de rábano tuvo un mayor porcentaje de remoción la segunda vez (es probable que la enzima estuviera más libre durante esa aplicación), sin embargo en el tercer uso tuvieron un porcentaje de remoción más bajo, por lo que la enzima no es tan efectiva conforme se reutiliza el tejido vegetal. Otro estudio realizado por Santos de Araujo y col. (2006) utilizaron 0.1 g de raíz peluda de berenjena (*Solanum aviculare*) para fitorremediación con fenol [100 mg/L] la cual removió 0.046 mg/L en 72 h.

A la mayor concentración de contaminante, fenol [470 mg/L], se observó una alta cantidad de fenol removida por las enzimas, en el primer uso, la cáscara de rábano removi6 446 mg/L, el tallo de flor de calabaza removi6 el fenol por completo (470 mg/L) y el tallo de br6coli (423 mg/L) en el segundo uso disminuy6 la cantidad de fenol removido, desafortunadamente un tercer uso ya no fue posible.

Dec y Bollag (1994) realizaron la fitorremediaci6n de 2,4-diclorofenol [5.2 mM] con 1g de papa, r6bano picante y r6bano blanco el porcentaje de remoci6n que obtuvieron a las 2 h de reacci6n fue de entre 96 y 100%; aunque utiliza otro contaminante es importante mencionar que es de las pocas investigaciones que utiliz6 vegetal en secciones.

Se ha comprobado experimentalmente (Villegas y col., 2003) que 5 μ L de peroxidasa inmovilizada de chayote tienen la capacidad remover en 15 min de reacci6n hasta 1324.1 mg/L de fenol a una concentraci6n inicial de [1889 mg/L]; mientras que 0.4 g de ra6z peluda de tomate (*Lycopersicon esculentum*) remueve hasta 95 mg/L de fenol [100 mg/L] en 5 h de reacci6n (Gonz6lez y col., 2006). El extracto del tallo de la flor de calabaza remueve 235 mg/L de fenol a una concentraci6n de 470 mg/L en tan solo 3 h de reacci6n (cuadro 4).

Cuadro 4. Miligramos de fenol [0.5, 1.0, 5.0 mM] removidos con vegetal en extracto con buffer de fosfatos (pH 6) en tres horas de reacci6n.

VEGETAL EN EXTRACTO EN BUFFER DE FOSFATOS pH 6	CONCENTRACI6N DE FENOL		
	0.5 mM	1.0 mM	5.0 mM
	TIEMPO DE INCUBACI6N		
	3 horas	3 horas	3 horas
C6scara de r6bano	37 mg/L	89 mg/L	141 mg/L
C6scara de tomate	9 mg/L	85 mg/L	117 mg/L
Tallo de flor de calabaza	47mg/L	94 mg/L	235 mg/L
Tallo de br6coli	37 mg/L	75 mg/L	211 mg/L
Vaina de haba	28 mg/L	89 mg/L	164 mg/L

Tong y cols. (1998) usaron 5 u (unidades) de peroxidasa comercial de rábano para remover fenol a una concentración inicial de 100 mg/L, encontraron que a los 10 min de reacción la peroxidasa remueve 55.4 mg/L. Los polvos acetónicos de vegetal utilizados para la remoción de fenol se prepararon una sola vez y fue suficiente para las tres concentraciones, por lo tanto, en todas las pruebas se trabajó con el mismo polvo. A 47 mg/L el vegetal en polvos acetónicos remueven de 19-47 mg/L de fenol en un tiempo de dos horas de incubación (cuadro 5) pero a mayor concentración [470mg/L] la cáscara de tomate logra una remoción de 282 mg/L.

Cuadro 5. Miligramos de fenol [0.5, 1.0, 5.0 mM] removidos con vegetal en polvos acetónicos en dos horas de reacción.

VEGETAL EN POLVOS ACETÓNICOS	CONCENTRACIÓN DE FENOL		
	0.5 mM	1.0 mM	5.0 mM
	TIEMPO DE INCUBACIÓN		
	2 horas	2 horas	2 horas
Cáscara de rábano	47 mg/L	68 mg/L	164 mg/L
Cáscara de tomate	19 mg/L	30 mg/L	282 mg/L
Tallo de flor de calabaza	21 mg/L	56 mg/L	56 mg/L
Tallo de brócoli	21 mg/L	23 mg/L	56 mg/L
Vaina de haba	19 mg/L	23 mg/L	5 mg/L

En el cuadro 6 se observa la remoción de contaminante en diferentes tiempos de reacción obtenida con peroxidasa de diferentes vegetales aplicadas a fitorremediación de agua contaminada artificialmente con fenol estos datos se comparan con los datos obtenidos en laboratorio, se puede observar que 6 g de tallo de flor de calabaza eliminan una mayor cantidad de fenol (470 mg/L) en 48 horas que 0.1 mg de raíz peluda de zanahoria la cual remueve 0.068 mg/L de fenol en 72 horas (Santos y col., 2006) sin embargo 5 µL peroxidasa inmovilizada de chayote en 15 min logra una remoción de hasta 1324.1 mg/L de fenol (Villegas y col., 2003).

Cuadro 6. Comparación entre los resultados de la fitorremediación de fenol en otras investigaciones con los más altos obtenidos en los experimentos del presente trabajo (últimos datos sombreados).

CANTIDAD DE ENZIMA (PEROXIDASA) O VEGETAL	Cantidad de fenol (sustrato)	Tiempo de reacción	Remoción de contaminante (fenol)
5 u de peroxidasa comercial de rábano. Tong y cols, 1998.	50 mL [100 mg/L]	10 min	55.4 mg/L
1 mg peroxidasa inmovilizada de rábano. Bayramoglu y Arica, 2008.	120 mL [94 mg/l]	1 h	66 mg/L
5 µL peroxidasa inmovilizada de chayote. Villegas y col., 2003.	3 mL [1889 mg/L]	15 min	1324.1 mg/L
0.1 g raíz peluda de zanahoria (<i>Daucus carota</i>) Santos de Araujo y col., 2006	100 mL [94 mg/L]	72 h	0.068 mg/L
0.1 g raíz peluda de camote (<i>Ipomoea batatas</i>) Santos de Araujo y col., 2006	100 mL [47 mg/L]		0.027 mg/L
0.1 g raíz peluda de berenjena (<i>Solanum aviculare</i>) Santos de Araujo y col., 2006			0.046 mg/L
0.4 g de raíz peluda de tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>) González y col., 2006	10 mL [100 mg/L]	5 h	95mg/L
6 g de cáscara de rábano (<i>Raphanus sativus</i>)	100 mL [470 mg/L]	48 h	446mg/L
6 g cáscara de tomate (<i>Physalis ixocarpa</i>)			352 mg/L
6 g de tallo de flor de calabaza (<i>Curcubita pepo</i>)			470 mg/L
6 g Tallo de brócoli (<i>Brassica oleracea</i>)			423 mg/L
6 g de vaina de haba (<i>Vicia faba</i>)			329 mg/L

Se ha demostrado experimentalmente que 1 mg peroxidasa inmovilizada de rábano remueve 47 mg/L de p-clorofenol [94 mg/l] en 1 h de reacción (Bayramoglu y col., 2008) mientras que 60 u/mL peroxidasa de rábano remueven hasta 94 mg/L de p-clorofenol [94 mg/L] en 5 min de reacción (Dalal y col., 2007); para el contaminante 4-clorofenol a bajas concentraciones (47-94 mg/L) con 1.5 horas de incubación fue suficiente para remover por completo todo el 4-clorofenol (cuadro 7), mientras que alta concentración (470 mg/L) la mayor remoción la alcanza el extracto de la vaina de haba con 258 mg/L, nuevamente como en el caso de remoción de fenol con extracto vegetal (cuadro 4) a mayor concentración hay un menor porcentaje de remoción.

Cuadro 7. Miligramos de 4-clorofenol [0.5, 1.0, 5.0 mM] removidos con vegetal en extracto con buffer de fosfatos (pH 6) en hora y media de reacción.

VEGETAL EN EXTRACTO DE BUFFER DE FOSFATOS pH 6	CONCENTRACIÓN DE 4- CLOROFENOL		
	0.5 mM	1.0 mM	5.0 mM
	TIEMPO DE INCUBACIÓN		
	1.5 horas	1.5 horas	1.5 horas
Cáscara de rábano	28 mg/L	66 mg/L	282 mg/L
Cáscara de tomate	47 mg/L	94 mg/L	211 mg/L
Tallo de flor de calabaza	47 mg/L	94 mg/L	282 mg/L
Tallo de brócoli	47 mg/L	94 mg/L	211 mg/L
Vaina de haba	47 mg/L	94 mg/L	258 mg/L

En el cuadro 8 se observa la remoción de contaminante en diferentes tiempos de reacción obtenida con peroxidasa de diferentes vegetales aplicadas a fitorremediación de agua contaminada artificialmente con 4-clorofenol, estos datos se comparan con los datos obtenidos en laboratorio, se puede observar que 16 mL de extracto de cáscara de rábano y 18 mL de extracto de tallo de flor de calabaza eliminan 282 mg/L en 1.5 horas mientras que en la misma cantidad de tiempo 5 u/mL de peroxidasa comercial de rábano remueve 369 mg/L de fenol (Tong y cols, 1998) .

Cuadro 8. Comparación entre los resultados de la fitorremediación de 4-clorofenol en otras investigaciones con los obtenidos en los experimentos del presente trabajo (últimos datos sombreados).

CANTIDAD DE ENZIMA (PEROXIDASA) O VEGETAL	Cantidad de 4-clorofenol (sustrato)	Tiempo de reacción	Remoción de contaminante (4-clorofenol)
60 u/mL peroxidasa de rábano (<i>Dalal y col., 2007</i>)	30 mL [94 mg/L]	5 min	94 mg/L
5 u/mL de peroxidasa comercial de rábano (<i>Tong y cols, 1998</i>)	50 mL [100 mg/l]	1.5 h	369 mg/L
1 mg peroxidasa inmovilizada de rábano (<i>Bayramoglu y col., 2008</i>)	120 mL [94 mg/l]	1 h	47 mg/L
18 mL de extracto de cáscara de rábano (<i>Raphanus sativus</i>)	100 mL [470 mg/L]	1.5 h	282 mg/L
18 mL de extracto de cáscara de tomate (<i>Physalis ixocarpa</i>)			211 mg/L
18 mL de extracto de tallo de flor de calabaza (<i>Cucurbita pepo</i>)			282 mg/L
18 mL de extracto tallo de brócoli (<i>Brassica oleracea</i>)			211 mg/L
18 mL de extracto de vaina de haba (<i>Vicia faba</i>)			258 mg/L

CONCLUSIONES

- ✿ La actividad enzimática es una variable de la cual depende el tiempo de remoción entre mayor sea la actividad enzimática mas eficiente será la fitorremediación.
- ✿ Los vegetales en secciones pueden utilizarse hasta tres veces, sin embargo pierden su capacidad de remoción conforme se reutilizan; el tejido de los vegetales que se usan a concentraciones mayores a 5 mM (470 mg/L) tiende a disolverse.
- ✿ El tiempo de remoción del 100% de fenol de menos a más fue el siguiente: extracto de buffer (15-20 min) < polvos acetónicos (45-60 min) < vegetal en secciones (20-48 h).
- ✿ En el caso del fenol se encontró que a mayor concentración se necesita más tiempo de reacción, la remoción más alta fue de 470 mg/L en 48 horas con el del tallo de flor de calabaza en secciones.
- ✿ En la concentración del 4-clorofenol se encontró que a mayor concentración la remoción más alta fue de 282 mg/L con el extracto de cáscara de rábano y el extracto del tallo de brócoli (1.5 horas).
- ✿ La cáscara de rábano, la cáscara de tomate, el tallo de brócoli y el tallo de flor de calabaza logran remover al fenol [1 mM], a un pH de 6 mientras que el pH 8 resulta ideal en la remoción de 4-clorofenol [1 mM]. La vaina de haba requiere condiciones ácidas (pH 2) para remover ambos contaminantes.
- ✿ Todos los vegetales fueron aplicables a la fitorremediación de agua contaminada con fenol y p-clorofenol.

RECOMENDACIONES

- Evaluar la fitorremediación de agua contaminada con fenol a varias concentraciones con la vaina de haba en condiciones exclusivamente ácidas (pH 2) para determinar de manera mas especifica su capacidad de remoción.
- Realizar pruebas con aguas residuales reales contaminadas con fenol utilizando tallos de flor de calabaza y de brócoli en secciones, o bien polvos acetónicos de cáscara de tomate y de rábano.
- Finalmente, para el uso de biorreactor para la eliminación de fenoles, se sugiere la utilización de vegetal en secciones para concentraciones altas de contaminante; mientras que para bajas concentraciones el uso de extracto de vegetal en buffer de fosfatos resulta ser más eficiente.

REFERENCIAS CITADAS

- Agudelo, L. M. y Macías, K. I. **2005** Fitorremediación: la alternativa para absorber metales pesados de los biosólidos. *Revista Lasallista de Investigación* 2 (1):57-60
- Akhtar, S. y Husain, Q. **2006** Potential applications of immobilized bitter melon (*Momordica charantia*) peroxidase in the removal of phenols from polluted water. *Chemosphere* 65:1228-1235
- Alonso, M. C., Puig, D.; Silgoner, I.; Graserbauer, M.; Barcelo, D. **1998**. Determination of priority phenolic compounds in soil samples by various extraction methods followed by liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *Journal Chromatography* 823 (1-2): 231-239.
- Alvarado, R. y Calva, L. **2002**. Compuestos fenólicos: origen distribución y efecto de los ecosistemas marinos. *Contactos* 44:31-43.
- Baltazar, M. y Moreno, V. **2007** Búsqueda de nuevas peroxidases en extractos crudos de vegetales y plantas de México. *Informe de servicio social de la FES Zaragoza: SS BIOL 07 35*
- Bayramoglu, G, y Arica, M. Y. **2008** Enzymatic removal of phenol and p-chlorophenol in enzyme reactor: horseradish peroxidase immobilized on magnetic bead. *Doi: 10.10106/j.jhazmat 2007.12.008*.
- Belhateche, D. **1995** Choose Appropriate Wastewater Treatment Technologies. *Chemical Engineering. Progress*. Pp. 32-51.
- Buchanan, I. D. y Nicell, J. A. **1997**. Model development for horseradish peroxidases catalyzed removal of aqueous phenol. *Biotechnology and bioengineering* 54 (3):251-261.
- Cañizares, R.O.; Rivas, L.; Montes, M.C.; Domínguez, A.R.; Travieso L.; Benítez, F. **1994a**. Aerated swine-wastewater treatment with k-

- carrageenan-Immobilized *Spirulina maxima*. *Bioresource Technology* 47: 89-91.
- Cañizares-Villanueva, R.O.; Ramos, A.; Corona, A.I.; Monroy, O.; de la Torre, M.; Gómez-Lojero, C.; Travieso, L. **1994b**. Phormidium treatment of anaerobically treated swine wastewater. *Water Research* 28:1891-1895.
- Chen J.; Rulkens W. H.; Bruning H. **1997**. Photochemical elimination of phenols and COD in industrial wastewaters. *Water Science and Technology* 35(4): 231–238
- Cheng, J.; Ming, S.; Zuo, P. **2006** Horseradish peroxidase immobilized on aluminium-pillared interlayered clay for the catalytic oxidation of phenolic wastewater. *Water Research* 40:283-290
- Cooper, VA. y Nicell, JA. **1996**. Removal of phenols from a foundry wastewater using horseradish peroxidase. *Water Research* 30: 954-964.
- Dalal, S. y Nath, M. **2007**. Treatment of phenolic wastewater by horseradish peroxydase inmobilized by bioafinity layering. *Chemosphere* 67: 741747
- Davis, J.B. **1956**. Microbial decomposition of hydrocarbons. *Industrial. Engineering Chemical* 48:1444-1448.
- Dec, J. y Bollag, J-M. **1994**. Use of plant material for the decontamination of water polluted with phenols. *Biotechnology and Bioengineering* 44: 1132-1139
- Duran N. y Esposito, E. **2000**. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis B: Enviromental* 28:83-99
- Fernández, A.; Peteira, B.; González, M.C.; LLanes, L.Y. **2003**. Actividad peroxidasa, polifenoloxidasa, fenilalanina Amonio liasa y glucanasa en

- somaclones y mutantes de Arroz. *Revista Protección Vegetal* 18 (3): 183-188.
- Ferrera-Cerrato, R.; Rojas-Avelizapa, N.G.; Poggi-Varaldo, H.M.; Alarcón, A.; Cañizares-Villanueva, R.O. **2006**. Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 48 (2): 179-187
- Fialova A.; Boschke E.; Bley T. (2004) Rapid monitoring of the biodegradation of phenol-like compounds by the yeast Candida maltosa using BOD measurements. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54(1):69–76.
- Fiamegos, Y.; Stalikas, C.; Pilidis, G. **2002** 4-Aminoantipyrine spectrophotometric method of phenol analysis study of the reaction products via liquid chromatography with diode-array and mass spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta* 467:105-114
- García-Ochoa, F. y Santos, A. **1996** Oxidación catalítica de compuestos fenólicos en aguas residuales. *Dpto. de Ingeniería Química. Facultad de CC. Químicas. Universidad Complutense de Madrid* 269-274pp.
- Gaspar T.; Penel C.; Thorpe T.; Greppin H. **1982**. En: Plant Peroxidases 1970-1980. J. Lobarzewski, H. Greppin, C. Penel y T. Gaspar (Eds). *University of Geneva, Switzerland* 90-91pp.
- Ghiourelitis, M. y Nicell, J.A. **1999**. Assesment of soluble products of peroxidase-catalyzed polymerization of aqueous phenol. *Enzyme and Microbial Technology* 25:185-193
- Gil, E.; Cabrera, M.; Jaramillo, S. **2003**. Foto-oxidación del sistema cromo hexavalente 4-fenol. *Revista universidad EAFIT* 39(131):60-76
- Gimeno, O.; Carbajo, M.; Beltran, F.J.; Rivas, F.J. **2005** Phenol and sustitutes phenols AOPs remediation. *Journal Hazardous Materials* 119:99-108

- Giorno, L.; Drioli, E. **2000** Biocatalytic membrana reactors: applications and perspectivas. *Trends Biotechnology* 18:339-348
- Gómez Mesa E. **1997** Tecnologías para el tratamiento de residuos líquidos peligrosos, *República Dominicana*
- González L.E.; R.O Cañizares.; S. Baena. **1997**. Efficiency o ammonia and phosphorus removal from a Colombian agrión industrial wastewater by the microalgae Chlorella vulgaris and Scenedesmus dimorphus. *Bioresource Technology* 60:259-262.
- González, P. S.; Capozucca, C. E.; Tigier, H. A.; Murad, S. R.; Agostini, E. **2006** Phytoremediation of phenol from wastewater, by peroxidases of tomato hairy root cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 39:647-653pp
- Govere, E.M.; Tonegawa, M.; Bruss, M.A.; Wheeler, E.F.; Kephart, K.B.; Voigt, J.W.; Dec, J. **2007**. Using minced horseradish roots and peroxides for the deodorization of swine manure: a pilot scale study. *Bioresource Technology* 98: 1191-1198
- Grambow H. **1986**. En: Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases. H. Greppin, C. Penel y T. Gaspar (Eds.). *University of Geneva, Switzerland*, 31-41.
- Hermoso Berruecos, S. **2008** Biodegradación aeróbia de fenol en agua y en aguas residuales de refinería, empleado reactores de flujo cerrado. Facultad de química, UNAM. Tesis 001-00521-H4-2008
- Hernández, L.; Luna, H.; Ruiz-Terán, F.; Vázquez, A. **2004** Screening for hydroxynitrile lyase activity in crude preparations of some edible plants. *Journal of Molecular Catalysis B;Enzymatic* 30:105-108
- Karam J.; Nicell, J.A. **1997** Potential applications of enzymes in waste treatment, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 69:141

- Klibanov A. M.; Tsu-Man T.; Scott K. P. **1983**. Peroxidase catalyzed removal of phenols from coal-conversion wastewaters. *Science* 221:259-61.
- Kobayashi S.; Uyama H.; Kimura S. **2001** Enzymatic Polymerization. *Chemical. Review.* 101-3793-3818.
- Koshkin N. I.; Shirkévich M. G. **1975**. Manual de Física Elemental. *Editorial Mir. ISBN 36, 74-75, 85-86 pp.*
- Laguna, J. **1996** Bioquímica. *Facultad de Medicina, UNAM, Mexico D.F., Fournier S.A. 2^a ed.*
- Lai, Y. C. y Lin, S. C. **2005** Application of immobilized horseradish peroxidase for the removal of p-clorophenol from aqueous solution. *Process Biochemical* 40:1167-1174
- Lazo, J. C.; Navarro, A. E.; Sun-Kou, M. R.; Llanos, B. P. **2007** Empleo de arcillas modificadas para la adsorción de fenol presente en soluciones acuosas. *Revista Sociedad Química Perú.* 73(3):166-170
- Luna, F. V.; Fernández, A.; González, E.; Patiño, R.; Álvarez, G. **2005** Emprendiendo la fitorremediación en México. *Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Guanajuato.*
- Maloney S. W.; Manem J.; Mallevalle J.; Fiessinger F. **1984**. The potential use of enzymes for removal of aromatic compounds from water. *Water Science and Technology* 17:273-278.
- Metcalf, E. **1995** Ingeniería de Aguas Residuales: Tratamiento, vertido y reutilización. *McGraw-Hill. 3^o Edición*
- Miland E.; Smyth M. R.; Ó Fágáin C. **1996**. Phenol removal by modified peroxidases. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 67:227-236.
- Nicell, JA. y Wright, H. **1997**. A model of peroxidase activity with in inhibition by hydrogen peroxide. *Enzyme and Microbial Technology* 21: 157-164

- Olguín-Lora P.; Puig-Grajales I.; Razo-Flores E. **2003**. Inhibition of the acetoclastic methanogenic activity by phenol and alkyl phenols. *Environmental Technology* 24:999-1006
- Olguín-Lora P. y Razo-Flores E. **2004**. Anaerobic biodegradation of phenol in sulfide rich media. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 79:554–561
- Pérez, E.; Rodríguez, Y.; Hernández, M.A.; Noval, B.M. **2004**. Dinámica de inducción de algunos sistemas de defensa en la interacción HMA-tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) var Amalia. II. Inducción y expresión de peroxidasa y polifenoloxidasas en raíces de tomate. *Cultivos tropicales* 25 (2): 45-52
- Ramírez Cortina, C. R.; Hernández Pérez, I.; Ortiz Lozoya, C. E.; Alonso Gutiérrez, M. S. **2002** Oxidación de fenoles con peróxido de hidrógeno y ozono. *XXVIII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental Cancún, México*.
- Reuvini R.; Shimoni M.; Karachi Z.; Kuc J. **1992**. *Phytopatology* 82: 749-753.
- Rippen, G. **1989** *Handbuch der Umwelt-Chemicalien*. 4th supplementary instalment, 11-89.
- Riser-Roberts, E. **1998**. Remediation of petroleum contaminated soils. *CRC Press. Lewis publishers*.
- Rodríguez, J. L. y Sánchez, J. **2002** Biorremediación. *Aspectos tecnológicos y aplicación al vertido del Prestige. Universidad de Oviedo* 17-21 pp.
- Sánchez, E. P.; Monroy, O.; Cañizares, R.O.; Travieso, L.; Ramos, A. **1995**. A preliminary study of piggery waste treatment by an up flow sludge bed anaerobic reactor and a packed bed anaerobic reactor. *Journal Agriculture Engineering Research* 62:71-76.
- Santos de Araujo, B.; Dec, J.; Bollag, J. M.; Pletsch, M. **2006** Uptake and transformation of phenol and chlorophenols by hairy root cultures of

- Daucus carota, Ipomoea batatas and Solanum aviculare. *Chemosphere* 63:642-651
- Schnoor, J.L.; Licht, L.A.; McCutcheon, S.C.; Wolfe, N.L. y Carriera, L.H. **1995** Phytoremediation. *Environmental Science Technology* 29:318-323.
- Singh, N. y Singh J. **2002**. An enzymatic method of removal of phenol from industrial effluent, *Prep. Biochemical. Biotechnology* 32:127-133
- Singh, N.; Melo, J.S.; Eapen, S.; D'Souza, S.F **2006** Phenol removal using Brassica juncea hairy roots: role of inherent peroxidase and H₂O₂, *Journal Biotechnology* 123:43-49
- Steven R. [Citado marzo 22 **2005**] Introduction to phytoremediación. U.S. *Environmental Protection Agency*. URL disponible en: <http://www.epa.gov/nrmrl/lrpcd/rcb/introphy.htm>
- Susarla, S.; Medina, V. F.; McCutcheon, S. C. **2002** Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. *Ecological Engineering* 18:647-658pp
- Tarragó, J. R.; Faloci, M. M.; Luna, C. V.; Sansberro, P. A.; Mroginski, L. A. **2003** Determinación de enzimas peroxidasas en tejidos caulinares de Ilex dumosa R. e Ilex paraguariensis St. Hil. *Universidad Nacional del Nordeste Comunicaciones Científicas y Tecnológicas* Resumen: A-042
- Tatsumi, K.; Ichikawa, H.; Wada, K. **1994**. Dephenolization from aqueous solution by treatment with peroxidase and a coagulant. *Water Science and Technology* 30: 79-86
- Tatsumi, K.; Wada, K.; Ichikawa, H. **1996**. Removal of chlorophenols from wastewater by immobilized horseradish peroxidase. *Biotechnology and bioengineering* 51:126-130
- Terry, P.A. y W. Stone. **2002**. Biosorption of cadmium and copper contaminated water by *S. abundans*. *Chemosphere* 47:249-255.

- The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. **1989**
11a. Edition. Rahway, New Jersey: Merck. P 9029
- Tong. Z.; Qingxiang, Z.; Hui, H.; Qin, L.; Yi, Z. **1998** Kinetic study on the removal of toxic phenol and chlorophenol from waste water by horseradish peroxidase. *Chemosphere* 37 (8):1571-1577
- Toumi, A.; Nejmeddine, A.; El-Harmouri, B. **2000**. Heavy metal removal in waste stabilisation ponds. *Water Science and Technology* 42:17-21.
- Torres, A. y Calva, L. **2002**. Compuestos fenólicos: Origen distribución y efectos en los ecosistemas marinos. *Contactos* 44:31-34
- Travieso L.; Sánchez, E.; Borja, R.; Benítez, F.; León, M.; Colmen-Arejo, M.F. **2004**. Evaluation of a laboratory and full-scale microalgae pond for tertiary treatment of piggery waste. *Environmental Technology* 25:565-576.
- US EPA, 2004. Environmental Protection Agency Toxic Release Inventory (TRI) program. Disponible en: <http://www.epa.gov/tri/chemical/index.htm>
- Villalobos D. A. y Buchanan I .D. **2002** Removal of aqueous phenol by Arthromyces ramosus peroxidase. *Journal Environmental Engineering Science* 1, 65-73.
- Villegas, Ma L. O.; Geissler, G.; Handal, A.; González, E. **2003** Inmovilización de una peroxidasa de chayote [Sechium edule (Jacq.) Sw] y su potencial aplicación en la remoción de sustancias fenólicas en aguas contaminadas. *Revista Internacional de Contaminación. Ambiental* 19 (2) 73-81pp
- Villegas-Rosas M. L. O.; Geissler G.; Handal-Silva A.; González-Vergara E. **2002** Isolation, partial purification and immobilization of peroxidases from chayote (Sechium edule Sw) and their potential application in the removal of phenolic compounds from waste waters. *Memorias del VI International Plant Peroxidases Symposium* 3-7 July, p. 146.

- Wright, H. y Nicell, J. A. **1999**. Characterization of soybean peroxidase for the treatment of aqueous phenols. *Bioresource Technology* 70:69-79
- Yang J.; Jianping W.; Hongmei L.; Suliang Y.; Zongding H. **2005** The biodegradation of phenol at high initial concentration by the yeast Candida tropicalis. *Biochemical Engineering Journal* 24:243–247.
- Zhang, J.; Ye, P.; Chen, S.; Wang, W. **2007** Removal of pentachlorophenol by immobilized horseradish peroxidase. *International Biodeteriorogy and Biodegradation* 59:307-314
- Ziemys, A. y Kulys, J. **2005**. Inhibition of heme peroxidase during phenol derivatives peroxidation. Possible molecular cloaking of the active center. *International Journal Molecular Science* 6:245-256
- Zobell, C.E. **1946**. Action of microorganisms in hydrocarbons. *Bacteriology Review* 10:1-49.

ANEXO

Preparación de soluciones.

Buffer de fosfatos (10 mM, pH 6.1): 11.9 g de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) y 1.75 g de fosfato disódico (Na_2HPO_4) aforar a 1 L con H_2O destilada, se conserva en refrigerador (Baltazar y Moreno, 2007).

Buffer de amonio pH 1.0: 0.7 g de cloruro de amonio (NH_4Cl) y 6.5 mL de amoniaco (NH_3) [25%] disueltos en 10 mL de H_2O destilada (Baymaroglu y Arica, 2008; González y col., 2006).

4-Aminoantipirina (4-AAP): 2 g de 4-AAP en 250 mL de H_2O destilada (Baymaroglu y Arica, 2008; González y col., 2006).

Ferricianuro de Potasio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$): 9 g de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ en 250 mL de H_2O destilada (Baymaroglu y Arica, 2008; González y col., 2006).

Soluciones de fenol para curva estándar: 0.0375 mM, 0.0500 mM, 0.0625 mM, 0.075 mM, 0.0875 mM.

Soluciones de 4-clorofenol para curva estándar: 0.0375 mM, 0.0625 mM, 0.0875 mM, 0.1125 mM, 0.1375 mM

Agua contaminada artificial.

Aforar el contaminante en agua destilada según la concentración deseada (ver cuadro 9).

Cuadro 9. Cantidad (g) de contaminante por litro de agua destilada.

CONTAMINANTE	Fenol ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$)	4-clorofenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OCl}$)
[0.5 mM]	0.0470	0.0647
[1 mM]	0.0941	0.1295
[5 mM]	0.4705	0.6478

Agua contaminada artificial [1.0mM] para prueba de pH.

Buffer pH 2 (HCl-KCl 0.2 M): Adicionar 125 mL de solución A, 26.5 mL de solución B y aforar a 500 mL. Solución A (KCl 0.2 M): 14.9 g/L H₂O destilada, Solución B (HCl 0.2 M): 16.8mL de HCl /L de H₂O destilada.

Buffer pH 4 (acetato 2 M): Agregar 2.45 g de acetato de sodio (CH₃COONa) en 41.0 mL de ácido acético (CH₃COOH) 2M, aforar a 1L de H₂O destilada.

Buffer pH 6 (fosfatos 0.1 M): Adicionar 1.45 g de fosfato monopotásico (KH₂PO₄) y 1.75 g de fosfato disódico (Na₂HPO₄) y aforar a 1 L de H₂O destilada.

Buffer pH 8 (fosfatos 0.1 M): Adicionar 13.42 g de fosfato disódico (Na₂HPO₄) y 0.72 g de fosfato monopotásico (KH₂PO₄) y aforar a 1 L de H₂O destilada.

✿ Adicionar a cada 0.5 L de buffer 0.047 g de fenol o 0.0647 g de *p*-clorofenol para tener 4 muestras de agua contaminada con fenol [1 mM] y 4 muestras contaminadas con *p*-clorofenol [1.0 mM] a diferentes pH.

Vegetal equivalente a 0.1g polvos acetónicos.

El cuadro 10 indica: en la primera columna el peso de vegetal con el que se partió para obtener los polvos acetónicos, la segunda columna numérica presenta los pesos (g) que se obtuvieron de polvo acetónico de cada vegetal, la última columna se refiere al equivalente de vegetal que correspondería ese 0.1 g de polvo acetónico.

Cuadro 10. Cantidad de polvo acetónicos obtenido y utilizado en la fitorremediación.

VEGETAL	POLVOS ACETÓNICOS		
	SE PESÓ:	SE OBTUVO:	0.1 g =
Cáscara de rábano	29.7000	07.4891	0.3966
Cáscara de tomate	36.9000	02.9739	1.2408
Tallo de flor de calabaza	41.2000	11.8956	0.3463
Tallo de brócoli	33.0000	05.5084	0.5991
Vaina de haba	33.3000	06.5142	0.5112