

5  
2eje.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"

REDUCCION DE COLOR DE AGUAS RESIDUALES  
PROVENIENTES DE UNA EMPRESA PAPELERA  
EMPLEANDO EL HONGO *Phanerochaete chrysosporium*.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A  
BAÑUELOS PANUCO CARMEN ADRIANA

U N A M  
F E S  
Z A R A G O Z A



LO HUBIERO ECHO  
DE NUESTRA DELEGACION

MEXICO, D. F.

1994

TESIS CON  
FALLA LE ORIGEN



## **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 está 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.

**El presente trabajo se desarrolló en el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV-IPN, bajo la dirección de la Dra. Refugio Rodríguez Vázquez.**

**Este trabajo estuvo incluido dentro del proyecto 211085-5-1651 N apoyado por el CONACyT. Se agradece la beca otorgada por este organismo.**

## DEDICATORIA

### A mis padres:

Por su gran amor, confianza en mí y por incondicional apoyo durante todo mi desarrollo académico, gracias al cual alcancé una de mis más grandes metas: obtener mi título de licenciatura.

### A mi hermana Lupita:

Por su amistad, su amor, su comprensión, por su enorme apoyo y por sus hermosos detalles.

### A Toño:

Por su gran amor, su amistad, su total apoyo, su enorme comprensión y por hacerme sentir tan especial.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Refugio Rodríguez Vázquez por su amistad, comprensión y el enorme apoyo que me brindó durante el desarrollo de este trabajo.

Al Ing. Abel Blancas Cabrera por haberme despertado el interés por la Biotecnología, y por su apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

A la Q.F.B. Elvira Ríos Leal por su amistad y apoyo técnico.

A Magdalena, Norma, Socorro y Fernando, por su amistad compañerismo y apoyo durante mi estancia en el laboratorio de Ecología (Depto. de Biotecnología y Bioingeniería CINVESTAV).

A Dolores Campos Velarde por su apoyo técnico y su valiosa amistad.

A Juan Corona Hernández por su valioso apoyo técnico.

Al Dr. Fernando Esparza y al Dr. Carlos Arias por haberme permitido ingresar al Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, en donde tuve gratas experiencias.

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCION .....	viii
FUNDAMENTACION DEL TEMA .....	ix
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	x
1. GENERALIDADES .....	1
1.1. PROCESOS QUIMICOS DE PULPEO .....	2
1.1.1. PULPEO KRAFT .....	2
1.1.2. OBTENCION DE PULPA A PARTIR DE BAGAZO DE CAÑA .....	2
1.2. METODOS PARA EL BLANQUEO DE LA PULPA .....	5
1.3. COMPOSICION QUIMICA DE LOS RESIDUALES DEL BLANQUEO DE LA PULPA .....	7
1.3.1. LIGNINA .....	7
1.3.2. COMPUESTOS CLORADOS .....	9
1.4. METODOS PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DEL BLANQUEO DE LA PULPA .....	10
1.4.1. METODOS FISICO-QUIMICOS .....	11
1.4.1.1. COAGULACION QUIMICA .....	11
1.4.1.2. FLOCULACION .....	12
1.4.1.3. FILTRACION .....	12
1.4.1.4. ADSORCION CON CARBON ACTIVADO .....	12
1.4.1.5. INTERCAMBIO IONICO .....	13
1.4.1.6. OZONOLISIS .....	13
1.4.1.7. OSMOSIS INVERSA .....	14
1.4.2. METODOS BIOLOGICOS .....	14
1.4.2.1. SISTEMAS ANAEROBICOS .....	15
1.4.2.1.1. Tanques sépticos .....	15
1.4.2.1.2. Digestores .....	15
1.4.2.1.3. Lagunas .....	15
1.4.2.2. SISTEMAS AEROBICOS .....	16
1.5. MICROORGANISMOS LIGNINOLITICOS .....	20
1.5.1. HONGOS DE LA PUDRICION BLANCA .....	20
1.5.2. HONGOS DE LA PUDRICION CAFE .....	21
1.5.3. HONGOS DE LA PUDRICION SUAVE .....	22
1.5.4. UTILIDAD DE LOS HONGOS LIGNINOLITICOS .....	22
1.5.5. ENZIMAS LIGNINOLITICAS .....	24
1.5.5.1. LIGNINA PEROXIDASA .....	24
1.5.5.2. MANGANESO PEROXIDASA .....	29
1.5.5.3. LACASA .....	30
1.5.6. MECANISMOS DE ACCION .....	30
1.5.7. CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA PRODUCCION DE ENZIMAS LIGNINOLITICAS .....	36

2. HIPOTESIS. ....	41
3. OBJETIVOS .....	43
3.1. OBJETIVO GENERAL .....	44
3.2. OBJETIVOS PARTICULARES .....	44
4. MATERIALES Y METODOS .....	45
4.1. CINETICA DE CRECIMIENTO DE <i>Phanerochaete chrysosporium</i> EN MEDIO KIRK .....	46
4.1.1. PREPARACION DE LA SUSPENSION DE ESPORAS .....	46
4.1.2. INOCULACION Y CONDICIONES DE CULTIVO .....	46
4.2. ESTANDARIZACION DE LA TECNICA PARA MEDIR COLOR .....	46
4.2.1. PRINCIPIO .....	46
4.2.2. PREPARACION DE LAS MUESTRAS .....	47
4.3. ESTANDARIZACION DE LA TECNICA PARA MEDIR ACTIVIDAD LIGNINOLITICA .....	47
4.3.1. PRINCIPIO .....	47
4.3.2. PREPARACION DE LAS SOLUCIONES DE PEROXIDO DE HIDROGENO .....	48
4.3.3. PREPARACION DE LAS SOLUCIONES DE ALCOHOL VERATRILICO .....	48
4.3.4. PREPARACION DE LA SOLUCION REGULADORA DE TARTRATOS .....	48
4.3.5. MEDICION DE LA ACTIVIDAD LIGNINOLITICA A LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ALCOHOL VERATRILICO Y PEROXIDO DE HIDROGENO .....	48
4.4. ANALISIS DEL AGUA RESIDUAL .....	49
4.4.1. DETERMINACION DE COLOR .....	49
4.4.2. DETERMINACION DE NITROGENO TOTAL EN EL AGUA RESIDUAL .....	49
4.4.3. PRINCIPIO .....	49
4.4.4. DETERMINACION DE AZUCARES TOTALES EN EL LICOR .....	51
4.4.5. DETERMINACION DE DBO Y DQO .....	52
4.5. SELECCION DE LA CONCENTRACION DE EFLUENTE PARA SU DEGRADACION CON <i>Phanerochaete chrysosporium</i> .....	52
4.5.1. MEDIO DE CULTIVO .....	52
4.5.2. INOCULACION Y CONDICIONES DE CULTIVO .....	52
4.6. CINETICA DE DECOLORACION DEL EFLUENTE A LA CONCENTRACION ELEGIDA .....	52
4.6.1. MEDIO DE CULTIVO .....	52
4.6.2. INOCULACION Y CONDICIONES DE CULTIVO .....	53
4.7. CINETICA DE CRECIMIENTO DE <i>Phanerochaete chrysosporium</i> EN MEDIO KIRK CON INOCULO AUMENTADO .....	53

4.7.1. MEDIO DE CULTIVO .....	53
4.7.2. INOCULACION Y CONDICIONES DE CULTIVO .....	54
4.7.3. DETERMINACION DE PESO SECO Y ACTIVIDAD LIGNINOLITICA .....	54
4.8. EVALUACION DEL EFECTO DE LA VELOCIDAD DE AGITACION, LA ADICION DE TWEEN 80 Y LA ADICION DE ALCOHOL VERATRILICO SOBRE LA DISMINUCION DE COLOR Y LA ACTIVIDAD LIGNINOLITICA .....	54
4.8.1. MEDIO DE CULTIVO .....	55
4.8.2. INOCULACION Y CONDICIONES DE CULTIVO .....	56
4.9. CINETICA DE DECOLORACION BAJO LAS MEJORES CONDICIONES .....	56
4.9.1. MEDIO DE CULTIVO .....	56
4.9.2. INOCULACION Y CONDICIONES DE CULTIVO .....	57
4.9.3. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD LIGNINOLITICA .....	57
4.9.4. DETERMINACION DE GLUCOSA RESIDUAL .....	57
4.9.5. PRINCIPIO .....	57
4.9.6. DETERMINACION DE DBO Y DQO .....	58
4.9.7. DETERMINACION DE CLOROFENOLICOS .....	58
5. RESULTADOS .....	60
6. DISCUSION DE RESULTADOS .....	76
6.1. ANALISIS DEL EFLUENTE .....	77
6.2. CINETICA DE CRECIMIENTO DE <i>Phanerochaete chrysosporium</i> EN MEDIO KIRK .....	77
6.3. SELECCION DE LA CONCENTRACION DEL EFLUENTE .....	78
6.4. CINETICA DE DECOLORACION DEL EFLUENTE DILUIDO AL 60% (V/V) .....	78
6.5. EFECTO DEL AJUSTE DE NUTRIENTES EN LA REDUCCION DE COLOR DEL AFLUENTE .....	79
6.6. EFECTO DEL TAMAÑO DE INOCULO EN LA REDUCCION DE COLOR DEL EFLUENTE ALCALINO .....	80
6.7. DISEÑO FACTORIAL 2 <sup>2</sup> .....	80
7. CONCLUSIONES .....	84
8. SUGERENCIAS .....	86
9. APENDICE .....	88
9.1. COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO KIRK .....	89
9.2. PREPARACION DE LA CURVA DE CALIBRACION DE CLOROPLATINATO DE POTASIO .....	90
9.3. PREPARACION DE LA CURVA DE CALIBRACION DE	

VERATRALDEHIDO .....	92
10. BIBLIOGRAFIA .....	103

## INDICE DE FIGURAS

### GENERALIDADES

Figura 1. Reacciones catalizadas por la ligninasa. . . . .	27
Figura 2. Compuestos modelo con enlaces $\beta$ -1(A) y $\beta$ -O-4 (B). . . . .	31
Figura 3. Alcohol veratrílico como un mediador para la transferencia de electrones. . . . .	32
Figura 4. Ciclo catalítico de la ligninasa. . . . .	33
Figura 5. Oxidación enzimática del alcohol veratrílico y sus productos. . . . .	34
Figura 6. Esquema hipotético de la degradación de la lignina por <i>P. chrysosporium</i> . . . . .	36

### RESULTADOS

Figura 1. Curva de crecimiento de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> en medio Kirk. . . . .	62
Figura 2. Decoloración del efluente alcalino a diferentes concentraciones (20, 50, 60, 70 y 80% v/v en medio Kirk). . . . .	63
Figura 3. Crecimiento micelial, disminución de color y adsorción de color del efluente alcalino al 60% en medio Kirk (V/V), empleado a <i>P. chrysosporium</i> . . . . .	64
Figura 4. Decoloración del efluente a diferentes concentraciones en agua, enriquecido con el medio basal de Kirk. . . . .	65
Figura 5. Actividad ligninolítica y pesos seco de <i>P. chrysosporium</i> en función del tamaño de inóculo. . . . .	66
Figura 6. Disminución de color del efluente alcalino en función de la velocidad de agitación, la adición de Tween 80 y alcohol veratrílico. . . . .	67
Figura 7. Representación cúbica de los resultados del diseño factorial $2^3$ . . . . .	68
Figura 8. Representación gráfica de las interacciones entre las variables: concentración de alcohol veratrílico, velocidad de agitación y concentración de Tween 80. . . . .	70
Figura 9. Curva de probabilidad normal para los residuales del diseño factorial $2^3$ . . . . .	72
Figura 10. Cinética de decoloración del efluente alcalino al 60% (v/v), bajo las mejores condiciones obtenidas. . . . .	73
Figura 11. Comparación de la actividad ligninolítica de <i>P. chrysosporium</i> bajo las diferentes condiciones empleadas. . . . .	75

### APENDICE

Figura 1. Curva de calibración de cloroplatinato de potasio. . . . .	91
Figura 2. Curva de calibración de veratraldehído . . . . .	93
Figura 3. Cromatograma del efluente sin tratar diluido al 60% y enriquecido con los componentes del medio Kirk, 0.05% de Tween 80 y 0.4 mM de alcohol veratrílico. . . . .	101
Figura 4. Cromatograma del efluente diluido al 60%, tratado con <i>Phanerochaete chrysosporium</i> durante 8 días, empleando las mejores condiciones. . . . .	102

## INDICE DE TABLAS

### GENERALIDADES.

Tabla I Consumo de materias primas fibrosas en la producción de papel. . . . .	3
Tabla II Composición y propiedades de los efluentes provenientes de las etapas de cloración y extracción del blanqueo de la pulpa. . . . .	8
Tabla III Compuestos clorados producidos durante el blanqueo de la pulpa. . . . .	10
Tabla IV Enzimas implicadas en la degradación de la lignina. . . . .	25
Tabla V Puntos isoeléctricos de las isozimas de la ligninasa. . . . .	26
Tabla VI Propiedades físicas de las isozimas de la ligninasa. . . . .	28

### MATERIALES Y METODOS

Tabla I Ensayos de actividad enzimática a diferentes concentraciones de alcohol veratrflico y peróxido de hidrógeno. . . . .	50
Tabla II Variables y niveles manejados en el diseño factorial 2 <sup>3</sup> . . . . .	54
Tabla III Diseño factorial 2 <sup>3</sup> . . . . .	55
Tabla IV Medios de cultivo empleados en el diseño factorial 2 <sup>3</sup> . . . . .	56

### RESULTADOS

Tabla I Análisis químico del agua residual del blanqueo de pulpa de bagazo de caña. . . . .	61
Tabla II Efecto de las variables estudiadas sobre la decoloración del efluente . . . . .	69
Tabla III ANOVA para el diseño factorial 2 <sup>3</sup> . . . . .	71
Tabla IV Degradación de los compuestos clorofenólicos contenidos en el efluente alcalino. . . . .	74

### APENDICE

Tabla I Diluciones para preparar la curva de calibración de cloroplatinato de potasio. . . . .	90
Tabla II Diluciones para preparar la curva de calibración de veratraldehído. . . . .	92
Tabla III Tiempo de incubación y peso seco de <i>P. chrysosporium</i> empleando el medio basal Kirk. . . . .	94
Tabla IV Disminución de color del efluente alcalino a varias concentraciones en medio Kirk como diluyente. . . . .	95
Tabla V Decoloración del efluente alcalino al 60 % en medio Kirk como diluyente, empleando <i>P. chrysosporium</i> . . . . .	96
Tabla VI Disminución de color del efluente alcalino a varias concentraciones con ajuste de nutrientes empleando a <i>P. chrysosporium</i> . . . . .	97
Tabla VII Crecimiento y actividad ligninolítica de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> en función del tamaño de inóculo. . . . .	98
Tabla VIII Efecto de la velocidad de agitación, adición de Tween 80 y alcohol veratrflico sobre la disminución de color del efluente alcalino al 60%. . . . .	99

Tabla IX Decoloración del afluyente alcalino con las mejores condiciones empleando a <i>Phanerochaete chrysosporium</i> . . . . .	100
---	-----

## INTRODUCCION

En México, cerca del 90% de las aguas de desecho de la actividad industrial provienen de cuatro grandes industrias (Poggi y col., 1989), estas son; en orden de descargas anuales: la industria del azúcar (620 Mm<sup>3</sup>/año), la industria de la pulpa y el papel (100 Mm<sup>3</sup>/año), la industria del acero (38 Mm<sup>3</sup>/año) y la industria del petróleo y refinados (31 Mm<sup>3</sup>/año).

La industria Mexicana de la pulpa y el papel, genera alrededor del 12% del volumen de agua de desecho industrial y se sabe que muchos de los compuestos (cloroligninas y clorofenoles) contenidos en éstas aguas son tóxicos bioacumulables y recalitrantes, principalmente los contenidos en las aguas de la extracción alcalina durante el blanqueo de las pulpas.

Actualmente, estos efluentes se tratan mediante métodos biológicos aerobios y anaerobios (lagunas aerobias o anaeróbicas), sin embargo, estos métodos no reducen el color ni los compuestos clorados de alto peso molecular.

Desde hace varios años (Kirk, 1976), se descubrió la capacidad de los hongos de la pudrición blanca para degradar a la lignina y sus derivados hasta CO<sub>2</sub>, por acción de su complejo sistema enzimático. El hongo más estudiado, hasta ahora (en países como E.U.A., Canadá, Alemania y Chile) y que se ha aplicado eficientemente para el tratamiento de los efluentes del proceso Kraft, específicamente la etapa E<sub>1</sub> (primera extracción alcalina del blanqueo de pulpa Kraft) es *Phanerochaete chrysosporium*.

En México, sin embargo, no se ha desarrollado ningún trabajo de investigación, acerca de esta alternativa para el tratamiento de aguas de desecho de empresas de la pulpa y el papel.

En este trabajo se empleó al hongo de la pudrición blanca *Phanerochaete chrysosporium* CDBB h-298 para reducir el color de las aguas provenientes de la etapa de extracción alcalina del blanqueo de pulpa elaborada a partir de bagazo de caña.

Mediante la medición de la actividad enzimática, se pudo establecer la correlación entre la reducción de color y la síntesis de la enzima involucrada en la decoloración (ligninasa).

Se evaluaron varios factores con el fin de maximizar la decoloración y la producción del sistema enzimático. Se determinó el efecto del tamaño de inóculo, la velocidad de agitación, la adición de un tensoactivo (Tween 80) y la adición de un activador (alcohol veratrflico), estos tres últimos mediante un diseño factorial 2<sup>3</sup>, con el cual se pudo determinar el efecto que tuvieron las variables manejadas sobre la decoloración del efluente, así como las condiciones más adecuadas para una máxima reducción de color.

Se determinó, por último, el porcentaje de degradación de los compuestos clorofenólicos contenidos en el efluente, esto bajo las mejores condiciones, determinadas a partir del diseño factorial.

## FUNDAMENTACION DEL TEMA

Durante la producción de papel se emplea cloro para blanquear la pulpa y obtener un papel libre de color, en este proceso se forman varios derivados clorados de la lignina, los cuales contribuyen mayoritariamente al color café de las aguas residuales del pulpeo. De estos derivados algunos son tóxicos en parte, mutagénicos, bioacumulables y todos son recalcitrantes (Bergbauer, 1992). A lo anterior se auna su alto contenido de cloro 3 Kg de lignina unida a cloro por tonelada de papel blanqueado.

Muchos microorganismos no pueden atacar a la lignina o a sus productos poliméricos de degradación y como resultado, los materiales coloreados y tóxicos provenientes de las plantas, son ampliamente liberados en una forma casi inalterada, lo cual causa serios problemas ambientales. Aunque algunos procesos fisicoquímicos como son la ultrafiltración, adsorción con carbono y precipitación con cal son capaces de remover el color, todos tienen severas desventajas, como su alto costo por unidad de volumen de agua residual tratada o su difícil operación (Pellinen, 1988).

Los efluentes también pueden ser tratados mediante oxidación biológica en lagunas aerobias o anaerobias, pero estas resultan también un tanto ineficientes.

Dentro de sistemas biológicos aerobios, los hongos de la pudrición blanca constituyen un grupo limitado de basidiomicetos que poseen un activo sistema ligninolítico que es capaz de degradar protoligninas, así como ligninas modificadas, tales como las del proceso Kraft y cloroligninas. Esto último sugiere el gran potencial que estos hongos pueden tener para decolorar y degradar las cloroligninas en los efluentes (Galeno, 1992).

Actualmente, en otros países, (Canadá, E. U., Chile, Alemania, etc.) se tiene una gran cantidad de estudios acerca del uso de los hongos degradadores de la madera, para decolorar las aguas residuales de las plantas productoras de pulpa y papel, y en estos, la remoción de color así como de compuestos tóxicos ha sido muy eficiente (Pellinen, 1988).

Dentro del grupo de hongos la pudrición blanca, el más estudiado y que ha demostrado ser el más potente para la degradación de los compuestos antes mencionados es *Phanerochaete chrysosporium* (Bergbauer, 1992). Además, se ha reportado que este hongo tiene la capacidad de degradar la lignina, cloroligninas de bajo y alto peso molecular hasta  $CO_2$ , además de remover el color, reduce la DBO y la DQO (Demanda Biológica de Oxígeno y Demanda Química de Oxígeno).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aunque actualmente existen varios métodos para el tratamiento de aguas residuales, éstos no son muy eficientes para los efluentes provenientes de la industria papelera, quien usualmente descarga grandes volúmenes de aguas residuales coloreadas (Livernoche, 1983). Se tienen reportes (Pellinen, 1988) de que las lagunas aerobias y los lodos activados no eliminan las ligninas de alto peso molecular y no disminuyen satisfactoriamente el color; y que los procesos fisicoquímicos no eliminan las ligninas de bajo peso molecular, tienen problemas de acumulación de concentrados y tienen costos muy altos.

Por lo anterior, surge la necesidad de recurrir a otras alternativas para el tratamiento de las aguas residuales del pulpeo, que sea más eficiente y posea las menores desventajas posibles. Una de estas alternativas es el tratamiento microbiano utilizando los hongos de la pudrición blanca (Livernoche, 1983), este método presenta varias ventajas sobre las que actualmente se conocen, ya que es altamente eficiente, se tiene una gran especificidad, una baja contaminación, un menor consumo de energía y no se requieren de reactivos nocivos o tóxicos (Kirk, 1980).

Debido a que en México no se tiene ningún estudio respecto al tratamiento de aguas provenientes de la Industria papelera, empleando microorganismos ligninolíticos, este trabajo dará la pauta para el desarrollo de otras alternativas que pueden ser empleadas en el tratamiento de estos residuales y de esta manera se pueda contribuir a la disminución de los problemas de contaminación ambiental que originan las plantas papeleras.

## **1. GENERALIDADES**

## 1.1. PROCESOS QUIMICOS DE PULPEO

### 1.1.1. PULPEO KRAFT

El proceso de pulpeo Kraft para la producción de pulpa, es utilizado actualmente a nivel mundial en aproximadamente un 70% de las empresas papeleras. En el caso de México cerca del 75% de la pulpa es manufacturada a partir de madera de pino como materia prima, usando este proceso (Poggi y col., 1989).

A pesar de algunas desventajas, el proceso de pulpeo Kraft, es el método disponible más efectivo para la deslignificación de la madera debido a su costo, versatilidad y eficiencia. Considerando lo anterior y la gran cantidad de capital invertido en dicho proceso, es improbable que éste sea reemplazado en un futuro próximo (Eriksson, 1985).

Para producir la pulpa, la madera en forma de astillas es "cocida" en una solución de  $\text{Na}_2\text{S}/\text{NaOH}$  por 2 horas a  $170^\circ\text{C}$  aproximadamente. El licor que contiene los productos de la reacción de la lignina con el álcali se concentra y se quema en el horno de recobro, para eliminar la materia orgánica y producir carbonato de sodio y sulfito de sodio. Estas sales se disuelven para formar un licor verde, que se hace reaccionar con óxido de calcio para convertir el carbonato de sodio a hidróxido de sodio.

Con este tratamiento, la lignina sufre una gran variedad de reacciones, sin embargo, la más importante es la que resulta en una despolimerización parcial y en la formación de grupos ionizables (principalmente hidroxilos fenólicos), estos cambios conducen a la disolución de la lignina en el licor de pulpeo alcalino (Eriksson, 1985).

En la degradación y solubilización de la lignina, cerca del 90% de ésta es removida, sin embargo, el 10% remanente en la fibra es el responsable principal del color café característico de la pulpa y el papel Kraft. Este color es debido a la presencia de varias estructuras conjugadas incluyendo quinonas y catecoles principalmente, los cuales forman complejos, calconas y estilbenos, que absorben la luz visible. La lignina natural es de color crema pero cuando se oxida se torna a una coloración café.

### 1.1.2. OBTENCION DE PULPA A PARTIR DE BAGAZO DE CAÑA

La pulpa celulósica con fines papeleros se pueden obtener a partir de bagazo de la caña de azúcar (porción celular de la caña de azúcar formada de un 65% de fibra y un 35% de médula), Tabla I, mediante procesos de cocción y un posterior blanqueo. La cocción o deslignificación se puede realizar con diferentes reactivos químicos, siendo los más utilizados,

Tabla I Consumo de materias primas fibrosas en la producción de papel.

MATERIAS PRIMAS	AÑOS				
	1988 (%)	1989 (%)	1990 (%)	1991 (%)	1992 (%)
<b>1 CELULOSA QUIMICA DE MADERA</b>					
a) Al sulfato	23.9	19.3	18.2	17.1	16.4
- Blanqueada de fibra larga	10.1	9.3	8.8	7.6	8.8
- Blanqueada de fibra corta	5.2	3.6	3.5	3.4	4.0
- Semiblanqueada de fibra larga	1.0	0.4	0.2	-	-
- Sin blanquear de fibra larga	7.6	6.0	5.7	6.1	3.6
b) Al sulfito	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1
- Blanqueada	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1
- Sin blanquear	-	-	-	-	-
<b>2 CELULOSA QUIMICA DE PLANTAS ANUALES</b>					
a) De bagazo	9.0	8.8	8.2	7.2	7.6
- Blanqueada	9.0	8.8	8.2	7.2	7.6
- Sin blanquear	-	-	-	-	-
b) Otras	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
<b>3 PASTA MECANICA DE MADERA</b>	5.1	5.9	5.4	5.2	2.7
<b>4 OTRAS CELULOSAS</b>	0.6	0.1	0.2	0.2	0.2
Subtotal de celulosas	38.9	34.3	32.2	29.9	27.1
<b>5 FIBRAS SECUNDARIAS</b>	61.1	65.7	67.1	70.1	72.9
a) Del color natural de la pasta	37.6	39.2	40.2	41.9	45.5
b) Periódico impreso	8.3	8.7	8.6	10.3	9.1
c) Tarjeta tabular	4.2	3.2	3.2	0.1	0.1
d) Blanco	7.6	10.9	12.0	14.6	14.7
e) Periódico sin impresión	2.1	2.0	2.4	1.6	2.0
f) Gris	1.3	1.7	1.4	1.6	1.5
<b>TOTAL</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>

(Hernández, 1993)

para el caso del bagazo, el hidróxido de sodio (pulpeo soda) y mezcla de éste con sulfuro de sodio (pulpeo al sulfato); ambos se denominan pulpeos alcalinos

La pulpa a la soda ofrecen propiedades muy semejantes a la pulpa al sulfato, aunque en algunos casos son ligeramente inferiores. No obstante, la pequeña magnitud de estas diferencias y la mayor contaminación producidas en el proceso al sulfato, entre otros aspectos, han provocado que el pulpeo a la soda sea el más extendido.

Una de las dificultades para usar eficientemente el bagazo de caña de azúcar para la manufactura del papel, es su alto contenido de médula. La pulpa que contiene apreciables cantidades de médula es deficiente en sus características de resistencia, blancura y apariencia.

El desmedulado del bagazo elimina la necesidad de utilizar reactivos extra en la digestión y blanqueo, los cuales podrían disminuir la calidad de la fibra o de los productos que de ahí se obtengan.

La pulpa de bagazo se utiliza prácticamente en todos los tipos de papel, incluyendo los siguientes: papel para bolsas, envoltura, impresión, escritura, papel sanitario, pañuelo facial, toallas, cartulina, corrugado, cartoncillo, cartones blanqueados, base para papeles recubiertos, y en algunas veces para papel periódico (Pacheco, 1988).

Como primer paso en la producción de la pulpa (celulosa), el bagazo de la caña de azúcar que contiene aproximadamente 55% de fibra, es desmedulado hasta obtener un 82-84% de fibra y posteriormente se somete al siguiente tratamiento:

#### DIGESTION

La fibra se cuece con sosa cáustica (licor blanco) a alta temperatura, presión y tiempo, para la obtención de la pulpa café.

El propósito de someter al material fibroso a la cocción es disolver la lignina y otras porciones no celulósicas, para obtener una pulpa de fibras individuales que puedan volver a reunirse formando hojas de papel. El tiempo aproximado de cocción es de 10 a 15 minutos a 160-170°C.

Como resultado de la digestión, queda una mezcla de material fibroso y licor residual o licor negro. Este licor contiene los reactivos usados, una parte del reactivo sin usar, gran cantidad de materia orgánica disuelta del material fibroso alimentado y pequeñas cantidades de otras sales (Pacheco, 1988).

## LAVADO

A la pulpa café se le aplica agua caliente en las regaderas de rocío a contra corriente sobre tambores rotatorios para eliminar la sosa cáustica e impurezas contenidas (licor negro). Una vez lavada la pulpa se diluye y se pasa al área de depurado.

## DEPURADO

La celulosa se limpia para eliminar astillas, fragmentos de fibra mal cocida y materiales extraños que acompañan a la pulpa café que podrían aparecer como manchas en el papel terminado. Para efectuar tal separación se aprovecha la diferencia de tamaño o de gravedad específica de las impurezas con respecto a las fibras en los depuradores centrífugos, o las fuerzas de gravedad en los limpiadores. La separación se lleva a cabo en dos etapas, en la primera se usan coladores presurizados y en la segunda coladores planos vibratorios.

## BLANQUEO

En esta etapa se realiza el cambio de pulpa café a pulpa blanca con base en la aplicación de cloro, sosa e hipoclorito de sodio, controlándose de esta forma la blancura deseada y características físicas.

## LAMINADO

La pulpa blanca se exprime y se prepara para su envío a los compradores.

Durante el proceso, los compuestos químicos son recuperados mediante tres líneas de evaporación que reciben el licor negro del lavado de pulpa para concentrarlo, una caldera de recuperación y un sistema de lecho fluidizado para quemar la materia orgánica, además de una área de caustificación que permite recuperar la sosa (licor blanco), por medio de cal para reincorporarla a los digestores.

## 1.2. METODOS PARA EL BLANQUEO DE LA PULPA

Se entiende como proceso de blanqueo al mejoramiento de color o brillantez de una pulpa. Los objetivos finales que persigue un proceso de blanqueo son seis principalmente:

1. Cambiar de color o tono, sin cambiar en forma sensible la brillantez.
2. Aumentar la brillantez, para que la apariencia sea más agradable.
3. Facilitar la impresión a varios colores, sin que estos pierdan su correcto equilibrio.

4. Eliminar o estabilizar aquellos componentes que tienden a modificar el color, debido a una regresión de brillantez cuando son expuestos a la luz o al calor.

5. Mejorar las propiedades de la pulpa, de acuerdo con su uso final. Estas propiedades pueden ser; aumento de la resistencia, opacidad, volumen, suavidad, adsorbencia, etc.

6. En algunos casos se desea purificar la pulpa durante el proceso, esto se consigue eliminando la lignina, resinas, iones metálicos y compuestos no celulósicos de tipo carbohidrato (Trujillo, 1988).

En general se acepta que la lignina presente en la pulpa es la responsable del color a través de sus grupos cromóforos. Este compuesto contiene una gran cantidad de grupos fenólicos, tanto libres como en forma de ésteres, que durante los procesos oxidativos se convierten en sustancias de tipo quinona, capaces de absorber luz visible. Las resinas y los componentes originales de la madera también contribuyen al color.

Casi la mitad de la pulpa Kraft producida anualmente es blanqueada antes de su uso. Debido a que el proceso de blanqueo es costoso y disminuye el peso de la pulpa, aproximadamente el 10-20% de esta pulpa se vende sin blanquear (Eriksson, 1985).

El blanqueo se realiza mediante procesos que emplean principalmente cloro (un agente oxidante muy barato). La lignina residual es degradada y disuelta en varias etapas de blanqueo y extracción en donde se utiliza cloro, hipoclorito, dióxido de cloro, oxígeno y peróxido de hidrógeno. La secuencia más común es la CEDED (cloración, extracción alcalina, tratamiento con dióxido de cloro, extracción alcalina y tratamiento con dióxido de cloro) que es seguida por lavado para remover los agentes químicos residuales. En la primera etapa, que es la continuación de la deslignificación, se mezcla la pulpa con cloro gaseoso y se deja reaccionar por un espacio de media hora, una vez pasado este tiempo se pasa a la siguiente etapa, en donde se adiciona sosa para realizar la extracción cáustica para eliminar la lignina que no se solubilizó en la cloración. Después de lavada esta pulpa, se adiciona ya sea dióxido de cloro o hipoclorito, que son los agentes blanqueadores que dan la mayor blancura. Una vez terminada la reacción se lava la pulpa y se repite la extracción y cloración para eliminar cualquier color residual.

Los efluentes producidos durante el blanqueo de la pulpa son los contribuyentes mayoritarios de la contaminación de las aguas residuales de la industria de pulpeo, principalmente la primera extracción alcalina ya que ésta contribuye con el 90% del color total presente en los efluentes (Eriksson, 1985).

El uso de cloro como agente de blanqueo inevitablemente conduce a la formación de una gran variedad de compuestos orgánicos clorados en el licor de blanqueo, ya que el cloro reacciona específica y muy eficientemente con la lignina remanente (5-10%) unida a la pulpa. Aproximadamente, el 10% del cloro utilizado durante la primera etapa del blanqueo, se une a la lignina, mientras que el remanente (aproximadamente el 90%) permanece como iones cloruro. Los compuestos clorados son tóxicos, mutagénicos, recalcitrantes, se pueden acumular en

vertebrados, algunos pueden degradarse lentamente hasta compuestos clorados más pequeños que son bioacumulables (Bergbauer, 1992).

Casi el 80% o más de materia orgánica clorada está disuelta en los licores del lavado del blanqueo de la pulpa Kraft y en su mayoría tiene un alto peso molecular (mayor de 1,000 Da), a estos compuestos clorados se les denomina cloroligninas y pueden expresarse como AOX (halógenos orgánicos adsorbibles).

Se han desarrollado otros métodos de blanqueo basados en oxígeno, peróxido u ozono que pueden utilizarse a nivel comercial, pero estos procesos no pueden reemplazar a los basados en cloro porque no son totalmente efectivos. Dichos métodos se desarrollaron para reducir el uso de cloro y los concentrados ambientales asociados, así como para aliviar los problemas de corrosión. El proceso basado en oxígeno produce efluentes que no son corrosivos, lo que permite que éstos sean reciclados. Por el contrario, los efluentes del blanqueo con cloro deben ser tratados, los cuales originan una gran carga en las plantas tratadoras debido a la gran concentración y toxicidad de los compuestos orgánicos clorados.

### 1.3. COMPOSICION QUIMICA DE LOS RESIDUALES DEL BLANQUEO DE LA PULPA

Las propiedades y la composición de las aguas residuales del blanqueo de la pulpa varía dependiendo de la etapa en que se produzcan. En la Tabla II se presentan algunas propiedades y componentes de las dos etapas principales del proceso de blanqueo con cloro.

#### 1.3.1. LIGNINA

La lignina es un polímero aromático tridimensional compuesto por unidades fenilpropano, que se forma por la polimerización deshidrogenativa de los monolignoles: alcohol p-cumarílico, alcohol coniferílico y sinapílico por la peroxidasa. Por lo tanto, en contraste con la celulosa, la lignina contiene varios éteres y enlaces carbono-carbono como son: arilglicerol- $\beta$ -aril éter ( $\beta$ -o-4), fenilcumaran ( $\beta$ -5), bifenilresinol (5-5'), bencil aril éter no cíclico ( $\alpha$ -o-4), 1,2-diarilpropano-1,3-diol ( $\beta$ -1), pinoresinol ( $\beta$ - $\beta'$ ) y el difenil éter (5-o-4). (Takefumi, 1992).

Entre los grupos reactivos que caracterizan a la lignina se encuentran: metoxilos, hidroxilos alifáticos y fenólicos y algunos grupos carbonilos. La lignina es casi totalmente insoluble en ácidos minerales fuertes, sin embargo, es degradada y parcialmente disuelta por álcalis por lo que muchos procesos de la pulpa y el papel remueven la lignina de la celulosa por variaciones de los métodos alcalinos.

En función de la fuente de obtención, la lignina puede dividirse en tres clases.

**Tabla II** Composición y propiedades de los efluentes provenientes de las etapas de cloración y extracción del blanqueo de la pulpa.

EFLUENTE	COMPONENTES MAYORITARIOS	PROPIEDADES
Etapa de cloración	Fenoles, resinas, hidrocarburos y ácidos grasos clorados, cloruro, carbohidratos y sus productos de degradación.	Bajo peso molecular, bajo color, alta DBO, mutagénico, bacteriostático, tóxico.
Etapa de extracción	Lignina clorada y oxidada, hemicelulosa y sus productos de degradación.	Principalmente de tipo polimérico, alto color, alta DBO y DQO.

(Eriksson, 1985).

### 1. Lignina de maderas suaves (gimnosperma).

Esta lignina está formada por el acoplamiento de radicales del alcohol coniferflico, los cuales son producidos por deshidrogenación enzimática de dicho alcohol.

### 2. Lignina de maderas duras (angiospermas).

Este tipo de lignina está formada por el acoplamiento de radicales de los alcoholes coniferflico y sinapflico.

### 3. Lignina de gramíneas.

En este caso, la lignina está formada por el acoplamiento de radicales de los alcoholes coniferflico, sinapflico y cumarflico (Areyzaga y Parada, 1985).

Las cloroligninas que se producen durante el blanqueo de la pulpa son completamente diferentes en su naturaleza a la lignina no clorada. Mediante extensos análisis, se ha demostrado que estas cloroligninas tienen un bajo contenido de compuestos aromáticos, un alto contenido de grupos carbonilos y carboxilos, un bajo contenido de grupos metoxilos e hidroxilos fenólicos y sólo un 10% de cloro por peso (O'Connor y Voss, 1992), también se comprobó que son poliméricas, que contienen fragmentos oxidados y clorados. Estos compuestos pueden aislarse mediante filtración por membrana y una posterior purificación por métodos físicos (Eriksson, 1985).

#### 1.3.2. COMPUESTOS CLORADOS.

Los efluentes del blanqueo de la pulpa que utilizan cloro como agente blanqueador contienen, una gran variedad de compuestos orgánicos clorados, incluyendo dioxinas y furanos. Como se mencionó los compuestos organoclorados se forman a partir de las complejas reacciones del cloro con la lignina y sus unidades de hidrólisis. En la tabla III se muestran los organoclorados producidos en la cloración y extracción alcalina durante el blanqueo de la pulpa.

Entre los clorofenoles se encuentra el 4-clorofenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, 2,3,4,6-tetraclorofenol y el pentaclorofenol. En los cloroguaicoles se tiene al 3,4,6,-tricloroguaiacol, 3,4,6,-tricloroguaiacol, 3,4,5,-tricloroguaiacol, 4,5,6-tricloroguaiacol y al tetracloroguaiacol. En el grupo de los clorobencenos se encuentra el clorobenceno, diclorobenceno, 1,2,4,5-tetraclorobenceno, pentaclorobenceno y el hexaclorobenceno. Todos estos presentes en los residuales del blanqueo de la pulpa.

El pentaclorofenol y el tetraclorofenol utilizados como preservativos de la madera contienen furanos y dioxinas policloradas, además, todos los compuestos contenidos en la Tabla III, constituyen precursores potenciales para la producción de furanos y dioxinas.

Tabla III Compuestos clorados producidos durante el blanqueo de la pulpa.

TIPO DE COMPUESTO	CLORACION (g/ton pulpa)	EXTRACCION (g/ton pulpa)	TOTAL
Clorofenoles	1.6	3.1	4.7
Cloroguaiacoles	2.6	36.1	38.7
Clorocatecoles	34.0	0.6	34.6
Clorobencenos	0.8	-	0.8

(Sarkanen, 1988).

Se han detectado otros compuestos clorados entre los que se encuentran los ácidos dicloroacético, cloromaleico, clorofumárico, vainillínico, mono y diclorobenzoico, cloroacetona, cloropropanos, alcohol clorobencílico, clorobenzaldehído, dicloroacetiltiofeno, diclorodimetil sulfona, etc (Voss, 1983).

Las dibenzodioxinas policloradas (PCDD) y los dibenzofuranos policlorados (PCDF) son altamente persistentes, tiene un alto potencial para acumularse en los tejidos biológicos. Un ejemplo de dioxinas y furanos clorados son el 2,3,7,8-tetracloro dibenzodioxina y el 2,3,7,8-tetracloro dibenzofurano, estos dos compuestos son considerados como los más tóxicos que existen (Sarkanen, 1988). Por lo que su liberación al medio ambiente esta rígidamente regulada, 20 ppq para el primero y 50 ppq para el segundo (Canada-Mexico Training Seminar for Environmental Inspectors, 1993).

#### 1.4. METODOS PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DEL BLÁNQUEO DE LA PULPA

Los tratamientos de aguas de desecho se dividen en varios tipos:

##### 1. Tratamientos preliminares.

Estos incluyen el tamizado y separación de arena, la separación de aceites y la coagulación.

##### 2. Tratamientos primarios.

Estos sirven para separar partículas gruesas suspendidas (orgánicas e inorgánicas), éstos incluyen procesos químicos como la neutralización o adición de compuestos químicos y procesos físicos como la flotación y sedimentación.

### 3. Tratamientos secundarios.

Con este tipo de tratamientos se remueven los compuestos orgánicos disueltos expresados como DBO (demanda biológica de oxígeno) DQO (demanda química de oxígeno), así como la toxicidad mediante oxidación biológica, para lo cual se recurre normalmente a bacterias aerobias o anaerobias. En sus ciclo vital, éstas bacterias consumen la materia orgánica presente en el agua de desecho y producen  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , energía y nuevas células. Se incluyen en este tipo de tratamientos lodos activados, lagunas anaerobias, filtros biológicos, lagunas aireadas, tanques de estabilización y separación de sólidos suspendidos.

### 4. Tratamientos terciarios.

Incluyen coagulación, sedimentación, filtración, adsorción en carbón activado, intercambio iónico, etc.

### 5. Tratamiento de lodos

Estos incluyen la digestión o combustión húmeda, concentración por gravedad, flotación, filtración, centrifugación y secado en lechos (Delgadillo, 1987).

Todos los tratamientos anteriores pueden clasificarse a su vez en métodos fisicoquímicos y métodos biológicos.

#### 1.4.1. METODOS FISICO-QUIMICOS

Actualmente se han desarrollado varios procesos físico-químicos para disminuir el color de los efluentes del blanqueo de la pulpa, como son la coagulación/flotación, la ósmosis inversa, la ultrafiltración, la precipitación masiva con cal, la ozonólisis, la adsorción con carbón activado, el intercambio de iones, irradiación con UV etc. (Livermoche, 1983; Pellinen, 1988; Bergbauer, 1992; Prasad, 1993).

##### 1.4.1.1. COAGULACION QUIMICA

La coagulación es un proceso que ayuda a la reducción de cargas en la superficie y a la formación de óxidos hidratados complejos. La coagulación ocurre casi instantáneamente, sólo se requiere tiempo para la dispersión de los coagulantes químicos a través del líquido.

La función de la coagulación en las aguas residuales es remover los sólidos suspendidos por desestabilización de coloides para aumentar la velocidad de sedimentación del material asentable, o remover los compuestos inorgánicos solubles, como el fósforo, por precipitación o adsorción en un floculo químico.

Los coagulantes inorgánicos comúnmente empleados en la coagulación de aguas de deshecho, son sales de aluminio (sulfato de aluminio), cal o sales de fierro (cloruro férrico). Los coagulantes orgánicos poliméricos se usan también junto con los coagulantes primarios o coagulantes auxiliares. En las plantas tratadoras se emplean polielectrolitos o polímeros como coagulantes primarios o como auxiliares de la floculación. La dosis usual es de aproximadamente 0.10-0.25 mg/l. La adición de polímeros puede remover la turbidez y el fósforo contenido en las aguas (Russell, 1971).

#### 1.4.1.2. FLOCULACION

La floculación involucra la unión de partículas coaguladas para formar sólidos que pueden asentarse o filtrarse por aglomeración. Esta aglomeración es acelerada por agitación del agua para incrementar las colisiones de las partículas coaguladas. A diferencia de la coagulación, la floculación necesita de intervalos de tiempo definidos para completarse. Una de las mayores diferencias es que los periodos de retención para la floculación pueden reducirse sustancialmente cuando se utiliza cal como coagulante (a sólo 5 minutos). Otra diferencia es que el propósito de la adición de agentes químicos en el efluente es frecuentemente para remover los compuestos inorgánicos solubles (fósforo), así como para remover los sólidos coloidales. Comúnmente en las plantas tratadoras se utiliza una velocidad de 0.6 rpm o más y un tiempo de retención de 15-60 min (Russell, 1971).

#### 1.4.1.3. FILTRACION

El propósito de la filtración es el de remover la materia particulada. Antes de seleccionar el proceso de filtración a usar, es necesario determinar adecuadamente, la cantidad de sólidos totales filtrables, la variabilidad de su cantidad, la fracción que será removida y sus características.

Los procesos de filtración pueden clasificarse en dos categorías: filtración de superficie y filtración de profundidad. El primero incluye microseleccionadores, filtros de tierras diatomeas, filtros lentos de arena, filtros rápidos de arena y filtros de lecho móvil. El segundo incluye filtros empacados con materiales de tamaño de gránulo graduado de forma descendente hacia la salida del filtro (Russell, 1971).

#### 1.4.1.4. ADSORCION CON CARBON ACTIVADO

Cuando el carbón activado entra en contacto con agua que contiene materiales orgánicos solubles, remueve selectivamente estos materiales por adsorción. El hecho de que el carbón activado tenga una gran área superficial (del orden de 1,000 m<sup>2</sup>/g), establece que es un material con extremada eficiencia para la adsorción de moléculas.

En el agua el carbón activado tiene preferencia por las moléculas grandes y no polares. La mejor adsorción ocurre cuando los poros del carbón son lo suficientemente grandes para admitir a las moléculas.

Este tipo de tratamiento de se realiza en columnas empacadas con carbón y estas pueden ser de flujo ascendente o descendente (Russell, 1971).

#### 1.4.1.5. INTERCAMBIO IONICO

El intercambio de iones es un método útil para la remoción de iones inorgánicos del agua. Muchos compuestos orgánicos pueden removerse también por este método, pero en ocasiones resulta muy difícil removerlos de algunas resinas.

Este método para el tratamiento de aguas residuales puede remover la DBO, la DQO, el color, fosfatos (remoción del 97% a escala laboratorio y 70% escala piloto), nitrógeno (90% escala piloto) en forma de amoníaco y nitrato, cloro, pero la eficiencia de la resina disminuye cuando hay altas concentraciones de cloro y sulfato.

Las resinas de intercambio iónico pueden ser específicas o inespecíficas. Las resinas de tipo inespecífico tienen poca aplicación industrial, ya que deben remover primero casi todos los otros iones presentes en efluente, para poder eliminar el ión de interés.

Dos ejemplos de intercambiadores iónicos específicos son la clinoptilolita (una zeolita natural), que remueve nitrógeno en forma de amoníaco en presencia de sodio, magnesio y calcio, la alúmina activada remueve fosfato, cromo, flúor, sulfito, nitrito, nitrato, manganato y sulfato (Russell, 1971).

#### 1.4.1.6. OZONOLISIS

Este proceso sirve para reducir el sabor y olor del agua, además, reduce el contenido de bacterias, virus y compuestos orgánicos.

En este proceso se hace pasar aire seco y comprimido a través de dos electrodos de alto potencial para convertir el oxígeno en ozono hasta una concentración de 1% de peso en aire.

La velocidad de reacción del ozono con los compuestos orgánicos y sólidos floculados, depende su la velocidad de descomposición. El orden de reacción para la descomposición del ozono es de segundo a pH 2-4, de 3/2 a segundo a pH 6 y de primero a pH de 8. Se considera como pH óptimo de operación, un rango de 6-7. La vida media del ozono en agua, es de aproximadamente 20 minutos.

La desventaja de este método es que debe hacerse primero una clarificación (por coagulación o filtración) para poder tratar el efluente con ozono, cuando el efluente tiene una DQO arriba de 40 mg/l (Russell, 1971).

#### 1.4.1.7. OSMOSIS INVERSA

Existen diferentes equipos de ósmosis inversa, estos se clasifican como sigue: espirales, módulos tubulares, platos múltiples y fibra hueca.

La ósmosis inversa produce agua libre de sales por el paso de agua a través de membranas semipermeables a alta presión (comúnmente se emplea 600 lb/pulg<sup>2</sup> presión). Las membranas son más permeables al agua pura que las sales disueltas. La presión se aplica del lado concentrado de la membrana hasta que el flujo pasa del sitio concentrado al sitio diluido.

La capacidad limitada de comercializar adecuadamente las unidades y los altos costos de operación, limita la aplicabilidad de la ósmosis inversa en el tratamiento de aguas residuales (Russell, 1971).

Todos estos métodos remueven el material de alto peso molecular, el color, la toxicidad, los sólidos suspendidos y la DQO, sin embargo, no son muy utilizados porque sus costos por unidad de volumen tratado son muy elevados, tienen problemas de acumulación de concentrados y además no eliminan las cloroligninas de bajo peso molecular y la DBO (Joyce, 1984; Pellinen, 1988).

A pesar de lo anterior, algunos países combinan varios métodos físico-químicos para el tratamiento de estas aguas, por ejemplo en Japón, el color presente en el efluente de la etapa de extracción, se remueve por medio de coagulación con carbón activado seguida por flotación con aire o por ultrafiltración y los residuos obtenidos se queman en hornos para recobrar los agentes químicos (Eriksson, 1985).

#### 1.4.2. METODOS BIOLÓGICOS

Los métodos biológicos incluyen sistemas aerobios y sistemas anaerobios, en ambos se lleva a cabo una digestión por acción de microorganismos presentes en forma natural en los desechos. Los productos de descomposición de la materia orgánica no son los mismos, aunque estos varían de acuerdo al tipo de agua residual de que se trate, pueden considerarse en forma general para los sistemas aeróbicos: dióxido de carbono, nitritos, nitratos y sulfatos, mientras que para los sistemas anaerobios: metano, amoníaco, indol, escatol, mercaptano y cadaverina (Delgadillo, 1987).

### **1.4.2.1. SISTEMAS ANAEROBICOS**

La digestión anaerobia es un proceso mediante el cual la materia orgánica es transformada a  $\text{CO}_2$  (30-40%) y metano (60-70%). Este proceso se lleva a cabo en tres etapas, en donde intervienen varios grupos de bacterias.

En la primera etapa se hidrolizan sustancias complejas como polisacáridos (celulosa), produciéndose ácidos orgánicos, alcoholes, hidrógeno y  $\text{CO}_2$ , mediante la participación de bacterias fermentativas anaerobias estrictas o facultativas, quienes también fermentan proteínas y lípidos.

En la segunda etapa intervienen bacterias acetogénicas, las cuales metabolizan los ácidos orgánicos y los alcoholes producidos en la primera etapa, degradándolos hasta acetato, hidrógeno y en ocasiones hasta  $\text{CO}_2$ .

Finalmente, en la tercera etapa se produce metano y  $\text{CO}_2$  por acción de bacterias metanogénicas que utilizan los productos de las dos etapas anteriores principalmente hidrógeno, acetato y  $\text{CO}_2$  (Muñiz, 1987) .

El tratamiento anaerobio se utiliza para tratar diversos tipos de efluentes industriales, lodos municipales y para el aprovechamiento de desechos animales domésticos.

Existen varios sistemas que utilizan la digestión anaerobia para el tratamiento de aguas residuales:

#### **1.4.2.1.1. Tanques sépticos**

Estos son depósitos de decantación de sólidos de las aguas residuales, las cuales se alimentan en el tanque con suficiente lentitud. En estos tanques se efectúan dos procesos, el de sedimentación y el de degradación biológica del sedimento. A medida que las aguas penetran en el tanque, tiene lugar la decantación, lo que permite la descarga de un líquido con menos sólidos suspendidos.

#### **1.4.2.1.2. Digestores**

Son tanques cerrados en donde los procesos de sedimentación y digestión se realizan simultáneamente. Existen, actualmente una gran diversidad de modelos que pretenden minimizar los costos de inversión, el tiempo de retención hidráulico, aumentar la eficiencia de remoción de materia orgánica, además, de optimizar la producción de metano como fuente de energía.

#### **1.4.2.1.3. Lagunas**

Las lagunas anaerobias son estructuras construidas dentro de la tierra, diseñadas y operadas para almacenar y tratar desechos y aguas residuales con el propósito de remover,

destruir y estabilizar la materia orgánica y no la purificación total de aguas.

Este tipo de sistemas presentan varias ventajas que los hacen uno de los más utilizados para el tratamiento de desechos. Entre estas ventajas se encuentran; su bajo costo de inversión, su fácil operación y su bajo nivel de atención, sin requerir por lo tanto de personal calificado, su diseño relativamente simple, su baja producción de lodos biológicos que deben tratarse posteriormente, su valiosa bioproducción de metano, que sirve como combustible para el mismo proceso, además de que su operación se efectúa con altas concentraciones de materia orgánica en comparación con los tratamientos aerobios y la utilización del metano producido durante el proceso.

No obstante las ventajas que posee este tipo de sistemas, existen limitaciones para su uso ya que el grado de tratamiento del efluente final no es definitivo, esto es, que requiere de un tratamiento posterior, generalmente del tipo aerobio o facultativo, además, emiten malos olores requiere un largo tiempo para arrancarla, existe poco conocimiento acerca de los microorganismos involucrados y no hay una buena disponibilidad de terrenos baratos (Muñiz, 1987), además, la mayoría de los estudios con procesos anaeróbicos se han dirigido al tratamiento de aguas residuales provenientes del pulpeo mecánico o semiquímico y de la manufactura del papel (Pellinen, 1988).

Son pocos los estudios para el tratamiento de los efluentes del blanqueo de pulpa Kraft, entre estos se encuentra a Nielson y colaboradores (1990) quienes lograron biodegradar cantidades sustanciales de compuestos clorofenólicos mediante procesos anaeróbicos, por otro lado Gunnarsson y colaboradores (1989), lograron disminuir la DQO en un 60% y la DBO en un 90% con una alta producción de metano, aunque la reducción de halógenos orgánicos adsorbibles (AOX) fue muy limitada, pero esto puede solucionarse con un tratamiento aeróbico paralelo (Prasad y Joyce, 1993).

En el caso de México, Poggi y col. (1989) han desarrollado procesos anaeróbicos para el tratamiento de los condensados de Kraft (diluidos y enriquecidos) y han obtenido remociones de la carga orgánica del orden del 75%. Sin embargo, deben hacerse todavía algunos análisis de costos para determinar las ventajas o desventajas económicas y la factibilidad del proceso.

#### 1.4.2.2. SISTEMAS AEROBICOS

El método más eficiente para la reducción de compuestos orgánicos contenidos en los desechos líquidos diluidos es el tratamiento biológico aerobio. En este se remueve la materia orgánica soluble mediante oxidación biológica o por conversión a material celular. Los microorganismos que intervienen, poseen la capacidad de descomponer compuestos orgánicos complejos (carbohidratos, proteínas, lípidos) y de esta manera utilizan la energía liberada para sus funciones biológicas: reproducción, crecimiento, locomoción, etc. La materia orgánica, entonces, es convertida a CO<sub>2</sub>, agua y amonio.

El oxígeno debe proporcionarse continuamente durante el proceso, ya que este actúa como el aceptor final de hidrógeno para la oxidación de la materia orgánica y se utiliza para la síntesis y supervivencia de las células.

Las lagunas aireadas, los lodos activados y los tanques aireados de estabilización, son ejemplos del tratamiento aeróbico de efluentes de las plantas papeleras. El aire se hace pasar por medio de aireación mecánica o difusiva. El tiempo de retención de los efluentes, es usualmente de 5-10 días, sin embargo, algunos sistemas retienen hasta 15 días las aguas a tratar.

Los residuales del pulpeo no contienen todos los nutrientes requeridos para un eficiente crecimiento microbiano, por ello, estos nutrientes deben ser adicionados.

La remoción de DBO por una laguna es de aproximadamente 70-85%. Pero esta remoción depende grandemente de la temperatura del agua residual. La temperatura considerada como óptima es de 40°C

Desafortunadamente, se ha visto que las lagunas aireadas y los lodos activados, no remueven eficientemente las cloroligninas de alto peso molecular, la reducción de la DQO y DBO es muy baja y la decoloración no es significativa (Prasad y Joyce, 1993; Pellinen, 1988), Además, la eficiencia de estos métodos depende de la temperatura ambiental y la intensidad del color de las aguas residuales. Por ello es importante optar por otros métodos para el tratamiento de los efluentes.

En una búsqueda por encontrar otras alternativas para el tratamiento de los efluentes que genera la industria del pulpeo, se ha descubierto la gran capacidad de los hongos ligninolíticos para decolorar y degradar los compuestos cromóforos contenidos en estos residuales. Se ha reportado que los hongos de la pudrición blanca, *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor* son los microorganismos más efectivos en la degradación de cloroligninas ya que poseen un poderoso sistema enzimático (Bergbauer, 1992).

Además de la gran capacidad degradativa del sistema enzimático de *P. chrysosporium*, este microorganismo posee características que lo convierten en una cepa muy conveniente para su utilización, entre estas características se encuentran las siguientes:

1. Produce un gran número de esporas, lo que facilita su manejo.
2. Su temperatura óptima de crecimiento es de 39-40°C, lo cual junto con su pH óptimo de 4.5-5.0 elimina fácilmente riesgos de contaminación.
3. Su crecimiento es rápido comparado con otros hongos de la pudrición blanca y café.
4. Degrada la lignina tan rápidamente o más que otros hongos de la pudrición blanca.

El sistema enzimático de *P. chrysosporium* incluye un grupo de enzimas extracelulares no específicas (lignina peroxidasa), que catalizan no sólo la degradación de la lignina y cloroligninas en los efluentes del blanqueo de la pulpa (Sudman y col. 1981; Chang, 1987), sino también la oxidación de varios compuestos aromáticos (fenoles aromáticos como el 2,4,6-triclorofenol, 6-clorovainillina, el tri y tetra-cloroguaiacol y compuestos análogos persistentes como el diclorodifeniltricloroacético (DDT), policlorobifenilos (PCB) y benzopireno (Bumpus, 1985; Haemmerli, 1985; Chang, 1983 y Hunh, 1985).

En 1980 Eaton y col. reportaron que *P. chrysosporium* inoculado en reactores de capa produjo una decoloración del 80% y en matraces agitados la decoloración fue del 60% en 4 días. Posteriormente Livemoché y col. (1983) reportaron una decoloración del 60% después de cuatro días de incubación, sin embargo, después de este tiempo el color tendió a aumentar, atribuyendo estos cambios al acumulamiento de metabolitos fúngicos en el medio de cultivo. Por su parte, Galeno y Agosin (1990) obtuvieron una decoloración del 90% después de 8 días cuando el hongo creció bajo una atmósfera de oxígeno del 100%, mientras que cuando creció bajo aire, sólo se removió el 70% del color después del mismo tiempo.

Debido a los resultados positivos obtenidos con los hongos de la pudrición blanca para el tratamiento de los efluentes del pulpeo, se han hecho muchas investigaciones con el fin de obtener un proceso eficiente y que pueda ser escalable.

Como resultado de la investigación conjunta entre el U.S. Forest Products Laboratory (FLP) y North Carolina State University (FPL), se desarrolló el proceso llamado MyCoR (Mycelial Color Removal) por Eaton y Campell (1982). Este proceso, utiliza al hongo *Phanerochaete chrysosporium* en un contactor biológico rotatorio (RBC). La unidad a escala laboratorio tiene una capacidad de 2.5 litros, contiene 8 discos rotatorios parcialmente sumergidos (40%), que giran a una velocidad de 1 rpm, la cabeza está enriquecida con oxígeno. El RBC es muy útil para el crecimiento de *P. chrysosporium* ya que proporciona un sólido soporte para el hongo y una gran área para una eficiente aireación (Eriksson, 1985).

Una película fija del MyCoR se carga con nutrientes ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{NaMoO}_4$ , tiamina y glucosa) y se inocula con el hongo. Después de que el micelio ha crecido sobre la superficie del reactor y que se inicia la actividad ligninolítica (un crecimiento de aproximadamente 2-4 días), el reactor está listo para su uso. El pH óptimo para este proceso es de 4.5, la temperatura de 28-40°C y un 80-100% de oxígeno (Eaton y col., 1980). El micelio puede usarse por 35 días para decolorar una mezcla de los efluentes de la etapa cáustica (C) y de extracción ( $E_1$ , 35/65 v/v).

El proceso MyCoR reduce eficientemente la cantidad de compuestos tóxicos de bajo peso molecular presentes en el efluente. Por ejemplo, la concentración del 2,4,6-triclorofenol se reduce de 0.15-0.33 ppm. a menos de 0.01 durante un día de tratamiento (Hunh y col., 1988). Otros clorofenoles que también se eliminan son el ácido diclorobenzoico, la 5- y 6-clorovainillina, el tetracloroguaiacol, el 4,5-dicloroguaiacol y el 4,5,6-tricloroguaiacol, aunque

no todos se degradan. El color del efluente (de la etapa E<sub>1</sub> del pulpeo Kraft diluido hasta una concentración del 89%) se reduce hasta un 76% y la DQO en un 14%, después de 4 días de cultivo, partiendo de un color inicial de 22,000 unidades de color (Pellinen, 1988). La remoción de cloro orgánico total (TOCl) ha sido del 62%, 49% y 45% por día para la fracción de bajo peso molecular, alto peso molecular y efluente no fraccionado respectivamente (Matsumoto y col., 1985).

El hongo decolora el efluente destruyendo los grupos cromóforos y degradando las cloroligninas de alto y bajo peso molecular metabolizándolos hasta CO<sub>2</sub>, agua y iones cloro (Sundman, 1981).

Aunque el proceso MyCoR es muy eficiente para remover el color y los compuestos clorados del efluente de blanqueo, tiene ciertas limitaciones. Uno de los problemas es que tiene un corto tiempo de actividad, relativamente, el reactor debe ser limpiado y reinoculado cada 3 o 4 semanas si se tratan efluentes concentrados. Para efluentes diluidos, el tiempo de uso, es mucho más largo, pero la economía del proceso no es muy favorable debido a que el volumen en el reactor debe aumentarse.

La adición de minerales necesarios para una máxima eficiencia constituye un factor de costo, sin embargo, muchos de estos minerales se encuentran naturalmente en las aguas residuales y esto posiblemente reduce el número y la cantidad de minerales lo que brinda economía al proceso. Además, se pueden utilizar los restos de otras fermentaciones o micelio muerto como fuente de carbono.

El ajuste del pH puede ser un problema, ya que se necesita una gran cantidad de ácido para ajustarlo a 4.5. Se pueden emplear corrientes ácidas, pero esto disminuye la concentración y por lo tanto, también la eficiencia del proceso. Por lo que es necesario realizar más experimentos para resolver este problema. (Pellinen y Joyce, 1988).

El mejor uso que se le puede dar al MyCoR probablemente sea el tratar efluentes muy concentrados y utilizar técnicas convencionales para el tratamiento final del efluente total.

En un estudio reciente (Prasad y Joyce 1993) donde se compararon los diferentes métodos para el tratamiento de los efluentes de la etapa E<sub>1</sub> del proceso Kraft (lagunas aireadas, el proceso MyCoR y la digestión anaróbica, se encontró que el proceso MyCoR reduce más eficientemente el color (65% en dos días), la DBO y DQO (45 y 55% respectivamente), los compuestos orgánicos adsorbibles "AOX" (42%) que los otros dos procesos, en donde el color no cambio apreciablemente y la pequeña reducción de la DQO que se presenta en ambos (lagunas aireadas y digestión anaerobia), indica que una cantidad sustancial de materia orgánica no puede ser degradada por las bacterias aerobias y anaerobias, que se intoxican con las cloroligninas.

Debido su largo tiempo de retención de (20 días), el tratamiento anaerobio no es económico, por lo que deben hacerse estudios posteriores para optimizar este proceso, por lo que hasta ahora el proceso MyCoR, parece tener ventajas sobre los demás.

Por lo anterior, Prasad y Joyce (1993) proponen un tratamiento secuencial, en donde se disminuyan primero las cloroligninas mediante el tratamiento con *P. chrysosporium* en el RCB para después tratar estos efluentes en un digestor anaerobio.

## 1.5. MICROORGANISMOS LIGNINOLITICOS

La lignina es marcadamente resistente a la degradación por la mayoría de los microorganismos presentes en la naturaleza, no obstante existe un pequeño grupo de microorganismos capaces de catalizar su oxidación (Tien y Kirk, 1986); entre estos se tienen a algunos actinomicetos, hongos imperfectos, ascomicetos, basidiomicetos y algunas bacterias (Hattori, 1992). De los tres grupos de microorganismos saprófitos que generalmente se consideran (hongos, actinomicetos -bacterias filamentosas- y eubacterias) solamente los hongos juegan un papel importante en la degradación de la lignina en ambientes naturales, aunque se ha demostrado cierta actividad ligninolítica en algunas especies de los géneros *Streptomyces* (un actinomiceto), *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus* (bacterias no filamentosas) y algunas eubacterias como *Nocardia*, pero esta es poco relevante (Crawford, 1980).

En base al tipo de daño que ocasionan en las plantas, los hongos ligninolíticos se clasifican como: hongos de la pudrición blanca, hongos de la pudrición café y hongos de la pudrición suave (Hattori, 1992).

### 1.5.1. HONGOS DE LA PUDRICION BLANCA

Los hongos de la pudrición blanca son un grupo de organismos bastante heterogéneo, que tienen en común la capacidad para degradar a la lignina así como a otros componentes de los árboles. Ellos también tienen en común la capacidad de producir enzimas extracelulares que oxidan compuestos fenólicos incluyendo todos aquellos relacionados a la lignina. La cantidad relativa de lignina y polisacáridos degradados y utilizados por estos hongos varía así como el orden de ataque preferencial.

Normalmente los hongos de la pudrición blanca atacan simultáneamente a la lignina y a la celulosa y existen evidencias de que la energía que requieren estos organismos para degradar a la lignina, es obtenida a partir de varias fuentes de energía accesible, tales como los polisacáridos y azúcares de bajo peso molecular (Ander y Eriksson, 1975).

Los hongos de la pudrición blanca son los mejores degradadores de la lignina y son los más estudiados por su habilidad para descomponer la lignina de los árboles en un 70% hasta  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . Estos tienen una gran importancia en el ciclo de carbono de la lignina en la naturaleza.

A pesar de que estos microorganismos pueden actuar de manera individual, los hongos de la pudrición blanca pueden actuar sinérgicamente con los hongos de la pudrición café u otros

hongos de la pudrición blanca para degradar a la lignina (Kirk, 1980).

De todos estos hongos, sólo un pequeño porcentaje ha sido estudiado y entre estos se tienen a:

<i>Bjerkandera adusta</i>	<i>Lenzites betulina</i>
<i>Corioliolus hirsutus</i>	<i>Lenzinula edodes</i>
<i>Corioliolus versicolor</i>	<i>Merulius tremellosus</i>
<i>Corioloopsis polyzona</i>	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
<i>Chrysosporium prunosum</i>	<i>Phlebia radiata</i>
<i>Dichomitus aequalens</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i>
<i>Favolus arcularius</i>	<i>Poria subacida</i>
<i>Flammulina velutipes</i>	<i>Polyporus abietinus</i>
<i>Fomes lignosus</i>	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>
<i>Ganoderma valentinum</i>	<i>Pycnoporus coccineus</i>
<i>Grifola frondosa</i>	<i>Stereum hirsutum</i>
<i>Hymenochaete tabacina</i>	<i>Trametes cingulata</i>
<i>Hirschloporus abietinus</i>	<i>Trametes gibbosa</i>
<i>Irpex lacteus</i>	

(Kirk, 1980; Walder, 1988; Enoki, 1988; Kantelinen, 1988; Nerud, 1991)

### 1.5.2. HONGOS DE LA PUDRICION CAFE

Los hongos de la pudrición café son usualmente definidos como aquellos hongos que descomponen la holocelulosa (celulosa y hemicelulosa) en la madera y causan una ligera alteración en la lignina, liberando un residuo de lignina modificada que es típicamente café oscuro y casi igual en peso al de la lignina original en la madera (Kirk, 1980; Enoki, 1988). Esta lignina modificada queda naturalmente disponible y puede servir como una fuente polimérica para usos industriales (Eriksson, 1985; Enoki, 1988; Jin, 1990)

Algunos de los hongos de la pudrición café estudiados hasta ahora son los siguientes:

<i>Daedalea dickinsii</i>	<i>Pholiota adiposa</i>
<i>Fistulina hepatica</i>	<i>Poria monticola</i>
<i>Fomitopsis pinicola</i>	<i>Poria cocos</i>
<i>Gloeophyllum saepiarium</i>	<i>Polyporus sulphureus</i>
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	<i>Serpula lacrymans</i>
<i>Laetiporus sulphureus</i>	<i>Spongiporus sinuatus</i>
<i>Lenzites lepideus</i>	<i>Tyromyces palustris</i>
<i>Lenzites trabea</i>	

Los hongos de la pudrición blanca y los hongos de la pudrición café son taxonómicamente muy similares, ambos son basidiomicetes, y algunos géneros como *Poria* y *Merulius* tienen representantes de ambos grupos de hongos de pudrición (Crawford, 1981).

Los hongos de la pudrición blanca y los de la pudrición café son los dos más efectivos destructores de la madera dentro de la clase de los basidiomicetos (Jin, 1990), sin embargo, las investigaciones en la modificación de la lignina por los hongos de la pudrición café han recibido poca atención comparada con la que reciben los hongos de la pudrición blanca. Una razón de esto, es que los hongos de la pudrición blanca atacan rápidamente la lignina, causando una despolimerización extensa. De esta manera una aplicación potencial obvia de la degradación de la lignina por los hongos de la pudrición blanca es el biopulpeo.

### 1.5.3. HONGOS DE LA PUDRICION SUAVE

El término pudrición suave se refiere al ablandamiento que ocurre en la capa superficial cuando el árbol es atacado por este grupo de hongos. Aunque los hongos de la pudrición suave degradan lentamente la lignina esta degradación es incompleta, pues no tienen la capacidad enzimática para atacar toda la variedad de elementos estructurales de la lignina, quienes son liberados como productos solubles en agua, por lo que puede decirse que estos microorganismos son mejores degradadores de los polisacáridos de la madera que de la lignina.

Los hongos de la pudrición suave pertenecen al grupo de los ascomicetos o de los hongos imperfectos (Eriksson, 1985), algunos de estos hongos son: *Chaetomium globosum*, *C. griphium*, *C. manodicrys*, *C. paecilomyces*, *Thielavia*, *Allescheria sp*, *Prussia*, *Populospora* y *Stachybotrys* (Kirk, 1980; Villanueva, 1987).

### 1.5.4. UTILIDAD DE LOS HONGOS LIGNINOLITICOS

Los hongos que tienen la capacidad de remover la lignina y la celulosa a partir de la madera, son de gran interés en los procesos de bioconversión (Enoki, 1988). Los hongos de la pudrición y algunos basidiomicetos relacionados son los microorganismos terrestres más eficientes, capaces de utilizar todos los polímeros de los residuos lignocelulósicos, que no están disponibles para el crecimiento de los hongos cuando están en forma de macromoléculas. (Wood, 1986).

Algunas de las posibles aplicaciones de los sistemas ligninolíticos incluyen:

#### A. Deslignificación microbiana.

Esta puede emplearse para la producción de pulpa, alimentos para destino animal (libres de lignina, lo que aumenta la digestibilidad de la celulosa), y sustratos para otros procesos microbianos o enzimáticos, para el mejoramiento de los procesos de pulpeo mecánicos y otros con altos rendimientos, para el mejoramiento de alimentos vegetales, etc.

## B. Blanqueo microbiano de pulpas.

Este ahorra energía y reactivos químicos y mejora las propiedades de la pulpa en adición a la brillantez obtenida.

## C. Tratamiento microbiano de efluentes residuales que contienen derivados de la lignina.

Se pueden eliminar ligninsulfonatos y derivados de la lignina provenientes de los efluentes del blanqueo de las pulpas. Esto mejora el tratamiento biológico incluyendo la reducción de color y de espuma.

## D. Conversión de lignina a productos químicos de utilidad.

Esta es una atractiva posibilidad que, sin embargo, depende de un adecuado conocimiento de los productos químicos que pueden obtenerse durante la biodegradación de la lignina por varios microorganismos (Kirk, 1980).

E. Conversión de residuos agrícolas y forestales (paja y bagazo) a alimento para animales, liberación de azúcar a partir de polisacáridos para la producción de etanol, así como en la producción de enzimas.

Para poder considerar todas las aplicaciones potenciales antes mencionadas, se debe tener conocimiento acerca de las reacciones químicas que se llevan a cabo, la estabilidad, los cofactores requeridos para que el sistema ligninolítico catalice estas reacciones, los factores que limitan la velocidad de las reacciones, las posibilidades de aislar a los mejores microorganismos y genéticamente mejorar a los ya existentes, así como, establecer las técnicas para producir óptimamente inóculos o enzimas ligninolíticos (Kirk, 1980).

El potencial para el blanqueo biológico fue reconocido cuando se descubrió que la lignina Kraft es degradada por los hongos de la pudrición blanca. Estos hongos reducen las quinonas a sus correspondientes fenoles y por ello, posiblemente, causan el blanqueo en parte por la acción de las enzimas celobiosa quinona oxidoreductasas y NAD(P)H-quinona oxidoreductasas (Buswell y col., 1979). Algunos experimentos exploratorios con varios hongos de la pudrición blanca han tenido resultados similares pero *Phanerochaete chrysosporium* ha resultado ser el más rápido (Eriksson, 1986).

Uno de los problemas de la deslignificación biológica es que el hongo requiere un sustrato para soportar el metabolismo de la lignina, y que algunos hongos degradan la lignina y la celulosa con la misma velocidad y en un grado similar. Este problema pueden solucionarse si se selecciona un hongo que ataque preferentemente a la lignina o que no tenga actividad celulolítica. (Johnsrud, 1986) o en un momento dado, pueden utilizarse las enzimas aisladas de estos hongos para un blanqueo más controlado (Eriksson, 1985).

Los procesos biológicos son muy atractivos debido a que tienen una o más ventajas sobre los procesos químicos:

1. Tienen una gran eficiencia
2. Son altamente específicos
3. Presentan una gran oportunidad para nuevas transformaciones
4. Presentan una baja contaminación
5. Consumen menor energía
6. No requieren de reactivos tóxicos o nocivos

### 1.5.5. ENZIMAS LIGNINOLITICAS

Se han involucrado cuatro enzimas extracelulares en la degradación de la lignina (tabla IV), estas son: la ligninasa, lacasa, manganeso peroxidasa y otras enzimas productoras de peróxido de hidrógeno. La ligninasa es, probablemente, la mejor enzima, la cual cataliza la oxidación extensiva de las unidades fenólicas y no fenólicas en la lignina, mientras que la lacasa y la manganeso peroxidasa oxidan únicamente las unidades fenólicas de la lignina (Kirk T.K., 1988). Se ha demostrado mediante estudios inmunocitoquímicos, que parte de estas enzimas se localizan en la superficie de las hifas y parte son excretadas al medio (Kurek y Odier, 1990).

La función principal de estas enzimas extracelulares en los hongos, es la de proporcionar nutrientes asimilables para el crecimiento del hongo y este es probablemente su papel principal. Otro papel posible, pero que no ha sido bien estudiado, es que constituyen un sistema de defensa antimicrobiano por la formación de radicales libres (Wood D.A. et al., 1988)

#### 1.5.5.1. LIGNINA PEROXIDASA

En 1983, dos grupos de investigadores (Tien y Kirk, 1983; Glenn y col., 1983) anunciaron el descubrimiento de una enzima inespecífica, extracelular  $H_2O_2$ -dependiente, en el basidiomicete *Phanerochaete chrysosporium*, que interviene en varias reacciones de degradación de varios compuestos incluyendo la lignina metilada. La enzima cataliza una gran variedad de oxidaciones (mostradas en la Figura 1), con peróxido de hidrógeno como el aceptor de electrones: (i) la ruptura de los enlaces C $\alpha$ -C $\beta$  de los modelos  $\beta$ -1 y  $\beta$ -4; (ii) oxidación de alcoholes bencílicos; (iii) oxidación de fenoles hasta radicales copulantes; (iv) hidroxilación de ciertos grupos bencil metileno; (v) ruptura del intradiol de las estructuras fenilglicol e (vi) hidroxilación de C $\alpha$  y C $\beta$  del enlace olifínico C $\alpha$ -C $\beta$  en las estructuras esteril para producir los correspondientes fenilglicoles (Tien y Kirk, 1984). También degrada bifenilos policlorados, clorofenólicos (que son reducidos, metilados al mismo tiempo que se abre oxidativamente el anillo) y benzo(a)pireno (Eaton, 1985; Haemmerli, 1986).

Tabla IV Enzimas implicadas en la degradación de la lignina.

ENZIMA	COFACTORES/SUSTRATOS	REACCIONES
Ligninasa	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Oxidación de aromáticos nucleicos hasta radicales catiónicos.
Lacasa	O <sub>2</sub>	Oxidación de fenoles a radicales fenoxilos.
Mn peroxidasa	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Mn <sup>II</sup>	Oxidación de Mn <sup>II</sup> Mn <sup>III</sup> el cual oxida los fenoles a radicales fenoxilos.
Enzimas productoras de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Varios sustratos orgánicos	Reducción de O <sub>2</sub> a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

(Kirk, 1988).

Se ha sugerido que la enzima fenol oxidasa juega de alguna manera un papel regulatorio importante.

La lignina peroxidasa es una glicoproteína (20% de carbohidratos), que presenta en su estructura dos monosacáridos; manosa y N-acetilglucosamina y un oligosacárido, los cuales se determinaron por cromatografía de gases, además, contiene cadenas glicosídicas unidas a oxígeno y nitrógeno (Schmidt, 1990). Presenta también un grupo heme porfirín, por lo que se trata de una hemoproteína. Los estudios de absorción atómica, indican que la enzima contiene hierro ( $1.02 \pm 0.02$  átomos por molécula de enzima) y que no contiene cobre, zinc, manganeso, molibdato o cobalto (Tien y Kirk, 1984). La enzima tiene una masa molecular de 41,000-42,000 Da. Es una oxidasa, ya que requiere del peróxido de hidrógeno, el cual oxida al ión hierro para aumentar el estado de oxidación en el cual la enzima es capaz de oxidar a la lignina y a sus compuestos relacionados (Tien, 1987).

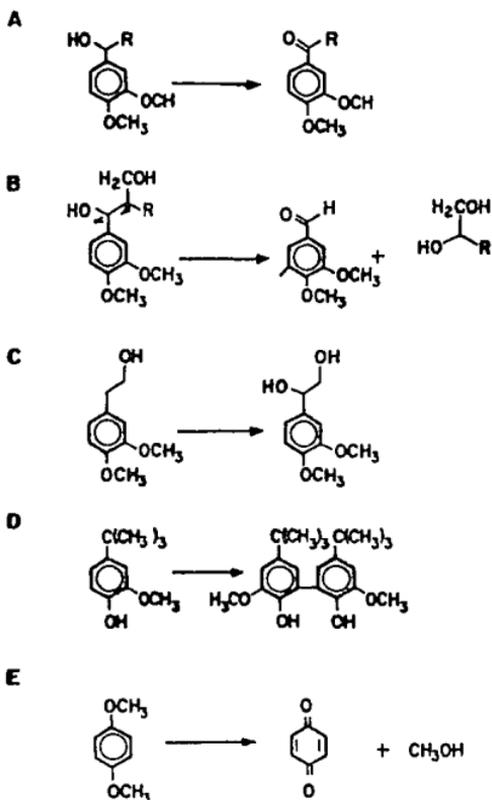
La lignina peroxidasa existe en varias formas isozímicas (identificadas en base a sus puntos isoelectrónicos, Tabla V) que son colectivamente llamadas ligninasa. Tanto la cepa como las condiciones de crecimiento alteran el balance y la naturaleza de las diferentes isozimas. Estas isozimas son altamente homólogas en estructura y función (como lo indica el mapeo de sus péptidos) pero tienen diferentes propiedades cinéticas (Glumoff y col., 1990), sus pesos moleculares son muy cercanos entre sí (Tabla VI). El espectro de absorción a 409 nm sugieren

Tabla V Puntos isoeléctricos de las isozimas de la ligninasa.

ISOZIMAS	pI
H10	3.3
H8	3.5
H7	3.6
H6	3.7
H2	4.4
H1	4.7

pI = Punto isoeléctrico

(Kirk, 1990)



**Figura 1.** Reacciones catalizadas por la ligninasa.

A: oxidación de alcoholes benéficos, B: ruptura del enlace  $\alpha$ -C-C, C: hidroxilación, D: dimerización o polimerización, E: desmetilación. (Tien, 1987)

Tabla VI Propiedades físicas de las isozimas de la ligninasa.

ISOZIMA	PESO MOLECULAR	CARBOHIDRATOS	$\epsilon_{409}$ mmM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	HOMOLOGIA EN PEPTIDOS
H1	38,000	+	169	H2(++);H7, H8(+)
H2	38,000	+	165	H1(++);H7, H8(+)
H6	43,000	+	162	H10(+);H7, H8(+)
H7	42,000	+	177	H8(++);H1, H2(+)
H8	42,000	+	168	H7(++);H1, H2(+)
H10	46,000	+	186	H6(+);H7, H8(+)

Tien M., 1987.

que todas son hemoproteínas.

La lignina peroxidasa es más activa pero inestable a pH menor de 3. Esta enzima es completamente estable a pH de alrededor de 4.5 a una temperatura de 37°C por un mínimo de cinco días.

El peróxido de hidrógeno inhibe de manera competitiva a la ligninasa cuando está presente alcohol veratrílico a una concentración 2 mM y cuando no está presente algún sustrato reducible, la inhibición es de tipo irreversible.

Algunos compuestos que típicamente compiten con el  $H_2O_2$  son el fluoruro y la azida, la inhibición por el flúor es competitiva con respecto al  $H_2O_2$ , en cambio la inhibición de la azida es no competitiva pero irreversible con respecto al  $H_2O_2$ . Otros inhibidores no competitivos son el alfa-ceto-aril-metil-butírico (KTBA), el EDTA, la tiourea y el cianuro de potasio (Tien M., 1987).

Además, de un exceso de nitrógeno, el sistema ligninolítico es suprimido también, por la ciclohexamina (inhibe la síntesis de proteínas y la actividad enzimática cuando se adiciona a cultivos de 2-3 días), glutamato, glutamina, histidina y ciclohexamina (Keyser, 1978; Jeffries, 1981; Fenn, 1981).

De las diferentes isozimas, la H8 es la que se encuentra en mayor proporción.

#### 1.5.5.2. MANGANESO PEROXIDASA

Tien y Kirk (1984); Kuwahara (1984) descubrieron otro tipo de enzima peroxidasa producida por *Phanerochaete chrysosporium*. Esta peroxidasa, que usualmente es llamada Manganese peroxidasa o Mn-peroxidasa, requiere de iones  $Mn^{2+}$  para su actividad y no oxida al alcohol veratrílico. Esta enzima oxida al  $Mn^{2+}$  a  $Mn^{3+}$ , el cual es capaz a su vez de oxidar varios sustratos entre ellos fenoles de bajo peso molecular, formando radicales fenoxi; ditiotreitól (DTT) y ácido dihidroximaléico. También, se sabe que cataliza reacciones adicionales que incluyen oxidaciones que requieren moléculas de peróxido de hidrógeno para poder reducir el glutionato, DHM, GSH y NADPH (Paszczynski, 1986). Durante su acción produce peróxido de hidrógeno, ya que los protones y electrones removidos del sustrato oxidado son aceptados por el oxígeno.

La enzima tiene un peso molecular de 46,000 Da. También es una hemoproteína. Se ha encontrado, que esta enzima contiene 17 % de carbohidratos neutrales y una alta proporción de aminoácidos ácidos especialmente ácido aspártico y ácido glutámico (Paszczynski, 1986; Kirk T.K., 1988).

La manganese peroxidasa también existe en varias formas isozímica, Paszczynski (1986) aisló a la Mn2 y determinó su peso molecular, siendo este de 47,000 Da, posteriormente, Kirk,

y col. (1987), aislaron 4 isozimas que denominaron H3, H4, H5, H9.

Más recientemente, Linko (1992) descubrió y caracterizó otras dos isozimas: Mn1 pI 4.95, 43,000 Da y Mn3 pI 4.60, 46,000 Da.

La manganeso peroxidasa es inhibida por algunos iones metálicos como son:  $Fe^{3+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  y  $Cu^{2+}$ ; estos metales inhiben a la enzima entre un 37-77%. Otro inhibidor es el ácido ascórbico quien inhibe a la manganesa en un 100% (Paszczynski, 1986).

Se ha visto que la manganeso peroxidasa es sintetizada por los hongos antes que la lignina peroxidasa, Sin embargo, la mayoría de las reacciones degradativas de la lignina es debida a la lignin peroxidasa, según estudios realizados por Kurek y Odier (1990).

### 1.5.5.3. LACASA

Muchos hongos de la pudrición blanca producen lacasa extracelularmente. Esta enzima (que contiene cobre) cataliza la oxidación, vía un electrón, de fenoles a radicales fenoxi, transfiriendo cuatro electrones al oxígeno.

*Phanerochaete chrysosporium* se encuentra entre la minoría de los hongos de la pudrición blanca que no producen lacasa extracelular, sin embargo, no requieren esta enzima para el rompimiento de la lignina (Kirk, 1988). Nerud y col. (1991) encontraron siete hongos de la pudrición blanca que producen lacasa, estos son: *Cortiolepis polyzona*, *Dichomitus squalens*, *Ganoderma valesiacum*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Stereum hirsutum*, *Trametes gibbosa* y *Trametes hirsuta*.

Entre las consecuencias de la oxidación de los fenoles relacionados con la lignina está la oxidación del  $C\alpha$ , la limitada desmetoxilación y la ruptura del enlace aril- $C\alpha$ . Algunos estudios han mostrado que la lacasa puede romper los enlaces  $C\alpha$ - $C\beta$  en ciertas estructuras fenólicas. Sin embargo, la copulación/polimerización son las mayores consecuencias de la oxidación de la lignina y los fenoles relacionados a esta.

### 1.5.6. MECANISMOS DE ACCION

Para lograr un mejor entendimiento sobre el mecanismo de degradación de la lignina, se ha recurrido al uso de compuestos estructuralmente parecidos a la lignina. Dos de estos modelos son aquellos que tienen enlaces  $\beta$ -O-4 y  $\beta$ -1, Figura 2. Durante el metabolismo de estos compuestos ocurre la ruptura del enlace  $C\alpha$ - $C\beta$  y la oxidación del  $C\alpha$ , que son reacciones análogas a las que se presentan en el metabolismo de la lignina (Kirk T.K., 1987).

Tien (1986) ha estudiado detalladamente la oxidación del alcohol veratrílico por la ligninasa, él demostró que el peróxido de hidrógeno reacciona primero con la enzima y entonces, la enzima oxidada reacciona con el alcohol veratrílico. Este último es oxidado rápidamente vía

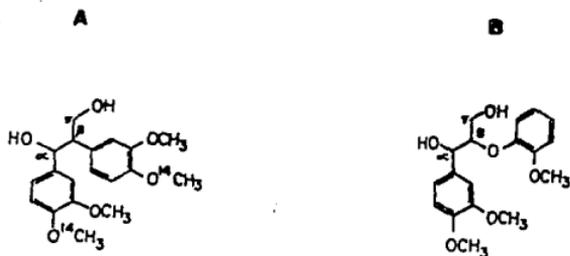


Figura 2. Compuestos modelo con enlaces  $\beta$ -1(A) y  $\beta$ -O-4 (B).

un electrón.

El alcohol veratrílico es un metabolito secundario de *P. chrysosporium* y otros hongos de la pudrición blanca, que aparece al mismo tiempo que la ligninasa (representa el 60% de los compuestos orgánicos solubles acumulados en el medio de cultivo). Este compuesto es sintetizado por el hongo a partir del ácido vainílico (el producto aromático mayoritario de la lignólisis), el cual es parcialmente metilado para producir ácido verátrico, quien posteriormente es rápidamente reducido a alcohol veratrílico.

Al ser oxidado el alcohol veratrílico por la ligninasa y producirse radicales catiónicos, éste actúa como un oxidante de un electrón para interactuar con otros sustratos, es decir, puede actuar como un cofactor (Figura 3) en la ruptura de la estructura de la lignina (Harvey, 1986). Sin embargo, existen algunas controversias, ya que hay quienes sostienen (Tien, 1986) que este compuesto simplemente protege a la ligninasa de la inactivación por sustratos anisflicos, esto debido a que no se ha podido detectar la presencia de los radicales libres del alcohol veratrílico, pero esto puede deberse a que el tiempo de vida de estos radicales es muy corto. Sin embargo, la mayoría de los investigadores concuerdan en que la oxidación del alcohol veratrílico es un modelo aceptable para entender la degradación de la lignina. Incluso, la oxidación del alcohol

veratrílico se utiliza como un ensayo conveniente para medir la actividad de la ligninasa. El ensayo es muy sensible a una relación adecuada de peróxido y alcohol veratrílico en una concentración particular de proteína (un exceso de peróxido resulta en la conversión de la enzima al compuesto II y en una subsecuente disminución de la actividad catalítica).

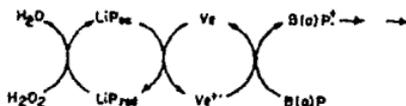
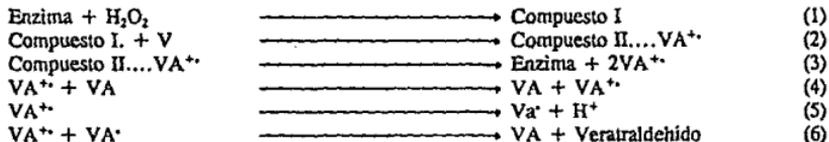


Figura 3. Alcohol veratrílico como un mediador para la transferencia de electrones.

El mecanismo de acción de la ligninasa es el típico de una peroxidasa. El peróxido oxida a la ligninasa dando lugar a la formación de dos estructuras: el compuesto I que es un complejo oxi-ferril con un radical porfirin catiónico (es la forma oxidada vía dos electrones) y el compuesto II que es la forma oxidada vía un electrón (mostrados en la Figura 4), quien posteriormente contribuye a la restauración de la enzima a su estado nativo. El compuesto I es convertido al compuesto II por un sustrato equivalente de un electrón como un fenol o por 0.5 equivalentes de un sustrato de dos electrones como el alcohol veratrílico (Kirk, 1988).

Las reacciones que se llevan a cabo para la formación de los radicales libres se plantean como sigue:



VA = Alcohol veratrílico

Más recientemente, Hattori (1992) comprobó la formación de radicales libres tanto en el alcohol veratrílico como en su producto de degradación; veratril-8-D-xilósido (este se forma cuando está presente holocelulosa o xilano). A partir de sus resultados este investigador apoya las teorías que postulan que el alcohol veratrílico y su derivado xilósido, protegen a la enzima contra la inactivación, por remoción de un exceso de peróxido de hidrógeno; y actúan como mediador (transfieren un electrón) en la degradación de la lignina. Este autor logra elucidar, además de las estructuras cis, trans lactona y veratraldehído (reportadas anteriormente por Leisola, 1985), la estructura de la gama-lactona, producidas en la degradación del alcohol

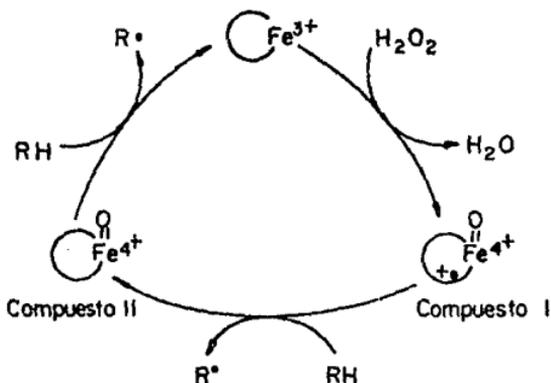


Figura 4. Ciclo catalítico de la ligninasa.

veratrílico, las cuales se muestran en la figura 5.

Haemmerli (1987), también descubrió que en la oxidación de la lignina un núcleo aromático susceptible es oxidado enzimáticamente por un electrón, produciendo radicales catiónicos inestables que sufren una gran variedad de reacciones no enzimáticas. Se afirma, entonces, que la reacción de la ligninasa con compuestos relacionados a la lignina es una oxidación de un electrón, o mejor dicho es un mecanismo de radicales libres. La lignina peroxidasa también puede actuar como una fenol oxidasa, pero sólo los fenoles no aromáticos son oxidados. La reacción de oxidación depende fuertemente del potencial redox del sustrato. De esta manera, por ejemplo, el benzo(a)pireno es oxidado por la enzima, pero el naftaleno no es oxidado ya que tiene un alto potencial redox (Leisola, 1988).

En base a los estudios realizados por diferentes investigadores, se sugieren, entonces, tres mecanismos de acción por los cuales los hongos de la pudrición blanca degradan a la lignina:

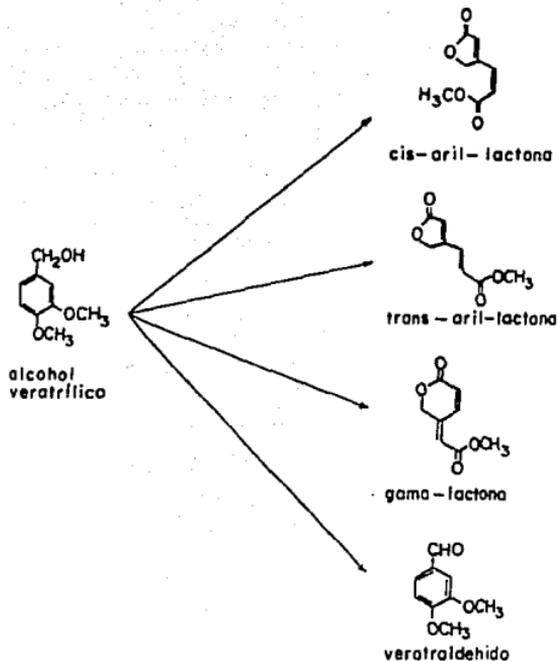


Figura 5. Oxidación enzimática del alcohol veratrílico y sus productos.

1. Ruptura oxidativa del enlace entre los carbonos  $\alpha$  y  $\beta$ , que conduce a la formación de ácidos aromáticos.

2. Ruptura de enlaces  $\beta$ -aryl éter y modificación de las estructuras enlazadas.

### 3. Degradación del núcleo aromático por la apertura oxidativa del anillo.

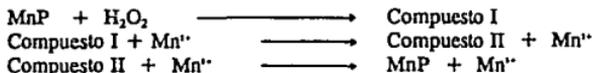
Tanto Higuchi como Leisola (1985) sugieren que la apertura del anillo ocurre primero, aunque la reacción mayoritaria es la ruptura del enlace  $\alpha$ -C $\beta$ .

Los mecanismos antes mencionados se refieren a la acción de la ligninasa, pero existen más enzimas involucradas en la degradación de la lignina. Como se sabe la manganosa peroxidasa juega un papel importante en la degradación de la lignina y sus derivados. Esta enzima cataliza la oxidación de varios colorantes y fenoles, la descarboxilación y desmetoxilación de compuestos aromáticos y la ruptura de dímeros fenólicos de la lignina.

Antes se mencionó que la manganosa peroxidasa cataliza la oxidación del  $Mg^{2+}$  a  $Mg^{3+}$  en presencia de ciertos ligandos, incluyendo pirofosfato, tartrato y lactato. El complejo manganoso trivalente formado ( $Mn^{III}$  lactato y  $Mn^{III}$  malonato), enzimáticamente oxida a varios sustratos aromáticos. Parece entonces, que el papel del manganoso en la oxidación de compuestos orgánicos por la manganosa, es el de actuar como un mediador para la transferencia de un electrón, igual que como lo hace el alcohol veratrílico con la lignina peroxidasa.

De manera similar que la ligninasa, la manganosa forma compuestos intermediarios, el compuesto I y el compuesto II, en presencia de  $H_2O_2$ . El compuesto I puede ser reducido por un electrón a el compuesto II por adición de  $Mn^{2+}$ , ferrocianuro o varios sustratos fenólicos, sin embargo, sólo el manganoso divalente y el ferrocianuro pueden reducir el compuesto I para regenerar a la enzima nativa.

En analogía con la ligninasa, la formación de los compuestos intermediarios de la manganosa pueden resumirse como sigue:



MnP = Manganosa peroxidasa

(Aiken e Irvine, 1990)

Leisola y colaboradores, postularon un esquema hipotético para la degradación de la lignina (Figura 6), en donde se propone que la lignina peroxidasa y las fenol oxidasas (lacasa y manganosa) trabajan en combinación con enzimas reductoras que son capaces de reducir ácidos aromáticos monoméricos y diméricos, aldehídos aromáticos y quinonas.

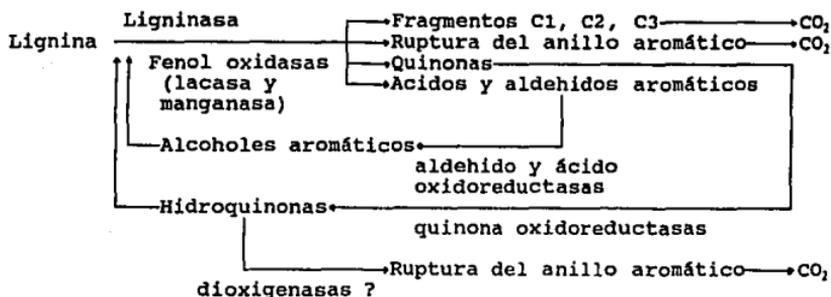


Figura 6. Esquema hipotético de la degradación de la lignina por *P. chrysosporium*.

### 1.5.7. CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA PRODUCCION DE ENZIMAS LIGNINOLITICAS

Los estudios realizados con *Phanerochaete chrysosporium* y *Coriolus versicolor* (Kirk, 1976) han demostrado que se requiere de un sustrato de crecimiento externo para el metabolismo de la lignina, ya que estos microorganismos no son capaces de utilizar a ésta como única fuente de energía.

La eficacia de los diferentes sustratos de crecimiento para soportar el metabolismo de la lignina varía, sin embargo, existe una buena cantidad de compuestos eficaces para este fin; entre los que se tienen a la D-glucosa, D-manosa, d-celobiosa, glicerol, xilosa, D-glucurrolactona, succinato de sodio, D-gluconato de potasio, xilano, y celulosa comercial. La celulosa de la pulpa de la madera y la glucosa son los mejores sustratos de crecimiento que soportan el metabolismo de la lignina (Kirk T.K, 1980).

No se conoce la razón por la que es necesario un sustrato de crecimiento, pero se proponen dos hipótesis, la primera plantea que la energía recobrada en el metabolismo de la lignina es simplemente muy pequeña como para soportar el crecimiento. La segunda postula que los niveles de actividad ligninolítica son muy bajos para mantener el crecimiento.

El metabolismo de la lignina por los hongos de la pudrición blanca es un proceso altamente oxidativo, lo que sugiere que la concentración de oxígeno es un factor determinante en la velocidad de degradación de la lignina.

Se ha demostrado que la velocidad y el grado de conversión de lignina a CO<sub>2</sub>, es dos o tres veces mayor bajo 100% de oxígeno que bajo 21% (en aire). Bajo un 5% de oxígeno (en N<sub>2</sub>), existe crecimiento pero no ocurre el metabolismo de la lignina (Kirk y Shultz, 1978). Un reporte más reciente en donde se empleó el efluente de la etapa E1 del pulpeo Kraft como sustrato (Galeno y Agosin, 1990), confirmó lo anterior, en este trabajo se obtuvo una decoloración del 90% bajo una atmósfera de oxígeno del 100% y sólo una decoloración del 70% bajo aire solamente, después de 190 horas de incubación con *P. chrysosporium*.

A menudo se utiliza la agitación del cultivo para incrementar la velocidad de intercambio de oxígeno entre la atmósfera y el medio de cultivo. Sin embargo, esto origina la formación de "pellets", lo que, a su vez, disminuye mucho el metabolismo de la lignina. La base del efecto negativo de la formación de pellets en el metabolismo de la lignina parece relacionarse con el oxígeno, la concentración de éste en el interior del pellet es simplemente demasiado baja como para soportar el metabolismo de la lignina. La degradación en la superficie del pellet es baja debido a que la superficie representa sólo un pequeño porcentaje de la hifa total (Kirk K., 1980; Liesola y col., 1983).

Se ha afirmado por varios investigadores que en cultivos agitados no se presenta actividad enzimática alguna y que sólo en los cultivos estáticos ocurre la degradación de la lignina (Kirk y col., 1978). Sin embargo, en ellos, ésta degradación es incompleta, pues existe una limitación de oxígeno, amenos que este se suministre hasta crear una atmósfera del 100%

Leisola y Fiechter (1985) fueron los primeros en demostrar que *P. chrysosporium* (cepa nativa), puede degradar a la lignina bajo una limitación de nitrógeno en cultivos agitados (100 rpm) en presencia de alcohol veratrílico. También demostraron que el hongo produce ligninasa, aunque la actividad detectada fue baja.

En 1988 Waldner, Leisola y Fiechter compararon la actividad ligninolítica en varios hongos de la pudrición blanca en cultivos (suplementados con alcohol veratrílico) estáticos y bajo agitación (150 rpm). Estos experimentos revelaron que todos los hongos estudiados degradaron la lignina con y sin agitación y además, descubrieron que una cepa, *Fomes lignosus*, sólo degrada la lignina en cultivos agitados.

Posteriormente Fiechter y col. (1989), demostraron también, la posibilidad de producir ligninasas en cultivos agitados, además, ellos relacionaron el tamaño del pellet con la actividad obtenida, concluyendo de esta manera que un diámetro de pellet de entre 3 y 4 mm conlleva a una alta actividad ligninolítica, afirmación que se opone a lo reportado por Leisola (1983), quien afirma que la reducción del diámetro del pellet hasta 1.5 mm incrementa marcadamente el consumo de glucosa y la velocidad de degradación de la lignina.

La razón por la cual la agitación de los cultivos suprime la producción de la ligninasa y la degradación de la lignina, aun no esta del todo clara, se ha propuesto (Rajagopalan e Irvine, 1990) que la inactivación mecánica de la enzima es posiblemente la causa de que la acumulación de la enzima sea baja o nula en cultivos agitados. Cuando se emplean altas velocidades de

agitación (100-200 rpm), se crean grandes fuerzas mecánicas que originan la desnaturalización de la ligninasa. La agitación parece afectar la actividad catalítica de la ligninasa pero no afecta aparentemente la velocidad de producción de la enzima o la fisiología del hongo. Los detergentes (Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 y CHAPS; son capaces de proteger a la ligninasa contra la inactivación mecánica por la agitación, mediante la unión de la ligninasa a los sitios hidrofílicos de la micela del detergente, o por la unión de la enzima a monómeros de detergente que posiblemente formen un complejo resistente a la desnaturalización mecánica. Los trabajos realizados por Rajagolapan e Irvine revelan que la inactivación debida a la agitación es reversible, es decir, cuando la velocidad de agitación es disminuida (de 150 a 30 rpm), se puede recobrar la actividad enzimática.

Otro factor importante es el pH, *P. chrysosporium* metaboliza óptimamente la lignina cuando crece a un pH aproximado de 4.5, por arriba de 5.5 y abajo de 3.5 ocurre una marcada supresión de la actividad. Por lo que es necesario controlar el pH durante la degradación de la lignina. A ese respecto se han probado varios amortiguadores con el fin de obtener un buen control de esta variable durante el cultivo de *P. chrysosporium*. De esta manera se encontró que el acetato de sodio resulta tóxico para el hongo, el succinato es metabolizado por el microorganismo, el aconitato por alguna razón interfiere en el metabolismo (aunque no en el crecimiento), el ofalato inhibe la actividad del sistema enzimático (Feen y Kirk, 1979). Experimentos posteriores mostraron que el 2,2-dimetilsuccinato (pH 4.5) es superior que el ofalato y que este compuesto no es utilizado como nutriente para el crecimiento.

La actividad ligninolítica se presenta a los cuatro días de crecimiento, aún cuando la lignina no ha sido introducida, lo que demuestra que ésta no es necesaria para que se presente el sistema enzimático y que se requiere la síntesis de proteínas después de 3  $\frac{1}{2}$  días para que se presente la actividad. La presencia o ausencia de lignina no afecta el tiempo de aparición o el nivel de la actividad. Así, el sistema ligninolítico en *P. chrysosporium* se produce al final de la fase exponencial de crecimiento (o cuando se alcanza la fase de crecimiento estacionario) en respuesta a un cambio intrínseco en el metabolismo y no en respuesta a la lignina (Keyser y Kirk, 1978).

Se ha observado que la actividad enzimática se presenta justo en el momento en que se agota la fuente de nitrógeno, carbono o azufre, lo que podría indicar que el empobrecimiento de este nutriente está asociado con la producción del sistema enzimático. Lo anterior ha sido comprobado por Keyser y Kirk (1978), quienes utilizaron tartrato de amonio como única fuente de nitrógeno y cuantificaron el nitrato residual en el medio a la par con la actividad enzimática, encontrando que el nitrógeno se agotó a las 24 hrs y que la actividad se presentó a las 96 hrs (entre 1 y 2 días después del agotamiento de la fuente de nitrógeno), esto debido a la actividad de la enzima amonio permeasa que se activa bajo una limitación de nitrógeno y que alcanza su máxima actividad a las 48 hrs.

La fuente de nitrógeno no tiene un efecto significativo en la degradación de la lignina, pero su concentración la afecta de manera crítica, un exceso de nitrógeno, reprime la aparición de la actividad ligninolítica (Keyser y Kirk, 1978; Ian, 1979; Tonnon, 1989) y la adición de

nitrógeno a cultivos que ya la presentan, disminuye esta actividad considerablemente (Keyser y Kirk, 1978; Fen y Kirk, 1981), lo cual comprueba nuevamente que el agotamiento de la fuente de nitrógeno tiene alguna conexión con la producción de la enzima ligninolítica.

Kirk (1980), estableció que la concentración óptima de nitrógeno es de 2-3 mM, una concentración menor o por arriba de esta suprimen la producción del sistema enzimático. Keyser y Kirk (1978) en base a sus estudios, sugieren la siguiente secuencia de eventos fisiológicos después de la inoculación de esporas en el medio (bajo una atmósfera de 100% de oxígeno):

De las 0 a las 24 h, ocurre la germinación de las esporas, el crecimiento exponencial (medido por la síntesis de DNA) y el agotamiento de la fuente de nitrógeno.

De las 24 a las 48 h, termina la fase de crecimiento exponencial y activación de la amoníaco permeasa lo que demuestra el agotamiento del nitrógeno.

De las 72 a las 96 hr, se presenta la actividad ligninolítica.

Hasta ahora no se conoce con claridad el mecanismo por el cual el nitrógeno activa o inactiva la aparición del sistema enzimático.

Cuando se descubrió el efecto de este nutriente, por primera vez, se reconoció que la inhibición podía deberse a una competencia por cofactores del metabolismo del nitrógeno, necesarios para la degradación de la lignina o directamente por inhibición del sistema ligninolítico. Sin embargo, Fenn y Kirk (1981), en base a sus estudios, sostienen que lo que ocurre es una represión más que una competencia o una inhibición. Ellos se basan en el hecho de que al adicionar un exceso de nitrógeno al sistema, el efecto negativo se presenta varias horas después, lo que no ocurriría si se tratará de una inhibición o competencia ya que estas suceden muy rápidamente, además, ocurre una represión idéntica en la síntesis de proteínas tanto por la adición de nitrógeno como por la adición de ciclohexamina, lo que descarta la competencia por cofactores, por último, la actividad ligninolítica puede inducirse por una limitación de carbono o azufre (Jan, 1979; Jeffries y Choi, 1981; Tonnon F., 1989) en presencia de nitrógeno a concentraciones que serían supresivas en cultivos de nitrógeno limitado, si el mecanismo fuera competencia o inhibición.

Otra explicación del efecto negativo de una alta concentración de nitrógeno, es que esta condición promueve el rápido agotamiento del sustrato de crecimiento (glucosa), que es esencial para el metabolismo de la lignina. Una última explicación posible es que el nitrógeno regula la síntesis de uno o más componentes del sistema ligninolítico (Kirk y Schultz, 1978).

Ciertos compuestos incrementan la actividad de la ligninasa cuando se adicionan a los cultivos. Desde hace varios años ya se había demostrado que los detergentes no iónicos como el Tween 80, Tween 20, Tween 40, Tween 60 así como el ácido oleico (Asther, 1987) incrementan marcadamente la producción extracelular de ligninasa en cultivos agitados de

*P. chrysosporium*. La concentración más comúnmente empleada es de 0.05%. El efecto positivo del Tween 80 puede revertirse si éste se adiciona en exceso, ya que a concentraciones de 0.1% o mayores previenen la producción de la enzima.

Anteriormente se mencionó que el efecto positivo de la adición de Tween 80 en el aumento de la actividad enzimática se debía a que este detergente protege a la enzima contra la inactivación, sin embargo, existe otra propuesta más posible; este detergente modifica la permeabilidad de la membrana de las células, lo que incrementa el transporte de nutrientes, entre ellos el oxígeno, dentro y fuera de la célula (Reese y Maguire, 1969). Otra explicación que se ha considerado es que los ácidos grasos insaturados y saturados liberados durante la hidrólisis del Tween 80, sean utilizados por el microorganismo, como fuente de energía externa para el metabolismo secundario o sirven como inductores para la síntesis de ligninasas (Asther, 1987; Rajagopalan e Irvine, 1990).

Como se mencionó anteriormente, Kirk, Leisola y Fiechter descubrieron que el alcohol veratrflico activa la producción de la lignina peroxidasa. Faison (1985) consiguió incrementar el título de la actividad ligninolítica en 20%, al adicionar alcohol veratrflico a cultivos agitados a 200 rpm, aunque no alteró el tiempo de producción de la enzima, mientras que Kirk y col. (1986) lograron aumentar 2.1 veces la actividad al adicionar 0.4 mM (como límite) de alcohol veratrflico a cultivos oxigenados cada tercer día. Por su parte Kantelinen y colaboradores (1988), triplicaron la producción de la lignina peroxidasa, al adicionar 1.4 mM de alcohol veratrflico a cultivos estáticos de *Phlebia radiata*.

La velocidad de oxidación de compuestos benzo(a)pirenos por acción de la ligninasa también se ve incrementada por la adición de alcohol veratrflico (Haemmerli, 1986).

La concentración de alcohol veratrflico utilizada en cultivos limitados en nitrógeno varía desde 0.4 mM (Kirk, 1986) hasta 2.5 mM (Linko, 1992). El aumento en la actividad de la enzima, por la adición del alcohol veratrflico se relaciona con el aumento de las isozimas H1 y H2, la primera aumenta 1.7 veces y la segunda 1.3 veces (Kirk, 1986).

La adición conjunta de Tween 80 y alcohol veratrflico, estimula una alta producción de ligninasa en cultivos agitados incluso hasta a 200 rpm.

*Phanerochaete chrysosporium* crece bajo un buen rango de temperatura (25-40°C), Kirk (1978), reportó como óptimo 39 a 40°C tanto para el crecimiento del hongo como para la producción de la enzima, sin embargo, varios investigadores (Leisola, Kuwahara, Tonon, Asther, Capdevila, etc.) utilizan 37°C, mientras que otros emplean 38°C. Por otro lado, también se han conseguido resultados favorables cuando se crece al hongo a una temperatura (37°C) y ésta después se baja (hasta 30°C) cuando se alcanza la etapa de crecimiento secundario. Este mismo esquema se ha seguido con la agitación, donde se parte de 180 ó 250 rpm y después se disminuye la velocidad a 130 ó 220 rpm.

## **2. HIPOTESIS.**

La capacidad de *Phanerochaete chrysosporium* CDBB h-298 para decolorar el agua residual de la producción de pulpa, aumentará al controlar variables que favorezcan el intercambio de oxígeno (velocidad de agitación y Tween 80), o que induzcan la producción del sistema enzimático (adición de alcohol veratrílico) que interviene en este proceso.

### **3. OBJETIVOS**

### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

Determinar las condiciones de cultivo adecuadas para la máxima decoloración (y producción de ligninasas) del agua residual de blanqueo de pulpa de bagazo de caña para la producción de papel, empleando al hongo de la pudrición blanca *Phanerochaete chrysosporium* CDBB h-298.

### **3.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

Determinar la correlación que existe entre la remoción de color y la producción de ligninasas, en el tratamiento de aguas residuales del pulpeo, empleando el hongo de pudrición blanca *Phanerochaete chrysosporium* CDBB h-298.

Ensayar las técnicas para medir color y actividad ligninolítica en los sobrenadantes del cultivo.

Evaluar el efecto de la velocidad de agitación y de la adición de Tween 80 y alcohol veratrfílico sobre la remoción de color del agua residual de blanqueo.

## **4. MATERIALES Y METODOS**

## **4.1. CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Phanerochaete chrysosporium* EN MEDIO KIRK**

El medio Kirk, es un medio de cultivo que permite el desarrollo de la actividad ligninolítica, ya que tiene deficiencia de nitrógeno, condición indispensable para estimular la síntesis del sistema enzimático. La composición de este medio de cultivo se presenta en el apéndice 9.1.

A cada uno de los 21 matraces Erlenmeyer, se les adicionaron 30 ml. del medio de cultivo y se esterilizaron por calor húmedo a 15 lb/pulg<sup>2</sup> durante 15 minutos.

### **4.1.1. PREPARACION DE LA SUSPENSION DE ESPORAS**

Se hizo crecer a *Phanerochaete chrysosporium*CDBB-298 en tubos de dilución con 25 ml de agar-extracto de malta al 2%, durante dos semanas a temperatura ambiente y posteriormente se almacenó a 4°C durante 5 días para una máxima producción de esporas.

Con una solución estéril de Tween 80 al 0.1% se hizo un barrido de esporas y se ajustó hasta tener una absorbancia de 0.5 a 650 nm (Kirk, 1984). El número de esporas por mililitro de suspensión se determinó por conteo en un hemocitómetro. En este caso resultó ser de  $3 \times 10^6$ .

### **4.1.2. INOCULACION Y CONDICIONES DE CULTIVO**

Se inocularon 21 matraces con 3 ml (10% del volumen total) de la suspensión de esporas. Los tres matraces restantes se usaron como blanco. Todos los matraces se incubaron inmediatamente a 37°C a una velocidad de agitación de 150 rpm. Se tomaron muestras por triplicado cada 24 hrs.

Todas las muestra se filtraron a través de membranas Millipore de 0.45  $\mu$ m de diámetro y se determinó el peso seco.

## **4.2. ESTANDARIZACION DE LA TECNICA PARA MEDIR COLOR**

### **4.2.1. PRINCIPIO**

El color se determina mediante comparación, ya sea visual o espectrofotométricamente de las muestras con soluciones coloreadas de concentraciones conocidas. El método patrón para

medir color es el de cobalto-platinato, siendo la unidad de color el producido por 1 mg de platino/litro en forma de ión cloroplatinato (Fresenius, 1988).

La turbidez en las muestras causa una gran interferencia, incluso cuando esta es ligera, hace que el color sea mas fuerte que el real. Por lo tanto, las muestras deben centrifugarse o filtrarse (idem).

El color del agua depende en gran medida del pH de ésta, al aumentar el pH, el color aumenta también, por lo que es necesario registrar el pH de las muestras analizadas.

La preparación y la curva de calibración para medir color se muestra en el apéndice 9.2. y 9.3. respectivamente.

#### **4.2.2. PREPARACION DE LAS MUESTRAS**

A todas las muestras ya centrifugadas, se les ajustó el pH a 7.5 debido a que el color es dependiente del pH. Se eligió este pH, porque en él, los compuestos cromóforos (ligninas y sus derivados) están en equilibrio, a pH mas ácidos o mas alcalinos ocurre la ionización de los grupos fenólicos.

A las muestras ya ajustadas, se les midió su absorbancia en un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 465 nm, contra agua destilada como referencia. El cálculo de las unidades de color se hizo en base a la curva de calibración.

### **4.3. ESTANDARIZACION DE LA TECNICA PARA MEDIR ACTIVIDAD LIGNINOLITICA**

#### **4.3.1. PRINCIPIO**

La ligninasa cataliza la oxidación del alcohol veratrílico, por el peróxido de hidrógeno a veratraldehído. El alcohol no absorbe a 310 nm, mientras que el aldehído presenta una intensa banda de absorción a dicha longitud de onda. Considerando esta propiedad, se mide la cantidad del veratraldehído formado (Tien y Kirk, 1988).

Una unidad de enzima se define como la cantidad de veratraldehído formado, expresada en nanomoles por minuto por ml de medio de cultivo a temperatura ambiente (Tien y Kirk, 1986).

Para determinar la actividad ligninolítica se requiere de un iniciador de la reacción; el peróxido de hidrógeno, el cual debe de tener una concentración específica. Es por ello, que este reactivo debe titularse cada vez que se va a utilizar, pues su concentración varía con el tiempo.

Para esto, se utilizó una solución de permanganato de potasio 0.1 N. La cual a su vez fue titulada con un patrón primario; oxalato de sodio, que debe secarse previamente hasta peso constante.

La concentración del peróxido de hidrógeno se calculó empleando la ecuación:

$$\%H_2O_2 = \frac{\text{Vol. gastado (ml)} \times N \text{ KMnO}_4 \times 1.7}{\text{Factor de dilución}}$$

#### 4.3.2. PREPARACION DE LAS SOLUCIONES DE PEROXIDO DE HIDROGENO

Se emplearon dos concentraciones de peróxido de hidrógeno; 0.1 y 0.4 mM. Para lo cual se preparó dos soluciones patrón que permitieran obtener las concentraciones deseadas al llevar 100  $\mu$ l de ésta y aforarlos a 1.4 ml con agua destilada.

#### 4.3.3. PREPARACION DE LAS SOLUCIONES DE ALCOHOL VERATRILICO

Debido a que el alcohol veratrílico tiene similitud estructural con la lignina, este puede emplearse como un sustrato para medir la actividad de la enzima que degrada a la lignina.

Para el ensayo se prepararon soluciones de alcohol veratrílico para obtener una concentración final de 1 mM, 2 mM, 3mM y 4 mM de alcohol veratrílico al tomar 100  $\mu$ l de las soluciones respectivas y aforarlos a 4 ml.

#### 4.3.4. PREPARACION DE LA SOLUCION REGULADORA DE TARTRATOS

Como se mencionó, la enzima ligninasa es estable a un pH alrededor de 3-4.5, pero es más activa a pH de 3.0, por lo que debe de controlarse el pH en la reacción para la actividad enzimática.

Para ello se preparó una solución reguladora de ácido tartárico-tartrato de sodio con pH final de 3.0. La solución es estable bajo refrigeración, por lo que puede usarse para varias determinaciones.

#### 4.3.5. MEDICION DE LA ACTIVIDAD LIGNINOLITICA A LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ALCOHOL VERATRILICO Y PEROXIDO DE HIDROGENO

Se inocularó un matraz Erlenmeyer que contenía 30 ml del medio Kirk estéril, con 3 ml de suspensión de esporas (Abs, 0.5 a 650 nm) Se incubó por diez días y el contenido del matraz se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 min, 4°C. El sobrenadante se empleó para determinar la actividad ligninolítica.

Como primer paso se hicieron pruebas bajo las condiciones reportadas por Tien y Kirk (0.4 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 2 mM de alcohol veratrílico, pH 3.0) pero empleando dos temperaturas: 23 y 37°C.

Para esto se utilizó un volumen de reacción total de 4 ml. A cada tubo se le adicionaron: 900 µl de sobrenadante, 100 µl de alcohol veratrílico 300 µl de solución amortiguadora (pH 3.0) y 100 µl de peróxido de hidrógeno, en ese orden (con la adición del peróxido de hidrógeno se inicia la reacción). Después de 20 min, exactamente, se leyó la absorbancia a 310 nm.

Con esta prueba se pudo descartar la incubación a 37°C, ya que la actividad enzimática fue mayor a 24°C.

A continuación se hicieron seis pruebas por duplicado, a las diferentes concentraciones de alcohol veratrílico y peróxido de hidrógeno a temperatura ambiente (24°C) y pH 3.0, como se indica en la Tabla I. Las lecturas se hicieron después de 15 minutos a una longitud de onda de 310 nm.

## 4.4. ANALISIS DEL AGUA RESIDUAL

### 4.4.1. DETERMINACION DE COLOR

Se tomaron 10 ml del efluente (por triplicado), se le ajustó el pH a 7.5 con ácido clorhídrico concentrado y se determinó su absorbancia a 465 nm.

Las unidades de color se calcularon en base a la curva de calibración de cloroplatinado de potasio.

### 4.4.2. DETERMINACION DE NITROGENO TOTAL EN EL AGUA RESIDUAL

Debido a que el sistema enzimático sólo se manifiesta como una respuesta a la limitación de nitrógeno, carbono o azufre, fue necesario determinar el contenido de nitrógeno en el licor alcalino para evitar que se excediera la concentración máxima requerida (2-3 mM), y no se inhibiera la producción de dicha enzima. Para esta determinación se utilizó el método de Micro-Kjeldahl.

### 4.4.3. PRINCIPIO

En éste método se calienta hasta ebullición una muestra con ácido sulfúrico, quien oxida el nitrógeno a sulfato de amonio y finalmente, éste se convierte en amoníaco por acción de un álcali (NaOH). El amoníaco formado se destila y se titula con una solución ácida normalizada (Lynch, 1990).

**Tabla I** Ensayos de actividad enzimática a diferentes concentraciones de alcohol veratrílico y peróxido de hidrógeno.

REACTIVOS	PRUEBAS					
	1	2	3	4	5	6
Sobrenadante ( $\mu$ l)	900	900	900	900	900	900
Solución reguladora ( $\mu$ l)	300	300	300	300	300	300
A.V. 1 mM ( $\mu$ l)	100	-	-	-	-	-
A.V. 2 mM ( $\mu$ l)	-	100	-	-	-	-
A.V. 3 mM ( $\mu$ l)	-	-	100	100	-	-
A.V. 4 mM ( $\mu$ l)	-	-	-	-	100	100
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,1 mM ( $\mu$ l)	100	-	100	-	100	-
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,4 mM ( $\mu$ l)	-	100	-	100	-	100

A.V.: Alcohol veratrílico, Solución reguladora pH 3.0

Para la determinación, se tomó una muestra alícuota de 5 ml (por triplicado) y se colocó en un matraz Kjeldahl, enseguida, se adicionaron 2 g de una mezcla de reactivos compuesta de 2 g de sulfato de potasio por cada 50 g de óxido de mercurio. A continuación se adicionaron lentamente 2.5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Posteriormente, se colocaron los matraces, junto con dos blancos de reactivos, en un digestor y se calentaron hasta que las muestras se tomaron transparentes, en ese momento, se contó una hora y media y se detuvo la digestión.

Una vez ya frías las muestras, se lavaron las paredes de cada matraz con agua destilada y se solubilizaron las sales formadas, por medio de agitación en un Roux. Enseguida, se procedió a destilar cada muestra en un microdestilador y se recibió el  $NH_4$  formado, en un matraz Erlenmeyer de 125 ml que contenía 5 ml de ácido bórico al 5% y 3 gotas de fenoftaleína, como mezcla receptora e indicadora.

Cuando se colectó aproximadamente 80 ml del destilado, se retiró el matraz y se tituló con ácido clorhídrico 0.01 N.

El nitrógeno total se calculó empleando la siguiente ecuación:

$$ppm N = \frac{(N HCl) (meq N) (Vn - Vb) (100)}{Alícuota}$$

#### 4.4.4. DETERMINACION DE AZUCARES TOTALES EN EL LICOR

El método del fenol sulfúrico es excelente para determinar casi toda clase de azúcares, incluyendo derivados de azúcar, oligo y polisacáridos. Los reactivos son baratos, fácilmente accesibles y estables, se produce un color estable y reproducibles. Bajo las condiciones propuestas, el método tiene una exactitud de 2%.

Se procedió como a sigue:

1 ml de la muestra diluida (1 ml/10 ml agua destilada) se colocó un tubo colorimétrico, a continuación se adicionó 1 ml de la solución de fenol al 5%, se mezcló y se adicionó rápidamente 5 ml de ácido sulfúrico al 96% con agitación, teniendo mucha precaución, ya que la reacción es altamente exotérmica. Se esperó entre 20 y 30 minutos. El color amarillo-naranja que se produce es estable por varias horas. Se midió la absorbancia a 490 nm. Al mismo tiempo se corrieron blancos de reactivos.

Se preparó una curva patrón con dextrosa que partió de 0 mg/ml hasta 1 mg/ml.

#### 4.4.5. DETERMINACION DE DBO Y DQO

Los análisis de demanda química de oxígeno (DQO) y demanda biológica de oxígeno (DBO) fueron realizados en el laboratorio de Ecología del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV. Para el primero, se utilizó el método de volumen fijo y para el segundo el método de dilución.

#### 4.5. SELECCION DE LA CONCENTRACION DE EFLUENTE PARA SU DEGRADACION CON *Phanerochaete chrysosporium*

##### 4.5.1. MEDIO DE CULTIVO

El agua residual se filtró a través de una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro para eliminar las partículas. El pH se ajustó a 7.5 con ácido clorhídrico concentrado.

Las concentraciones empleadas para el ensayo fueron: 20, 50, 60, 70 y 80% (v/v). Se utilizó el medio Kirk como diluyente.

Para cada concentración se emplearon 6 matraces Erlenmeyer de 125 ml (3 blancos y 3 problemas), en los cuales se colocaron 30 ml de cada mezcla, respectivamente y se esterilizaron por calor húmedo a 15 lb/pulg<sup>2</sup> por 15 minutos.

##### 4.5.2. INOCULACION Y CONDICIONES DE CULTIVO

Se preparó una suspensión de esporas en una solución de Tween 80 al 0.1%, hasta obtener una absorbancia de 0.5 a 650 nm ( $3 \times 10^6$  esporas/ml). De esta suspensión se inoculó el 10% del volumen de medio Kirk contenido en la correspondiente mezcla. Los matraces se incubaron a 37°C, con agitación de 150 rpm, durante 10 días.

A cada muestra (blancos y problemas) se le ajustó el pH a 7.5 con una solución concentrada de hidróxido de sodio y se les determinaron las unidades de color y el peso seco.

#### 4.6. CINETICA DE DECOLORACION DEL EFLUENTE A LA CONCENTRACION ELEGIDA

##### 4.6.1. MEDIO DE CULTIVO

Se filtraron 600 ml de efluente a través de una membrana Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro. El pH se ajustó a 4.5 con ácido clorhídrico concentrado. El efluente se transfirió a un

matraz volumétrico de 1 litro y se aforó con medio Kirk. Se ajustó el pH a 4.5 con ácido 2,2-dimetil succínico.

A cada uno de 22 matraces Erlenmeyer se les adicionaron 30 ml del medio de cultivo y se esterilizaron por calor húmedo a 15 lb/pulg<sup>2</sup> por 15 minutos.

#### 4.6.2. INOCULACION Y CONDICIONES DE CULTIVO

Se preparó una suspensión de esporas de *P. chrysosporium* en Tween 80 al 0.1% (Abs 0.5 a 650 nm).

Todos los matraces (excepto los blancos) se inocularon con 1.8 ml (inóculo del 10%) de la suspensión de esporas. Enseguida se incubaron a 37°C con agitación de 150 rpm, durante 10 días. Se tomaron muestras a los días 0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 días, las cuales se centrifugaron a 10,000 rpm (4°C) durante 15 minutos, al sobrenadante se le determinó el color y al sedimento se le determinó el color adsorbido y el peso seco como a continuación se describe.

Se preparó una solución reguladora de fosfatos de pH 7.5, para lo cual se pesaron 1.52 g de fosfato de potasio monobásico y 2.88 g de fosfato de potasio dibásico. Se disolvieron juntos en 100 ml de agua destilada y se aforaron a 250 ml. El pH se midió y se ajustó, cuando fue necesario.

El sedimento de cada muestra se colocó en un homogenizador, se rompió el micelio y se adicionaron 5 ml de la solución reguladora, se homogenizó nuevamente y se filtró a través de una membrana de 0.45 µm de diámetro. El homogenizador se lavó con otros 5 ml de solución reguladora, esta porción se filtró a través de la misma membrana.

Al filtrado se le determinaron las unidades de color y al sedimento el peso seco.

### 4.7. CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Phanerochaete chrysosporium* EN MEDIO KIRK CON INOCULO AUMENTADO

#### 4.7.1. MEDIO DE CULTIVO

Se preparó un litro de medio Kirk, se adicionaron 30 ml de éste a cada uno de 24 matraces Erlenmeyer de 125 ml. Los matraces se esterilizaron por calor húmedo a 15 lb/pulg<sup>2</sup> durante 15 minutos.

#### 4.7.2. INOCULACION Y CONDICIONES DE CULTIVO

Se hizo un barrido de esporas de *Phanerochaete chrysosporium* con una solución de Tween 80 al 0.1 %. La suspensión se ajustó hasta obtener una absorbancia de 1.0 a 650 nm ( $6 \times 10^6$  esporas/ml).

Se inocularon los matraces con 3 ml de esta suspensión. Se incubó bajo las condiciones antes usadas, durante once días y se tomaron muestras cada 24 h.

#### 4.7.3. DETERMINACION DE PESO SECO Y ACTIVIDAD LIGNINOLITICA

Cada muestra se centrifugó a 10,000 rpm (4°C) durante 15 minutos. Al sedimento se le determinó el peso seco y al sobrenadante la actividad ligninolítica.

Para medir la actividad enzimática, se mezclaron en tubos de ensayo, 900  $\mu$ l de sobrenadante, 100  $\mu$ l de alcohol veratrílico 4 mM, 300  $\mu$ l de solución reguladora y 100  $\mu$ l de peróxido de hidrógeno 0.4 mM. A los 15 minutos se midió la absorbancia a 310 nm.

#### 4.8. EVALUACION DEL EFECTO DE LA VELOCIDAD DE AGITACION, LA ADICION DE TWEEN 80 Y LA ADICION DE ALCOHOL VERATRILICO SOBRE LA DISMINUCION DE COLOR Y LA ACTIVIDAD LIGNINOLITICA

Para evaluar el efecto de estas variables se empleó un diseño factorial  $2^3$ , se manejaron tres variables a dos niveles; uno alto y uno bajo, como se muestra en la Tabla II.

Tabla II Variables y niveles manejados en el diseño factorial  $2^3$ .

VARIABLE	NIVEL	
	BAJO (-)	ALTO (+)
Velocidad de agitación (rpm)	80	150
Alcohol veratrílico (mM)	0.4	1.5
Tween 80 (% m/v)	0.05	0.08

El número total de experimentos para este diseño es de ocho, el desarrollo de la matriz correspondiente se muestra a continuación en la Tabla III.

Tabla III Diseño factorial 2<sup>3</sup>.

EXPERIMENTO	VARIABLES		
	A	B	C
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

A = Alcohol veratrílico (mM)

+ = Nivel alto

B = Velocidad de agitación (rpm)

- = Nivel bajo

C = Tween 80 (% v/v)

#### 4.8.1. MEDIO DE CULTIVO

Se prepararon cuatro medios de cultivo diferentes, para ello primero se disolvieron los componentes del medio Kirk en el efluente filtrado y con pH ajustado a 4.5. Antes de aforar, se adicionó alcohol veratrílico y Tween 80 como se muestra en la tabla IV.

Después de adicionar los reactivos a las concentraciones correspondientes, los medios se aforaron a un litro con agua destilada, (la necesaria para obtener una concentración del 60% de efluente) y se les ajustó el pH con ácido 2,2-dimetil succínico.

A continuación se colocaron 30 ml de cada medio en 12 matraces Erlenmeyer de 125 ml. Todos los matraces se esterizaron por calor húmedo durante 15 minutos a 15 lb/pulg<sup>2</sup>.

Tabla IV Medios de cultivo empleados en el diseño factorial 2<sup>3</sup>.

MEDIO	ALCOHOL VERATRILICO ( $\mu$ l)	TWEEN 80 ( $\mu$ l)
1	60.57	454.5
2	227.10	454.5
3	60.57	727.3
4	227.10	727.3

#### 4.8.2. INOCULACION Y CONDICIONES DE CULTIVO

A continuación se tomaron 6 matraces de cada medio (24 en total) y se inoculó la mitad con 3 ml de suspensión de esporas ajustada hasta una absorbancia de 1.0 a una longitud de onda de 650 nm ( $6 \times 10^6$  esporas/ml). Los 12 matraces restantes, sin inocular, se rotularon como blancos. Los 24 matraces se incubaron a 37°C y a 80 rpm, durante 8 días.

Los matraces restantes (24) se inocularon de la misma manera que los anteriores y se incubaron a 37°C durante 8 días, pero en este caso la velocidad de agitación fue de 150 rpm.

Todas las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm (4°C) durante 15 minutos, al sedimentar se le determinó el peso seco y al sobrenadante las unidades de color.

#### 4.9. CINÉTICA DE DECOLORACIÓN BAJO LAS MEJORES CONDICIONES

##### 4.9.1. MEDIO DE CULTIVO

El efluente alcalino (600 ml) se filtró a través de una membrana Millipore (0.45  $\mu$ m), el pH se ajustó a 4.5 con ácido clorhídrico concentrado, y se disolvieron los componentes del medio Kirk. Posteriormente se adicionaron 60.57  $\mu$ l de alcohol veratrílico y 454.50  $\mu$ l de Tween 80. Se aforó a un litro con agua desionizada y se ajustó el pH a 4.5 con ácido 2,2-dimetil succínico.

A cada uno de 22 matraces de 125 ml se les adicionaron 30 ml de este medio y se esterilizaron por calor húmedo.

#### 4.9.2. INOCULACION Y CONDICIONES DE CULTIVO

Se preparó una suspensión de esporas de *P. chrysosporium* en Tween 80 al 0.1 %, ajustando hasta una absorbancia de 1.0 a 650 nm ( $6 \times 10^6$ ). 14 matraces se inocularon con 3 ml de esta suspensión y dos se usaron como blancos. Inmediatamente después se incubaron a 37°C y 150 rpm durante 8 días, tomándose muestras a los 0, 2, 4, 5, 6, 7 y 8 días.

Cada muestra se centrifugó a 10,000 rpm (4°C) durante 15 minutos. Al sedimento se le determinó el color adsorbido por el micelio mediante extracciones con solución reguladora pH 7.5 (página 53) así como el peso seco. Al sobrenadante (10 ml) se le ajustó el pH a 7.5 con una solución de hidróxido de sodio concentrada y se le midió la absorbancia a 465 nm.

#### 4.9.3. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD LIGNINOLITICA

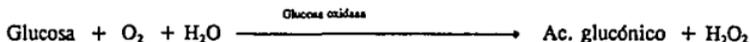
Se colocaron 900  $\mu$ l de sobrenadante en tubos de ensayo, a continuación se adicionaron 100  $\mu$ l de alcohol veratrílico 4 mM, 300  $\mu$ l de solución reguladora pH 3.0 y 100  $\mu$ l de peróxido de hidrógeno 0.4 mM. Exactamente 15 min después, se leyó la absorbancia a 310 nm.

#### 4.9.4. DETERMINACION DE GLUCOSA RESIDUAL

#### 4.9.5. PRINCIPIO

La glucosa es transformada por la enzima glucosa oxidasa, a ácido glucónico, produciendo simultáneamente una cantidad equimolar de peróxido de hidrógeno, el cual a su vez reacciona con el fenol y la 4-aminofenazona en presencia de peroxidasa, produciendo un compuesto rojo violeta (antipirilquinonimina en cantidades proporcionales a la glucosa presente en las muestras (Chaykin, 1966; Lynch, 1990).

La reacción es lineal hasta concentraciones de 380 mg/dl de glucosa. Concentraciones mayores requieren dilución de la muestra. La reacción se presenta a continuación:



Se hizo una dilución 1:3 (1 ml muestra/2 ml agua destilada) a todas las sobrenadantes de las muestras. 20  $\mu$ l de esta dilución se colocaron en tubos de ensayo y se adicionaron 2 ml del reactivo de color. Después de 30 min. se leyó la absorbancia a 520 nm. Para calcular la concentración de glucosa se preparó un patrón de referencia mezclando 2  $\mu$ l de solución de glucosa (100 mg/dl) y 2 ml del reactivo de color, se leyó a los 30 minutos. La concentración de la glucosa se calculó empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de glucosa} = \frac{Ab Pr}{Ab P} \times 100 \text{ mg/dl}$$

Donde:

Ab Pr = Absorbancia del patrón

Ab P = Absorbancia del problema

#### 4.9.6. DETERMINACION DE DBO Y DQO

Se determinó la DBO por el método de dilución y la DQO por el método del volumen fijo, a tres blancos y tres muestras (en laboratorio de Ecología del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería).

#### 4.9.7. DETERMINACION DE CLOROFENOLICOS

Se determinó la concentración de compuestos clorofenólicos a los blancos y muestras del octavo día. Para esto se deben derivar las muestras, ya que los clorofenoles no poseen las propiedades adecuadas para determinarlos por cromatografía de gases.

Se pesaron 3.6 g. de anhídrido cloroacético y se disolvieron en 12 ml de acetona (para tener 300 mg/ml).

A parte, se tomaron 10 ml de sobrenadante y se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 50 ml rotulado como fase acuosa. Se adicionó, 1 g de carbonato de potasio y se agitaron para su disolución. Posteriormente se adicionaron 10 ml de éter de petróleo y 1 ml de la solución de anhídrido acético. Se dejó reaccionar por 1 minuto, con agitación y se pasó la mezcla a un embudo de separación. La fase orgánica se depositó en otro matraz y a la fase acuosa se le adicionaron otros 10 ml de éter y 1 ml de solución de anhídrido acético. Se agitó otro minuto y se volvieron a separar las fases. La fase orgánica se juntó con la anterior y a la acuosa, se le adicionaron otros 10 ml de éter de petróleo y 1 ml de solución de anhídrido acético. Se agitó durante 8 minutos y juntó nuevamente la fase orgánica y ahora a la fase acuosa se le adicionó 10 ml de éter de petróleo, se agitó durante un minuto y se separaron las fases nuevamente. Una vez realizado esto, a la fase orgánica se le adicionaron 3 ml de isooctano y sulfato de sodio, para eliminar el agua. Por último la fase orgánica se transfirió a un vaso de precipitados y se dejó evaporar hasta sequedad, el residuo se aforó a 10 ml con isooctano. De esta dilución, se tomaron 3  $\mu$ l y se inyectaron a un cromatógrafo de gases equipado con un detector de captura de electrones y un integrador.

Los estándares de prepararon de igual manera, la presencia y concentración de los compuestos clorofénlicos se determinó comparando los cromatogramas y considerando la dilución.

## **5. RESULTADOS**

**Tabla I Análisis químico del agua residual del blanqueo de la pulpa de bagazo de caña.**

ANALISIS	VALOR
pH	9.59
Color	5366.66 U.C.
Azúcares Totales	0.26 mg/ml
Nitrógeno Total	6.30 mg/l
DBO	800.00 mg/l
DQO	2666.67 mg/l

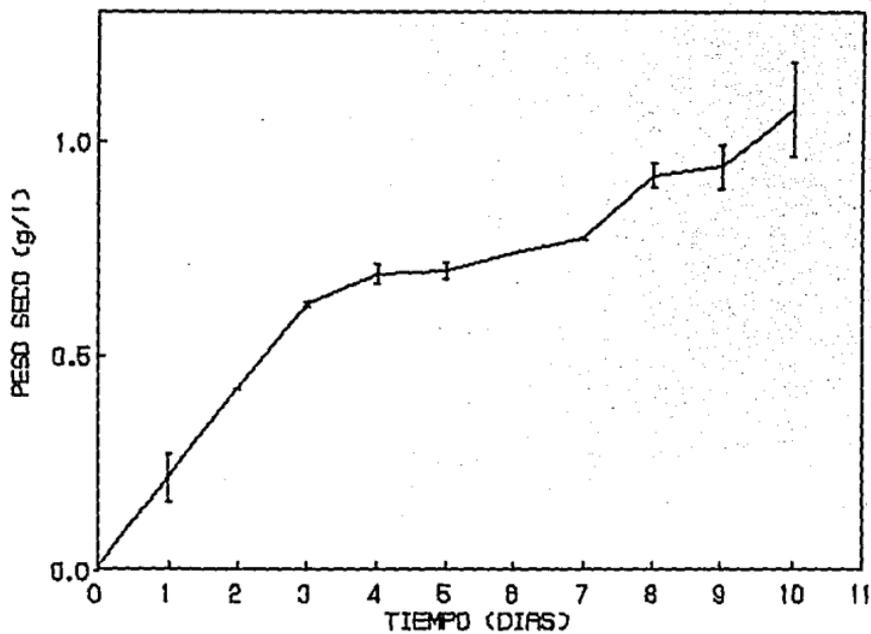


Figura 1. Curva de crecimiento de *Phanerochaete chrysosporium* en medio Kirk.

Condiciones: inóculo del 10% (ajustado a 0.5 a 650 nm), 30 ml de medio, 37°C y 150 rpm.

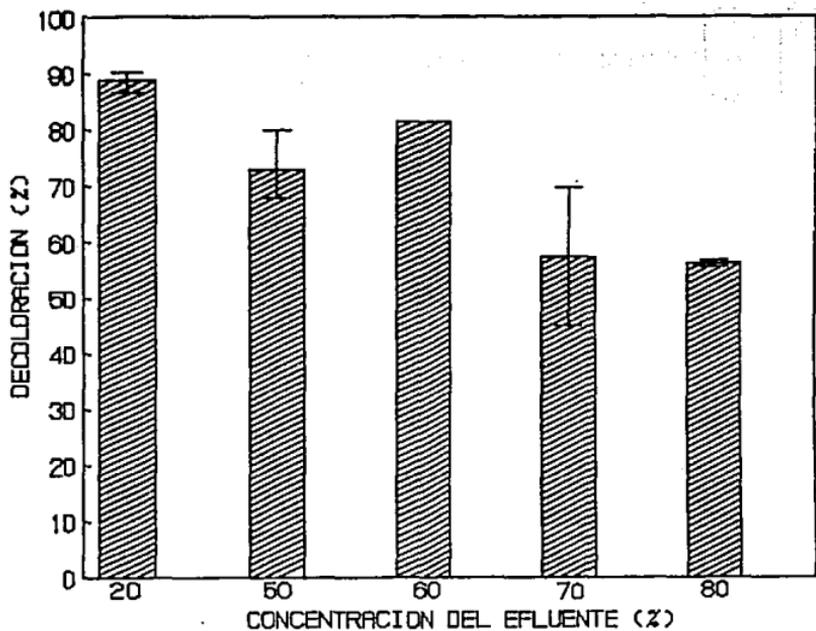
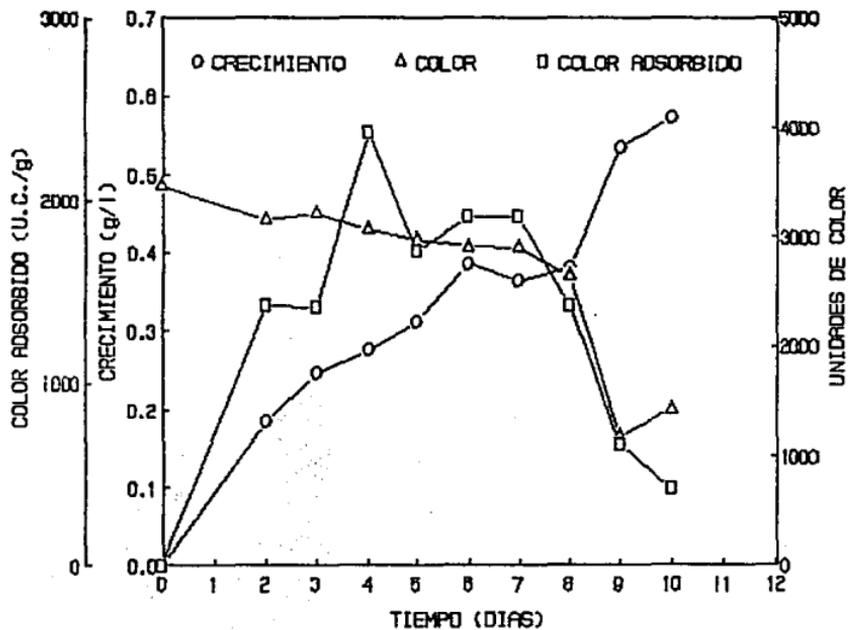


Figura 2. Decoloración del efluente alcalino a diferentes concentraciones (20, 50, 60, 70 y 80% v/v en medio Kirk).

Condiciones: inóculo del 10%, 37°C, 150 rpm, durante 10 días.



**Figura 3.** Crecimiento micelial, disminución de color y adsorción de color del efluente alcalino al 60% en medio Kirk (V/V), empleado *P. chrysosporium*.

Condiciones: 30 ml de medio, inóculo del 10%, 37°C, 150 rpm, durante 10 días.

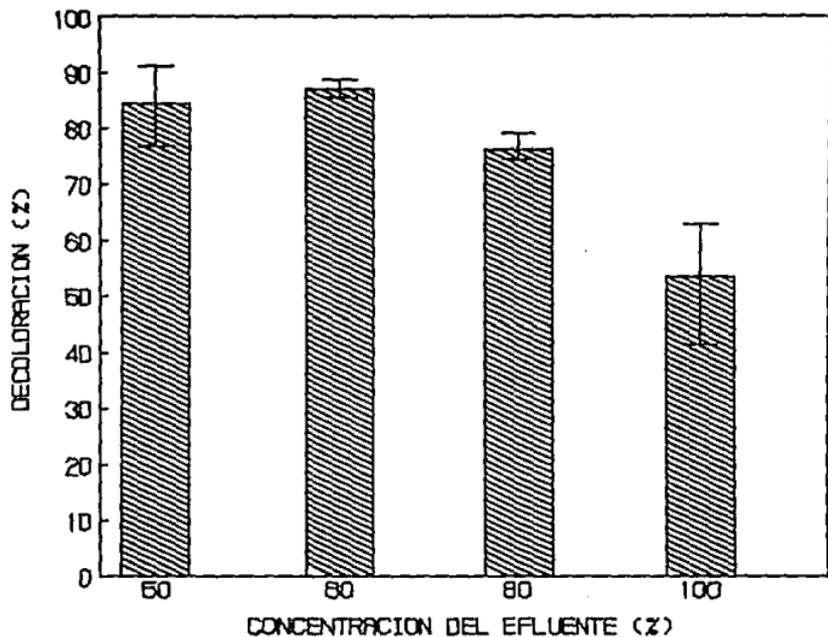


Figura 4. Decoloración del efluente a diferentes concentraciones en agua, enriquecido con el medio basal de Kirk.

Para este caso los nutrientes del medio Kirk se disolvieron en el efluente ya filtrado y con el pH ajustado a 4.5 y se ajustó con agua para obtener una concentración del efluente del 50, 60%, 80 y 100%.

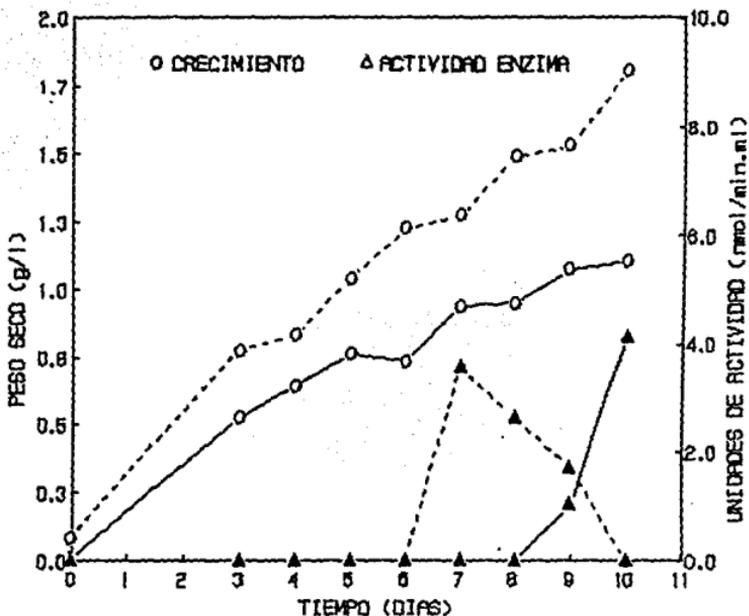


Figura 5. Actividad ligninolítica y peso seco de *P. chrysosporium* en función del tamaño de inóculo.

Crecimiento del hongo y actividad enzimática utilizando el inóculo normal (10%): ○—○ y ▲—▲ respectivamente; crecimiento y actividad enzimática empleando el inóculo aumentado (20%): ○—○ y ▲—▲ respectivamente.

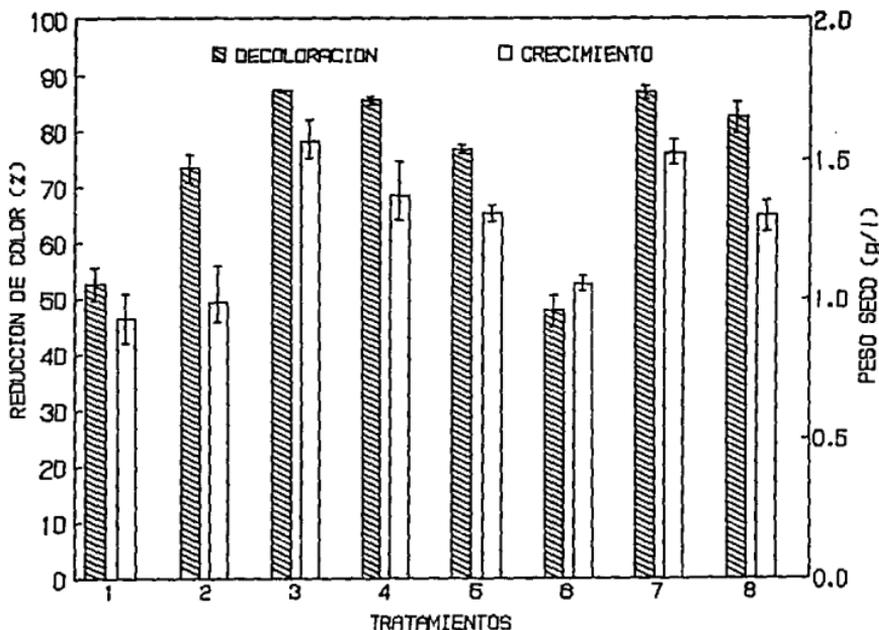
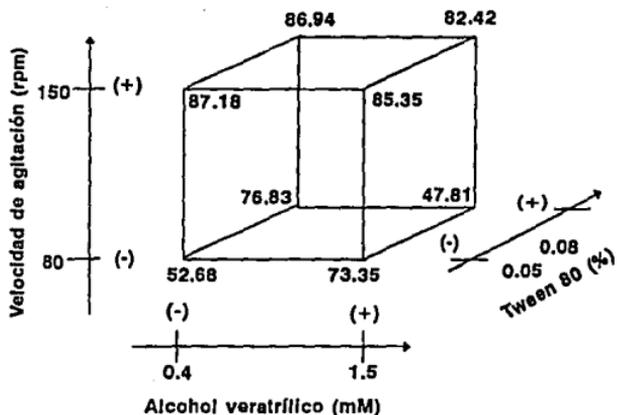


Figura 6. Disminución de color del efluente alcalino en función de la velocidad de agitación, la adición de Tween 80 y alcohol veratrflico.

Condiciones: 30 ml de medio, 37°C, inóculo del 20%, tiempo de incubación 8 días; 1: 0.4 mM de alcohol veratrflico, 80 rpm, 0.05% de Tween 80; 2: 1.5 mM de alcohol veratrflico, 80 rpm, 0.05% de Tween 80; 3: 0.4 mM de alcohol veratrflico, 150 rpm, 0.05% de Tween 80; 4: 1.5 mM de alcohol veratrflico, 150 rpm, 0.05% de Tween 80; 5: 0.4 mM de alcohol veratrflico, 80 rpm, 0.08% de Tween 80; 6: 1.5 mM de alcohol veratrflico, 80 rpm, 0.08% de Tween 80; 7: 0.4 mM de alcohol veratrflico, 150 rpm, 0.08% de Tween 80; 8: 1.5 mM de alcohol veratrflico, 150 rpm, 0.08% de Tween 80.



A V T DEG

- - - 52.68 1  
 + - - 73.35 a  
 - + - 87.18 b  
 + + - 85.35 ab  
 - - + 76.83 c  
 + - + 47.81 ac  
 - + + 86.94 bc  
 + + + 82.42 abc

A = Alcohol veratrílico  
 V = Velocidad de agitación  
 T = Tween 80  
 DEG = % de degradación

Figura 7. Representación cúbica de los resultados del diseño factorial  $2^3$

Tabla II Efecto de las variables estudiadas sobre la decoloración del efluente

EFFECTO	ESTIMACION
Efectos Principales	
Alcohol veratrílico (A)	-3.6700
Velocidad de agitación (B)	22.8050
Tween 80 (C)	-1.1425
Interaccion entre dos factores	
A x B	0.4975
A x C	-13.0950
B x C	-0.4450
Interacción de tres factores	
A x B x C	11.7475

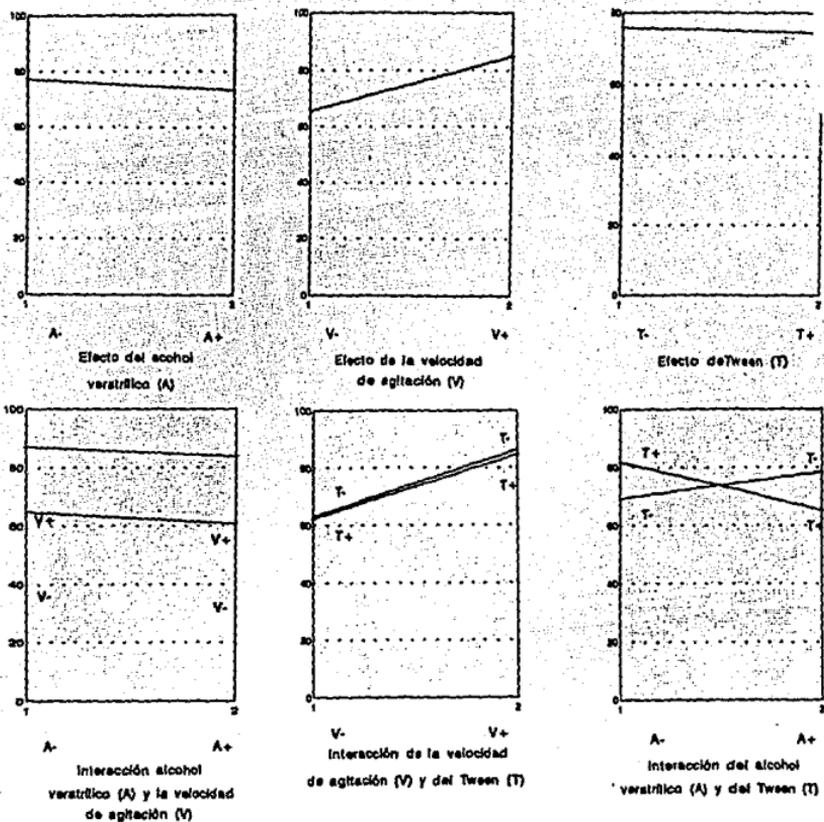


Figura 8. Representación gráfica de las interacciones entre las variables: concentración de alcohol veratrilico, velocidad de agitación y concentración de Tween 80.

Tabla III ANOVA para el diseño factorial 2<sup>3</sup>.

FUENTE	G.L.	S.C.	T	Pr >  T
Intercepto	1	-	103.6530	0.0001
A	1	54.0225	-2.5710	0.0331
B	1	2080.2721	15.9560	0.0001
AB	1	0.9900	0.3480	0.7368
C	1	5.2212	-0.7990	0.4472
AC	1	685.9161	-9.1620	0.0001
BC	1	685.9161	-0.3110	0.7635
ABC	1	0.7921	8.2190	0.0001

A = Alcohol fermentado  
 B = Velocidad de agitación  
 C = Temperatura

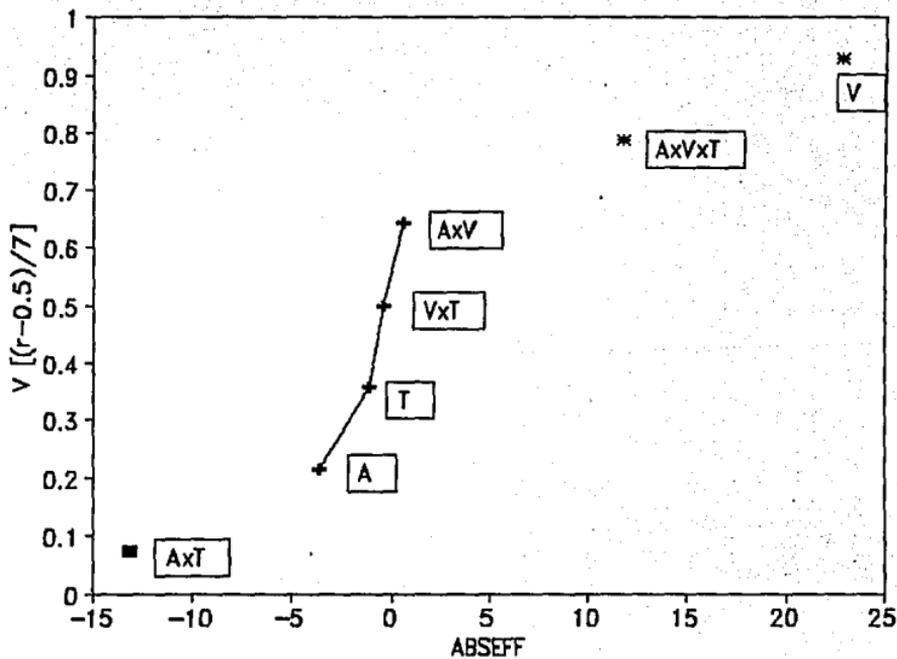


Figura 9. Curva de probabilidad normal para los residuales del diseño factorial  $2^3$ .  
 $V$  = valores de probabilidad, ABSEFF = efecto de las variables.

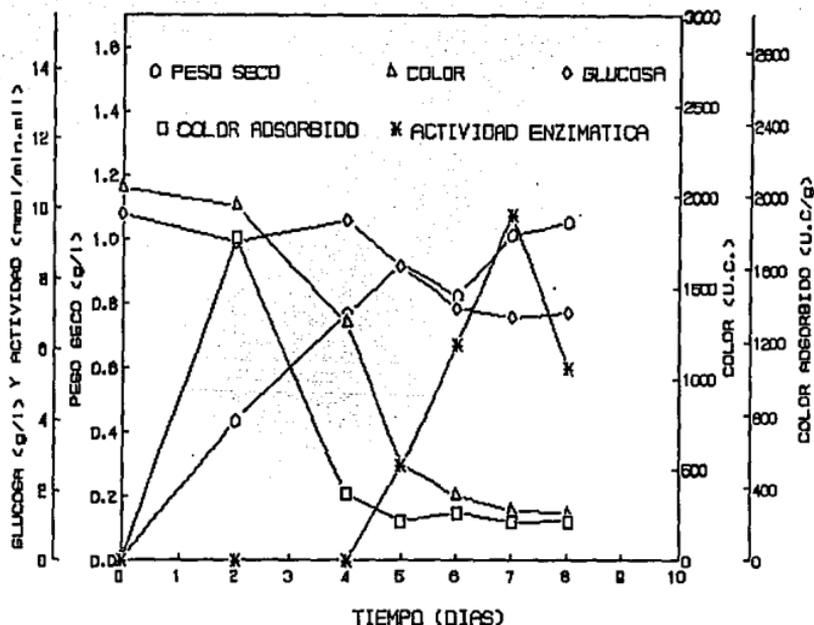


Figura 10. Cinética de decoloración del efluente alcalino al 60% (v/v), bajo las mejores condiciones obtenidas

Condiciones: Inóculo del 20% ( $6 \times 10^6$  esporas/ml),  $37^\circ\text{C}$ , 150 rpm, 0.4 mM de alcohol veratrílico, 0.05% de Tween 80, durante 8 días.

El porcentaje de decoloración fue del 87.30%, la reducción de la DBO fue del 44.53% (DBO inicial: 8111.19 mg/ml, DBO final: 4498.87 mg/ml) y la disminución de la DQO fue del 34.55% (DQO inicial: 14777.76 mg/ml, DQO final: 9671.10 mg/ml)

**Tabla IV Degradación de los compuestos clorofenólicos contenidos en el efluente alcalino.**

COMPUESTO	DEGRADACION (%)
Diclorofenol	32.68
2,4,6, Triclorofenol	71.99
Triclorofenol	16.60
2,3,5,6 Tetraclorofenol	54.99
Pentaclorofenol	90.86

Condiciones: 60% de efluente, inóculo del 20% ( $6 \times 10^8$  esporas/ml), 37°C, 150 rpm, 0.4 mM de alcohol veratrílico, 0.05% de Tween 80, durante 8 días.

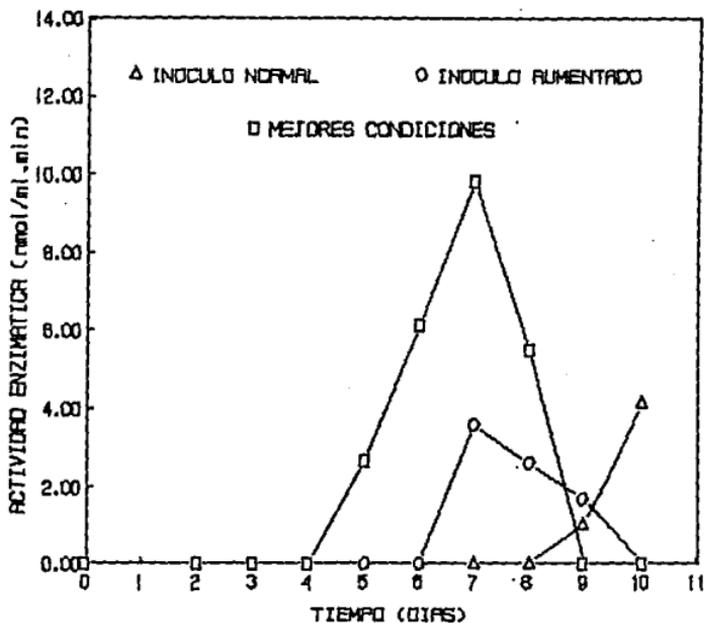


Figura 11. Comparación de la actividad ligninolítica de *P. chrysosporium* bajo las diferentes condiciones empleadas.

1. Inóculo normal (10%): el inóculo se ajustó a 0.5 de absorbancia a 654 nm; 2. Inóculo aumentado (20%): el inóculo se ajustó a 1.0 de absorbancia a 650 nm y 3. Las mejores condiciones obtenidas: inóculo del 20%, 0.4 mM de alcohol veratrílico y 0.05% de Tween 80. Todos se incubaron a 37°C y a 150 rpm.

## 6. DISCUSION DE RESULTADOS

## 6.1. ANALISIS DEL EFLUENTE

En la Tabla I, se muestran los resultados de los análisis realizados al agua residual sin tratamiento. Se observa que el efluente tiene un bajo contenido de nitrógeno total, por lo que no es necesario hacer un ajuste de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo, ya que no rebasa el límite requerido (2-3 mM), reportado por Kirk y col. (1985), para que se induzca la síntesis del sistema enzimático que interviene en la degradación de la lignina y sus derivados clorados.

Tampoco el contenido de azúcares reductores es elevado para efectuar la composición del medio basal Kirk, ya que, sólo contiene 2.6 mg/l y además, la glucosa se está adicionando en exceso, esto es, 10 g/l.

## 6.2. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Phanerochaete chrysosporium* EN MEDIO KIRK

En la Figura 1 se presenta la curva de crecimiento de *Phanerochaete chrysosporium* CDBB h-298 en medio Kirk. En esta gráfica se aprecia la fase de crecimiento exponencial comprendida entre el día 0 y 3, la fase de desaceleración en el 3-4 día y la fase de crecimiento estacionario desde el día 4 al 7, después se observa un incremento en el peso.

Según los reportes de Keyser y Kirk (1978), la fase de crecimiento exponencial termina en el segundo día de incubación y la actividad ligninolítica se presenta 3 días después del agotamiento de la fuente de nitrógeno (0-24 hr) ó 1-2 días después de que termina la fase de crecimiento acelerado. En el mismo reporte (Keyser y Kirk, 1978), el hongo agota la fuente de nitrógeno cuando alcanza un peso seco de aproximadamente 0.553 g/l, considerando esto, se podría decir, que en este caso, la fuente de nitrógeno se agotó en el tercer día y no en el primer día como se ha reportado, esto explicaría un poco el desfase obtenido en la curva de crecimiento, sin embargo, debido a que se trata de otra cepa y se tienen condiciones diferentes, esta suposición no es muy válida. Un parámetro más confiable para poder concluir; es la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), ésta se calculó por regresión lineal y resultó ser muy similar a la obtenida por Keyser y Kirk (1978). La obtenida aquí fue de 0.03846 hr<sup>-1</sup> y la de ellos fue de 0.0429 hr<sup>-1</sup>, lo que da un tiempo de duplicación de 18.02 hr para la primera y de 16.15 hr para la segunda. Con esta información se puede decir, entonces, que el retraso en el crecimiento se debe a otro factor. Es importante considerar que no se trata de la misma cepa y que las condiciones manejadas en este trabajo y las utilizadas por estos investigadores no fueron idénticas (ellos emplearon una temperatura de incubación de 39-40°C), además manejaron condiciones de oxigenación controladas y en este trabajo, se empleó una temperatura de incubación de 37°C y matraces agitados solamente, entre otras diferencias adicionales en las condiciones de cultivo. Por lo que es de esperarse que existan diferencias entre los resultados reportados y los que aquí se obtuvieron ya que son sistemas diferentes.

Por otra parte, el aumento en el peso seco que se observa a partir del octavo día, también fue detectado por Leisola y col. (1982, 1983), ellos observaron una nueva etapa de crecimiento del hongo después de que se alcanzó la fase de crecimiento estacionario, así como la síntesis intra y extracelular de un polisacárido, de tipo glucano, al mismo tiempo que la síntesis del sistema ligninolítico. De esta manera, ellos atribuyeron este incremento en la biomasa a un aumento en los carbohidratos unidos a la membrana.

En este caso, se observó una gran aumento en la viscosidad del medio de cultivo a partir del día 7, lo que dificultaba mucho la filtración de estas muestras. Este hecho hizo suponer que el hongo estaba produciendo el polisacárido reportado por Leisola. Un análisis de una muestra por HPLC confirmó esta suposición, ya que se detectó la presencia de un polisacárido, aunque no se determinó el tipo de polisacárido (Arrollo, 1994).

De esta manera se justificó el incremento en el peso seco, pues al filtrar las muestras a través de las membranas de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro, el polisacárido extracelular fue retenido en ellas, lo cual aunado con el incremento en los carbohidratos celulares, dió como resultado un aumento en el peso seco.

### **6.3. SELECCION DE LA CONCENTRACION DEL EFLUENTE**

En la Figura 2, se presentan los porcentajes de decoloración del afluente a varias concentraciones (v/v en medio Kirk), en ella se observa que se obtiene una mayor decoloración a una concentración del 20%, sin embargo, se seleccionó la concentración del 60% como la óptima para la decoloración del efluente ya que tiene un porcentaje de decoloración similar a la anterior y por que en ese caso las muestras están más concentradas.

### **6.4. CINETICA DE DECOLORACION DEL EFLUENTE DILUIDO AL 60% (V/V)**

En base a lo anterior se corrió una cinética de decoloración del afluente al 60% v/v en medio Kirk como diluyente, ésta se muestra en la Figura 3. En esta se observa que la fase de crecimiento exponencial se prolonga hasta el sexto día y la fase de crecimiento estacionario se presenta entre el sexto y el octavo día, 3 días después del obtenido en la cinética patrón en medio basal Kirk. Este desplazamiento puede deberse un poco a que el efluente alcalino, contenía una pequeña cantidad de nitrógeno, 6.30 mg/l, es decir, 0.270 mM en el medio con 60% de efluente, lo que aumentó la concentración de nitrógeno en este, de 2.40 mM a 2.67 mM, que aunque no se rebasa el límite establecido, sí modifica ciertamente el crecimiento del hongo, ya que al tener más nitrógeno disponible, el microorganismo crece hasta que éste se agota. Esto claro, en el caso de que el nitrógeno presente en el efluente sea asimilable por el

hongo.

En esta cinética se observó la presencia del sistema enzimático en el noveno día de cultivo. Como se aprecia, el crecimiento se incrementó en el día 9 y el color del efluente disminuyó considerablemente en ese mismo día. Por los resultados de la curva de crecimiento y disminución de color se infiere que el hongo está utilizando en esta fase de crecimiento compuestos cromóforos (lignina) como nueva fuente de carbono a partir de ese día y por ello se registra una disminución en el color y además, un aumento en el peso seco, estos resultados podrían ser ocasionados también a que el hongo produce un polisacárido intra y extracelularmente al mismo tiempo que se desarrolla la actividad enzimática del sistema, ya que este comportamiento se presentó también en la cinética patrón, en donde sólo se empleó la glucosa como fuente de carbono teniéndose un aumento en el peso seco. En este caso, al disminuir paulatinamente el color en el efluente, indudablemente, están desapareciendo los compuestos cromóforos, lo que apoya en parte la suposición anterior.

Por otro lado, debido a que se observó adsorción de color en el micelio del hongo (pellets), se decidió medir la cantidad color absorbido por mg de micelio. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3. En ella se observa que ocurre una máxima adsorción de color en el cuarto día y que ésta va disminuyendo paulatinamente hasta el séptimo día, en este momento la liberación del color adsorbido se hace más pronunciada.

El fenómeno de adsorción durante la degradación de la lignina fue observado primeramente por Janshekar y col. (1982), ellos observaron que la lignina y sus fragmentos se unen al micelio del hongo durante el proceso de degradación con un enlace de tipo covalente, el cual se da entre los polisacáridos de la pared celular. De esta manera, la lignina queda inmovilizada y es entonces cuando actúan las enzimas ligninolíticas, dando lugar a productos solubles en agua y compuestos de bajo peso molecular. Posteriormente, Frederick y col. (1991); Schliephake y col. (1993), observaron también la unión de color al micelio durante la degradación de efluentes Kraft, el primero la observó en *Phanerochaete chrysosporium* y el segundo en *Pycnoporus cinnabarinus* (otro hongo de la pudrición blanca). Esto apoya la afirmación de que una parte de la ligninasa producida por *P. chrysosporium* se encuentra asociada a la pared celular y justifica el fenómeno de desorción que se presentó en la cinética de decoloración del efluente alcalino.

## 6.5. EFECTO DEL AJUSTE DE NUTRIENTES EN LA REDUCCION DE COLOR DEL AFLUENTE

En la Figura 4 se muestra la reducción de color del efluente alcalino a diferentes concentraciones. En este caso los medios de cultivo se prepararon de manera diferente: los componentes del medio Kirk se disolvieron en el efluente (filtrado y con el pH ajustado a 4.5), después se aforó a un litro con suficiente agua destilada para obtener la concentración deseada de efluente (50, 60, 80 y 100 %). Entonces 30 ml de cada medio se inocularon con 3 ml de

suspensión de esporas (Absorbancia de 0.5 a 650 nm). Como se observa, esta manera de preparar el medio y de inocular resultó en un incremento en los porcentajes de decoloración en todas las concentraciones ensayadas, como se observa en la Figura 4, además, de que confirmó la elección del 60% como la de mayor decoloración del efluente.

## 6.6. EFECTO DEL TAMAÑO DE INOCULO EN LA REDUCCION DE COLOR DEL EFLUENTE ALCALINO

Debido a que la actividad enzimática se presentó en el noveno día, se decidió aumentar el inóculo, ya que se observó que cuando el peso seco es mayor de 0.8-1.0 gr aproximadamente, la actividad ligninolítica ya es detectable. El inóculo se duplicó con el propósito de obtener la actividad enzimática en la mitad del tiempo.

En la Figura 5 se presentan los resultados del incremento en el inóculo ( $20\%$ ,  $6 \times 10^6$  esporas/ml) y se comparan con los del inóculo normal ( $10\%$ ,  $3 \times 10^6$  esporas/ml). Como se observa, con un inóculo normal, la actividad se presentó en el noveno día, cuando el peso seco fue de aproximadamente 1.078 gr, lo que confirma lo obtenido en la cinética de decoloración. En el caso del inóculo aumentado, la actividad se presentó cuando se alcanzó un peso seco de aproximadamente 1.276 gr, es decir, en el séptimo día. Cabe hacer notar que el título de la enzima tiene un máximo en ese día, por lo que se puede suponer que la actividad pudo haberse presentado desde el sexto día, pero debido a que se muestreó cada 24 hrs, no se pudo detectar su presencia, en caso de que se hubiera presentado entre las 23 hrs siguientes al muestreo. Según los reportes de Kirk y col. (1978), la actividad ligninolítica se presenta entre el tercer y cuarto día de cultivo, empleando un inóculo del 10%, una temperatura de incubación de  $39^\circ\text{C}$  y una presión de oxígeno del 100%, la falta de oxigenación y la temperatura de incubación empleadas deben de ser las principales razones por las que se retrasó la aparición de la actividad enzimática en este sistema.

## 6.7. DISEÑO FACTORIAL $2^3$

En base a los resultados anteriores se decidió trabajar con un inóculo del 20% y con ajuste de nutrientes, para el diseño factorial, el cual tiene como finalidad determinar el efecto de las variables manejadas y/o su posible interacción, en la biodegradación del agua residual. Los resultados de este diseño se presentan en la Figura 6. Como se observa, la mayor decoloración se obtuvo con el tratamiento 3, después de ocho días de cultivo. Los tratamientos 4 y 7 tuvieron un porcentaje de decoloración cercano al tratamiento 3, la diferencia en estos tres tratamientos está en las concentraciones de Tween 80 y alcohol veratrílico, la velocidad de agitación fue la misma en los tres, lo que indica que la concentración de estos dos compuestos tiene un efecto insignificante en la degradación de la lignina, pero la adición de ambos si tiene

un efecto significativo cuando se trabaja a en el nivel alto de la velocidad de agitación (150 rpm). La velocidad de agitación de 150 rpm permitió una buena aireación. Se esperaba que a una agitación mas alta incrementaría la aireación, sin embargo un experimento, no reportado, en donde se aumentó la velocidad de agitación a 210 rpm, empleando las condiciones del tratamiento 3, no logró aumentar el porcentaje de decoloración, ya que éste fue del 87.17%, similar al obtenido con el tratamiento 3.

La selección del tratamiento se realizó, en base a la concentración del Tween 80, y alcohol veratrílico, siendo el tratamiento 3 el seleccionado, debido a que en éste, la concentraciones de los dos fueron las mínimas probadas, 0.05% y 0.4 respectivamente.

En la Figura 7 se muestran los resultados del diseño de experimentos 2<sup>1</sup> para la decoloración del efluente, como una función de la concentración del alcohol veratrílico, de la velocidad de agitación y la concentración del Tween 80. Como se aprecia, en el nivel alto de la velocidad de agitación se tiene la mayor degradación, mientras en que el nivel bajo, la decoloración es mucho menor. Con alcohol veratrílico y Tween 80, no se aprecia un efecto significativo cuando se trabaja en los niveles altos o en los bajos de éstos, pero cuando se combina con una alta velocidad de agitación la decoloración aumenta.

El análisis de varianza (ANOVA) del diseño factorial (mostrado en la tabla III, empleando el programa SAS, ratificó lo anterior, ya que este indica que la concentración del Tween 80 y del alcohol veratrílico no tienen un efecto significativo en la degradación de los cromóforos en el efluente ya que el valor de T calculada para ambos es menor que la de tablas, sin embargo, la velocidad de agitación sí tiene un efecto significativo en la decoloración, lo mismo que las interacción entre el alcohol veratrílico y el Tween 80 así como la triple interacción.

La comprobación de los efectos calculados se corrobora con los valores reportados en la tabla II. Estos valores indican el grado con que es afectada la decoloración del efluente por las tres variables estudiadas, así como el efecto de la combinación de dos y tres de éstas. Por lo que, para el caso del alcohol veratrílico, si se aumenta la concentración de 0.4 a 1.5, el porcentaje de decoloración disminuye 3.67%, por otro lado, si se aumenta la velocidad de agitación de 80 a 150 rpm, la reducción de color aumenta en un 22.80%, lo que ratifica una vez mas el análisis de varianza. Por otra parte, si se incrementa la concentración de Tween 80, el porcentaje de decoloración disminuye 1.14%. De todas las interacciones entre las variables, sólo la combinación alcohol veratrílico-velocidad de agitación y la combinación de la tres tienen un efecto positivo en el porcentaje de decoloración, para la primera ésta aumenta 0.2487 % y para la segunda 5.87%, eso se corrobora también en la Figura 8, en donde se representan las interacciones entre las variables estudiadas. Como se aprecia sólo en la interacción alcohol-velocidad de agitación se cruzan las líneas de los valores de la variable de respuesta a los dos niveles establecidos, lo que indica que sí existe interacción entre esas variables. En la curva de probabilidad normal (Figura 9), también se corroboran los efectos calculados por el ANOVA, como se aprecia, los únicos puntos que no siguen el comportamiento lineal son, la velocidad de agitación y a las interacciones alcohol veratrílico-velocidad de agitación y la triple interacción.

Confirmando esto que la única variable que afecta significativamente a la reducción de color, en el rango seleccionado, es la velocidad de agitación y las dos interacciones antes mencionadas. Los datos se ajustaron a un modelo cuadrático representado por la siguiente ecuación:

$$DEC = 74.073 - 1.839A + 11.40V - 0.5713T + 74.076A^2 + 0.2488AV - 6.5462AT - 0.224VT$$

Donde:

A = Concentración de alcohol veratrílico

V = Velocidad de agitación

T = Concentración de Tween 80

DEC = Decoloración del efluente

Los resultados de la cinética de decoloración del efluente al 60% (v/v) con las mejores condiciones se presentan en la Figura 10. En ella se observa que la actividad enzimática se presenta desde el quinto día, siendo máxima en el séptimo día, la disminución del color fue más prominente, también en el quinto día, la adsorción de color fue casi nula a partir de ese momento y el crecimiento micelial alcanzó su primer máximo también en el quinto día, similarmente como ocurrió en la cinética patrón y en la primera cinética de decoloración, el peso aumentó después nuevamente, en este caso en el séptimo día. En cuanto al consumo de glucosa, se observa que este es pequeño, ya que sólo se consume el 30% aproximadamente, lo que coincide con lo reportado anteriormente por Keyser y Kirk (1978), quienes reportan un consumo de glucosa de aproximadamente un 40%.

La reducción del color fue del 87.30 % después de 8 días, similar a la obtenida en el diseño factorial. La baja reducción de la DBO (44.53%) se debe principalmente a que se le está adicionado glucosa al medio (10 gr/l) lo que incrementa mucho el valor de este parámetro, pues como se observó anteriormente, para el efluente sin tratar la DBO fue de 800 mg/l, mientras que la del medio de cultivo (efluente enriquecido con glucosa y minerales del medio Kirk) fue de 8111.099 mg/l, diez veces más alta que el valor inicial. Esto puede evitarse, reduciendo la cantidad de glucosa adicionada, ya que como se observó, el hongo sólo consume el 30% de la fuente de carbono adicionada.

En la Figura 11, se presenta la actividad enzimática obtenida bajo las diferentes condiciones empleadas. Se observa que todas las modificaciones hechas tuvieron un efecto positivo sobre el sistema enzimático. Al aumentar el inóculo al 20%; se anticipó la síntesis de la ligninasa, pues esta se detectó en el séptimo día, por otra parte, al adicionar el Tween 80 y el alcohol veratrílico, manteniendo la velocidad de agitación en 150 rpm, además de presentarse cuatro o cinco días antes la síntesis del sistema enzimático (con respecto a la cinética inicial), es decir, empleando un 10% de inóculo, también aumentó el título de ésta de 4.12 a 9.88, aproximadamente 5.7 unidades.

Por otra parte cuando se cambió el método de separación, de filtración a centrifugación, se siguió presentando un aumento de peso después de la fase de crecimiento estacionaria, lo cual

puede deberse a la síntesis intracelular del polisacárido, que fue observado por Leisola y col. (1982). Por lo que se considera que la medición del crecimiento micelial por este método, no es muy fidedigna, debido a la producción intracelular y excreción del polisacárido antes mencionada y/o un nuevo crecimiento del hongo debido al consumo de los compuestos cromóforos tóxicos contenidos en el efluente, ya que como se observó, en la figura 10, una vez que se alcanza la fase estacionaria de crecimiento, la glucosa ya no se consume y sin embargo, aumenta el peso seco.

En la Tabla IV, se presentan los compuestos clorofenólicos detectado por cromatografía de gases el los filtrados de las muestras del octavo día así como del control del último experimento (con las mejores condiciones), en ella se aprecia que todos los clorofenoles presentes son degradados por el hongo, unos en menor proporción que otros. El compuesto clorofenólico que más se degradó fue el pentaclorofenol, el cual se redujo en un 90.86%. Esto confirma la suposición de que los compuestos tóxicos (cloroligninas y clorofenoles) contenidos en el licor alcalino, son utilizados también por el hongo como fuente de carbono, lo que justificaría un poco el aumento en el peso debido a un nuevo crecimiento, pues a pesar de que se cambió el método de separación se siguió presentado un aumento.

## **7. CONCLUSIONES**

En base a la cinética de crecimiento en medio Kirk, y en el efluente, se concluye que la fase de crecimiento estacionario se presenta entre el cuarto y el quinto día de incubación y que la actividad enzimática aparece cinco días después, esto en matraces agitados sin oxigenación.

En base a las cinéticas de decoloración, se concluye que la degradación de la lignina y sus derivados se lleva a cabo mediante dos mecanismos, el primero por la unión de estos compuestos al micelio fúngico para ser degradados por las enzimas asociadas a la pared celular del hongo y el segundo por la acción de la enzima excretada al medio de cultivo.

Se concluye, también, que *Phanerochaete chrysosporium* CDBB h-298 secreta un polisacárido al mismo tiempo que aparece el sistema ligninolítico. Este polisacárido, posiblemente, sirve al hongo como una fuente de energía de reserva.

La velocidad de agitación y la combinación de las variables velocidad de agitación, Tween 80 y el alcohol veratrílico favorecen la degradación de la lignina y sus derivados, ya que existe un cambio apreciable en la decoloración del agua residual debido a éstos factores, la velocidad de agitación y el Tween porque mejoran transferencia de oxígeno y el intercambio de nutrientes y el alcohol veratrílico porque activa la síntesis del sistema enzimático.

Las mejores condiciones para la reducción del color del efluente alcalino empleando a *P. chrysosporium* CDBB h-298 son: 60% de efluente enriquecido con el medio basal Kirk, 20% de inóculo, 2.4 mM de nitrógeno, 0.05% de Tween 80, 0.4 mM de alcohol veratrílico, pH del medio de 4.5, 37 °C y 150 rpm.

*Phanerochaete chrysosporium* CDBB h-298 es capaz de degradar a la lignina y a los compuestos clorofenólicos contenidos en el efluente alcalino, así como reducir el color de este, mediante la acción de su sistema enzimático. Lo que lo hace un organismo versátil para la degradación de los compuestos tóxicos contenidos en este tipo de desechos.

Por último se concluye que existe una estrecha correlación entre la remoción de color y la producción de la ligninasa, en el tratamiento de aguas residuales del pulpeo de bagazo de caña.

## **8. SUGERENCIAS**

Para posteriores investigaciones se sugiere:

1. Emplear un método adicional para medir el crecimiento del hongo como la determinación de nitrógeno o proteína celular.
2. Reducir la cantidad de glucosa que se adiciona al medio, esto en base a un desarrollo experimental. Pues se sabe que se requiere de un exceso de glucosa para soportar el metabolismo de la lignina.
3. Realizar experimentos de reducción de color empleando el efluente sin diluir y oxigenando hasta una saturación del 100%.
4. Hacer un seguimiento del contenido de clorofenoles y cloroligninas durante la decoloración del efluente.
5. Conservar el efluente estéril en un recipiente perfectamente sellado y almacenarlo a 0-4 °C, máximo por uno o dos meses.
6. Si se va a determinar la glucosa residual, emplear sólo el método enzimático, pues los métodos convencionales no son específicos para este carbohidrato, y como se observó la producción de un polisacárido, los valores que se obtienen con estos métodos son falsamente altos.
7. Realizar experimentos para determinar si son necesarias todas las vitaminas adicionadas para el crecimiento y la degradación de la lignina, ya que existen reportes de que sólo se requieren una de ellas (tiamina), aunque el crecimiento es un poco mejor con la mezcla completa (Kirk y Shultz, 1978).

## **9. APENDICE**

## 9.1. COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO KIRK

Para 1 litro de agua desionizada se pesaron las siguientes cantidades:

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ . . . . .	200.0 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . . . . .	50.0 mg
$\text{CaCl}_2$ . . . . .	80.0 mg
$\text{NH}_4\text{NO}_3$ . . . . .	48.0 mg
L-asparagina . . . . .	79.2 mg
Dextrosa . . . . .	10.0 gr
Solución de vitaminas . . . . .	0.5 ml
Solución mineral . . . . .	1.0 ml
pH (Ajustado con ácido 2,2-dimetilsuccínico) . . . . .	4.5

### Solución de minerales

Para 1 litro de agua desionizada se pesaron las siguientes cantidades:

Acido nitriloacético . . . . .	5.0 gr
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . . . . .	0.5 gr
$\text{NaCl}$ . . . . .	1.0 gr
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . . . . .	0.1 gr
$\text{CoSO}_4$ . . . . .	0.1 gr
$\text{ZnSO}_4$ . . . . .	0.1 gr
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . . . . .	10.0 mg
$\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ . . . . .	10.0 mg
$\text{H}_3\text{BO}_3$ . . . . .	10.0 mg
$\text{NaMoO}_4$ . . . . .	10.0 mg

### Solución de vitaminas

Para 1 litro de agua desionizada se pesaron las siguientes cantidades:

Biotina . . . . .	2.0 mg
Acido fólico . . . . .	2.0 mg
Clorhidrato de tiamina . . . . .	5.0 mg
Riboflavina . . . . .	5.0 mg
Clorhidrato de piridoxina . . . . .	10.0 mg
Cianocobalamina . . . . .	0.1 mg
Niacina . . . . .	5.0 mg
Pantotenato de calcio . . . . .	5.0 mg
Acido p-aminobenzoico . . . . .	5.0 mg
Acido dl-6,8-tióctico . . . . .	5.0 mg

## 9.2. PREPARACION DE LA CURVA DE CALIBRACION DE CLOROPLATINATO DE POTASIO

Se pesaron 1.246 g de cloroplatinato de potasio, (equivalente a 500 mg de metal platino) y 1.0 g de cloruro de cobalto (equivalente a 250 mg de metal cobalto) y se disolvieron en agua destilada que contenía 100 ml de ácido clorhídrico concentrado. Se aforó a 1000 ml con agua destilada. Esta solución es equivalente a 500 unidades de color (Taras, 1971).

A partir de esta solución se hicieron diluciones para obtener desde 0 hasta 500 unidades de color. Se leyó la absorbancia a 465 nm contra agua como blanco.

Tabla I Diluciones para preparar la curva de calibración de cloroplatinato de potasio.

SOLUCION PATRON (ml)	AFORO (ml)	UNIDADES DE COLOR (UC)
5.0	-	500
40.0	50	400
30.0	50	300
25.0	50	250
20.0	50	200
15.0	50	150
10.0	50	100
5.0	50	50
2.5	50	25
0.5	50	5
0.0	50	0

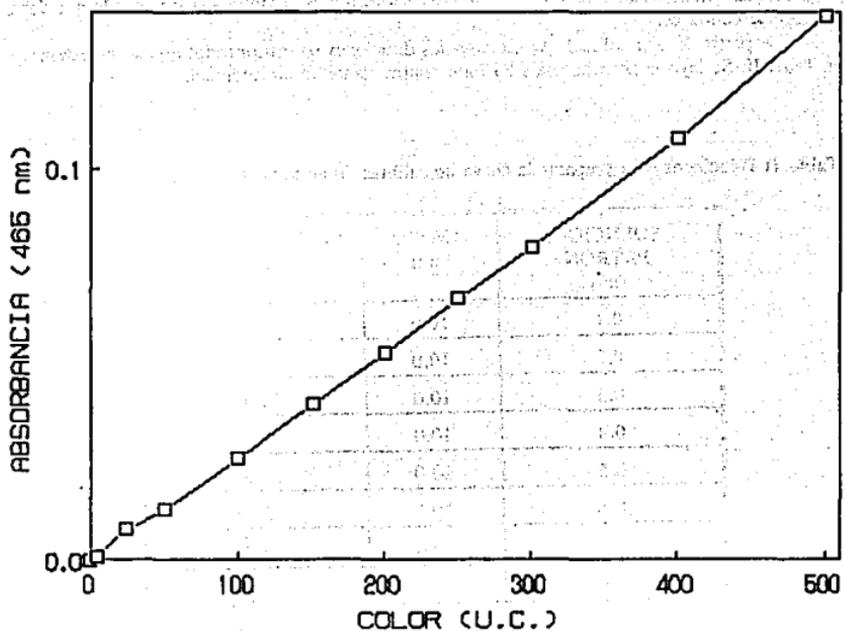


Figura 1. Curva de calibración de cloroplatinato de potasio.

A partir de la regresión lineal de esta curva, se planteó la siguiente ecuación para calcular las unidades de color a las muestras.

$$\text{Unidades de color} = \frac{Y \times 4.9938 \times 10^{-4}}{2.6944 \times 10^{-4}}$$

Donde: Y = Absorbancia de la muestra a 465 nm.

### 9.3. PREPARACION DE LA CURVA DE CALIBRACION DE VERATRALDEHIDO

Se pesaron 535 mg de veratraldehido y se disolvieron en etanol. La solución se transfirió a un matraz volumétrico y se aforó a 50 ml. Esta solución es sensible a la luz, por lo que debe protegerse contra ésta.

A partir de esta solución se hicieron las diluciones (por triplicado) que se muestran en la Tabla II. Se leyó la absorbancia a 310 nm contra etanol como referencia.

Tabla II Diluciones para preparar la curva de calibración de veratraldehido.

SOLUCION PATRON (ml)	AFORO (ml)	CONCENTRACION (nmol/ml)
0.1	10.0	10.53
0.2	10.0	21.06
0.3	10.0	31.59
0.4	10.0	42.12
0.5	10.0	52.65
0.6	10.0	63.18
0.7	10.0	73.71
0.8	10.0	84.24
0.9	10.0	94.77
1.0	10.0	105.31

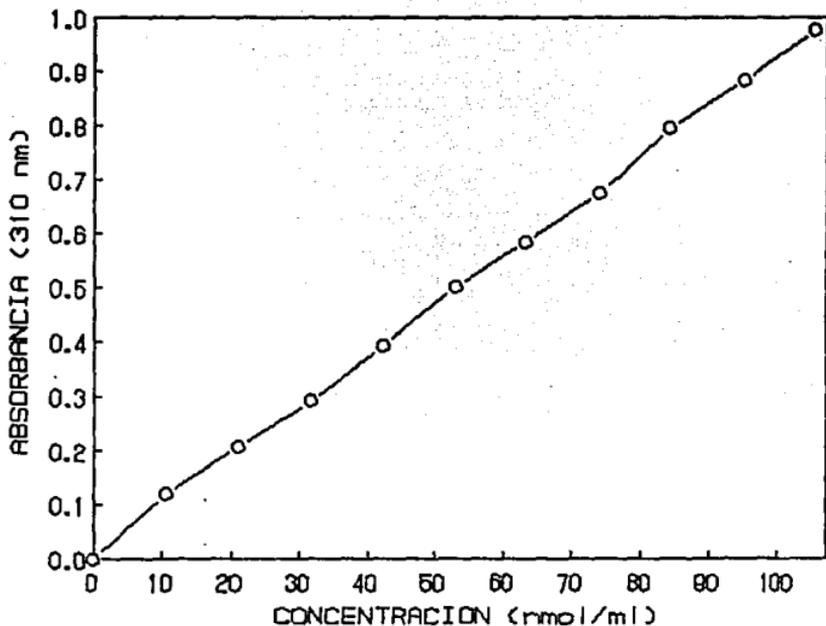


Figura 2. Curva de calibración de veratraldehído

A partir de la regresión lineal de esta curva, se planteó la siguiente ecuación, para calcular la cantidad de veratraldehído en los tubos de reacción:

$$\text{nmol/ml Veratraldehído} = \frac{Y - 9.6830 \times 10^{-3}}{9.1947 \times 10^{-3}}$$

Donde: Y = Absorbancia de la muestra a 310 nm.

**Tabla III** Tiempo de incubación y peso seco de *P. chrysosporium* empleando el medio basal Kirk.

TIEMPO (Días)	PESO SECO (g/l)
0	0.0003
1	0.2667
2	0.4167
3	0.6200
4	0.6900
5	0.7000
6	0.7400
7	0.7733
8	0.9217
9	0.9417
10	1.0750

Condiciones de cultivo: 30 ml de medio, inóculo del 10% (ajustado hasta una absorbancia de 0.5 a 650 nm), 37°C, 150 rpm, durante 10 días.

Tabla IV Disminución de color del efluente alcalino a varias concentraciones en medio Kirk como diluyente.

CONCENTRACION (%, v/v)	PESO SECO (g/l)	COLOR INICIAL <sup>1</sup> (U.C.)	COLOR FINAL <sup>2</sup> (U.C.)	DECOLORACION (%)
20	1.7133	1357.50	224.53	83.47
50	0.7500	3047.04	822.07	73.02
60	0.7066	3729.94	699.59	81.24
70	0.5200	4294.06	2404.36	57.26
80	0.3766	4769.12	2096.31	56.04

1. Blancos: matraces Erlenmeyer con 30 ml de la mezcla de efluente/medio Kirk correspondiente, sin inocular.  
 2. Matraces inoculados con 10% de suspensión de esporas de *P. chrysosporium* en relación al medio Kirk en cada mezcla.

Ambos incubados a 37°C y 150 rpm durante 10 días.

**Tabla V** Decoloración del efluente alcalino al 60 % en medio Kirk como diluyente, empleando *P. chrysosporium*.

TIEMPO (Días)	PESO SECO (g/l)	COLOR (U.C.)	COLOR ADSORBIDO (U.C./g micelio)
0	0.00066	3470.13	0.00
2	0.18500	3154.67	1421.72
3	0.24500	3214.06	1415.40
4	0.27540	3071.17	1942.40
5	0.31166	2985.81	1378.14
6	0.38666	2900.72	1912.19
7	0.36333	2898.59	1908.85
8	0.38166	2638.79	1420.70
9	0.53499	1182.07	668.72
10	0.57333	1430.73	425.87

Condiciones: 30 ml de medio: efluente/medio Kirk (60%), inóculo del 10%, 37°C, 150 rpm, durante 10 días.

Tabla VI Disminución de color del efluente alcalino a varias concentraciones con ajuste de nutrientes empleando a *P. chrysosporium*.

CONCENTRACION (%, v/v) <sup>1</sup>	PESO SECO (g/l)	COLOR INICIAL (U.C.)	COLOR FINAL (U.C.)	DECOLORACION (%)
50	1.3328	2546.00	398.97	84.33
60	1.7086	2991.36	412.58	86.21
80	1.7777	4041.69	2411.57	40.33
100	2.0110	5192.25	2418.57	53.42

1. Se disolvieron los componentes del medio Kirk en el volumen correspondiente de efluente filtrado y ajustado a pH 4.5, se aforó a un litro con agua destilada y el pH se ajustó con ácido 2,2-dimetil succínico. Condiciones de cultivo: 30 ml. de medio, inóculo 10 % (3 ml) para todas las concentraciones, 37°C, 150 rpm, durante 10 días.

Tabla VII Crecimiento y actividad ligninolítica de *Phanerochaete chrysosporium* en función del tamaño de inóculo.

TIEMPO (días)	Inóculo normal <sup>1</sup>		Inóculo aumentado <sup>2</sup>	
	PESO SECO (g/l)	ACTIVIDAD*	PESO SECO (g/l)	ACTIVIDAD*
0	0.0067	0.000	0.0850	0.000
2	0.4633	0.000	-	-
3	0.5317	0.000	0.7766	0.000
4	0.6467	0.000	0.8333	0.000
5	0.7667	0.000	1.0416	0.000
6	0.7367	0.000	1.2266	0.000
7	0.9383	0.000	1.2733	3.547
8	0.9533	0.000	1.4933	2.618
9	1.0783	1.026	1.5360	1.678
10	1.1067	4.120	1.8116	0.000
11	-	-	1.8333	0.000

1. El inóculo se ajustó a 0.5 de absorbancia a una longitud de onda de 650 nm.

2. El inóculo se ajustó a 1.0 de absorbancia a una longitud de onda de 650 nm.

\* La actividad enzimática está dada en  $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{ml}$

**Tabla VIII** Efecto de la velocidad de agitación, adición de Tween 80 y alcohol veratrilico sobre la disminución de color del efluente alcalino al 60%.

EXPERIMENTO	PESO SECO (g/l)	COLOR INICIAL (U.C.)	COLOR FINAL (U.C.)	DECOLORACION (%)
1 <sup>a</sup>	1.1888	2186.00	823.64	52.68
2 <sup>a</sup>	0.9877	2230.53	704.54	73.35
3 <sup>a</sup>	1.5622	2119.19	269.07	87.18
4 <sup>a</sup>	1.3700	2237.96	348.25	85.35
5 <sup>a</sup>	1.2375	2178.58	595.67	76.83
6 <sup>a</sup>	1.0555	2163.73	911.14	47.81
7 <sup>a</sup>	1.5966	2129.09	313.60	86.94
8 <sup>a</sup>	1.3011	2100.64	368.04	82.42

Condiciones: 30 ml de medio, 37°C, inóculo del 20%, tiempo de incubación 8 días, a: 0.4 mM de alcohol veratrilico, 80 rpm, 0.05% de Tween 80. b: 1.5 mM de alcohol veratrilico, 80 rpm, 0.05% de Tween 80. c: 0.4 mM de alcohol veratrilico, 150 rpm, 0.05% de Tween 80. d: 1.5 mM de alcohol veratrilico, 150 rpm, 0.05% de Tween 80. e: 0.4 mM de alcohol veratrilico, 80 rpm, 0.08% de Tween 80. f: 1.5 mM de alcohol veratrilico, 80 rpm, 0.08% de Tween 80. g: 0.4 mM de alcohol veratrilico, 150 rpm, 0.08% de Tween 80. h: 1.5 mM de alcohol veratrilico, 150 rpm, 0.08% de Tween 80.

Tabla IX Decoloración del afluente alcalino con las mejores condiciones empleando a *Phanerochaete chrysosporium*.

TIEMPO (días)	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (nmol/mil.min)	PESO SECO (g/l)	COLOR (U.C)	COLOR ADSORBIDO (U.C./g)	GLUCOSA (g/l)
0	0.000	0.007	2044.96	0.000	9.826
2	0.000	0.435	1948.47	1766.090	9.019
4	0.000	0.766	1306.40	368.220	9.623
5	2.670	0.922	532.58	217.440	8.336
6	6.1108	0.820	356.29	260.240	7.141
7	9.815	1.013	278.35	214.320	6.897
8	5.473	1.053	259.78	214.990	7.012

Condiciones: 30 ml de medio, 150 rpm, 0.05% de tween 80, 0.04 mM dealcoholveratrico, 20% de inóculo, y 37°C, durante 8 días.

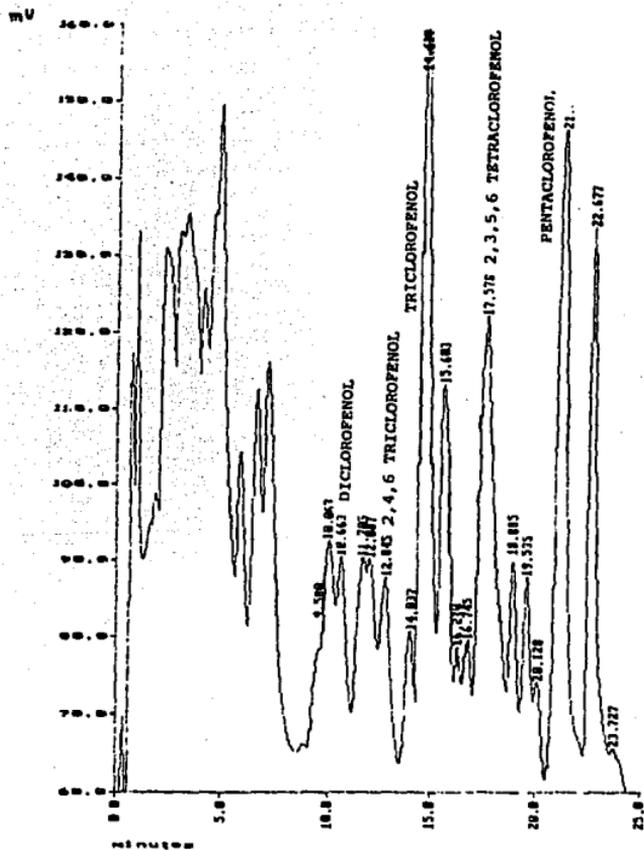


Figura 3. Cromatograma del efluente sin tratar diluido al 60% y enriquecido con los componentes del medio Kirk, 0.05% de Tween 80 y 0.4 mM de alcohol veratrílico.

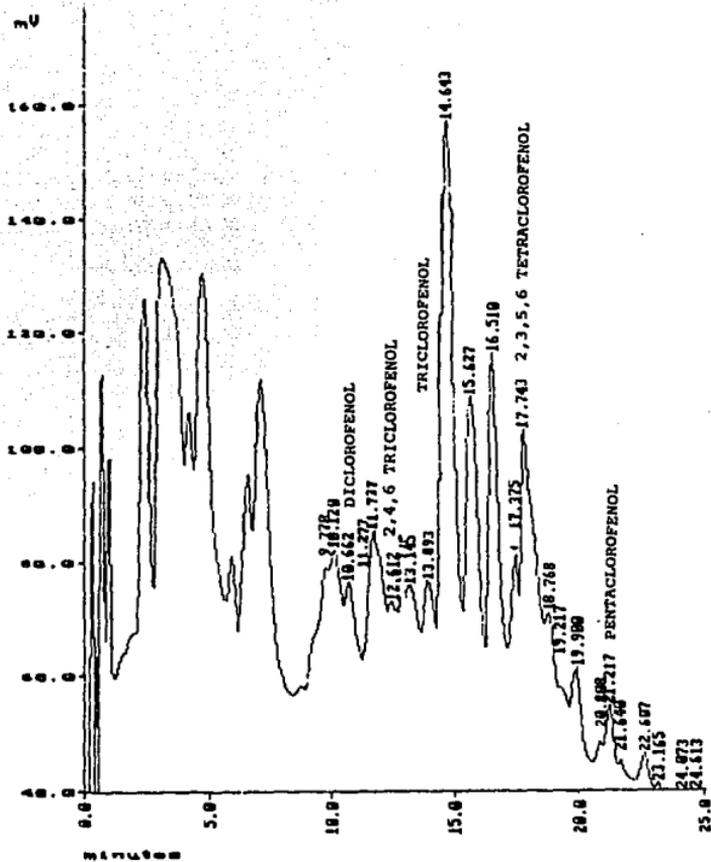


Figura 4. Cromatograma del efluente diluido al 60%, tratado con *Phanerochaete chrysosporium* durante 8 días, empleando las mejores condiciones.

## **10. BIBLIOGRAFIA**

Aitken, D. M. and Irvine L. R. (1990). Characterization of reactions catalyzed by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Archives of Biochemistry and Biophysics. 276(2):405-414.

Ander, P. and Eriksson K.E. (1975). Influence of carbohydrates on lignin degradation by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. Sven. Papperstidn., 78:643-653.

Areyzaga Macías Mildred Eluid y Parada Domínguez Angel. Tesis para el título de Ingeniero Químico Industrial. Caracterización de la lignina extraída de la cascarilla de arroz (*Oryza sativa*) por medio de dioxano. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas. México, D.F., 1985.

Arrollo Arista Blanca Patricia. Tesis para obtener el título de Biólogo. Estudios cinéticos del crecimiento de hongos de la pudrición blanca y su aplicación en la degradación de un colorante azo. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 1994.

Asther, M., Corrieu G., Drapron R. and Odier E. (1987). Effect of Tween 80 and oleic acid on ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium* INA-12. Enzyme Microbiology and Technology. 9:245-249.

Bar-Lev, S.S. and Kirk T.K. (1981). Effects on molecular oxygen on lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 99(2):373-378.

Bergbauer, M. and Eggert C. (1992). Differences in the persistence of various bleachery effluent lignins against attack by white-rot fungi. Biotechnology Letters. 14(9):869-874.

Bumpus, J.A., Tien M., Wright D. and Anst S.D. (1985) oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. Science, 228:1434-1436.

Buswell, J.A., Hamp S. and Eriksson E. (1979). Intracellular quinone reduction in *Sporotrichum pulverulentum* by a NAD(P)H: quinone oxidoreductase: possible role in vanillic acid catabolism. FEBS Lett. 108:229-232.

Campbell, A.G., Gerrard E.D., Joyce T.W., Chang H.M. and Kirk T.K. (1981) The MyCoR process for color removal from bleach plant effluents: Bench scale studies. Proceedings of the TAPPI & Division Conference. Asheville, N.C. p. 209.

Canada-Mexico training seminar for environmental inspectors. (1993) Mexico, City. 15-19 March. p.p. 129-162.

Chang, H., Joyce T.W., Campell A.G., Gerrard E.D., Huynh V.B. and T.K. Kirk (1983). Fungal decolorization of bleach plant effluents. In: Recent Advances in Lignin

Biodegradation Research, ed. T. Higuchi, H. Chang and T.K. Kirk, pp. 257-268. Uni Publisher, Tokio.

Chaykin, S. Biochemistry laboratory techniques. John Wiley and Sonsm Inc. New York, pp. 89-60, 1966.

Crawford, L.R., Robinson E.L. and Cheh M.A. (1980). C-labeled lignins as substrates for the study of lignin biodegradation and transformation. In: Lignin biodegradation: Microbiology, chemistry and potential applications, vol I. Chapter 3. Critical Review Communications Press. U.S.A. pp. 61-75.

Crawford, R.L. (1981). Lignin biodegradation and transformation. Wiley-Interscience, New York. pp.38-52.

Delgadillo Ubaldo Elizabeth. Tesis para el título de Ingeniero Bioquímico. Tratamiento de aguas residuales de una industria cervecera. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México, D.F., 1987.

Dey, S., Maiti T.K., Saha N, Banerjee R. and Bhattacharyya B.C. (1991). Extracellular protease and amylase activities in ligninase-producing liquid culture of *Phanerochaete chrysosporium*. Process Biochemistry. 26:325-329.

Eaton, D.C., Chang H.M. and Kirk T.K. (1980). Fungal decolourization of Kraft bleach plant effluents. Tappi. 63(10):103-106.

Eaton, D.C., Chang H.M., Joyce. T.W., Jeffries T.W. and Kirk T.K. (1982). Method of obtain fungal reduction of the color of extraction stage Kraft bleach effluents. Tappi 65:89.

Eaton, D.C. (1985). Mineralization of polychlorinated biphenyls by *Phanerochaete chrysosporium*. Enzyme Microbiology Technology. 7:194-196.

Enoki, A., Tanaka H. and Fuse G. (1988). Degradation of lignin-related compounds, pure cellulose and wood components by white-rot and brown-rot fungi. Holzforschung. 42(2):85-93.

Eriksson, K.E and Kirk T.K. (1985). Biopulping, biobleaching and treatment of Kraft bleaching effluents with white-rot fungi. In: Comprehensive Biotechnology. The principles applications and regulations of biotechnology industry agriculture and medicine. Murray Moo Young. vol. 4, Chapter 15, pp. 271-294.

Faison, B.D. and Kirk T.K. (1985). Factors involved in the regulation os a ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology. 49(2):299-304.

- Fenn, P. and Kirk T.K. (1979). Ligninolytic system of *Phanerochaete chrysosporium*: Inhibition by o-Phthalate. Archives of Microbiology. 123:307-309.
- Fenn, P. and Kirk T.K. (1981). Relationship of nitrogen to the onset and suppression of ligninolytic activity and secondary metabolism in *Phanerochaete chrysosporium*. Archives of Microbiology. 130(1):59-65.
- Fenn, P., Choi S. and Kirk T.K. (1981). Ligninolytic activity of *Phanerochaete chrysosporium*: Physiology of suppression by  $\text{NH}_4^+$  and L-glutamate. Archives of Microbiology. 130(1):66-71.
- Fiechter, A., Janshekar H. and Troller J. (1989). Production of ligninolytic enzymes in submerged culture systems. In: Enzyme systems for lignocellulose degradation. Coughlan, M.P. Elsevier Applied Science. London. pp.321-326.
- Frederick, C.M., Balachandra D., Grulke E.A. (1991). Role of manganese peroxidase and lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* in the decolourization of Kraft bleach plant effluent. Applied and Environmental Microbiology. 57(8):2368-2375.
- Fressenius, W., Quentin K.E. and Schneider. Water analysis. A practical guide to physico-chemical, chemical and microbiological water examination and quality assurance. Springer Verlag, Germany, pp. 30-31, 1988.
- Galeno, D.G., and Agosin T.E. (1990). Screening of white-rot fungi for efficient decolourization of bleach pulp effluents. Biotechnology Letters. 12(11):869-872.
- Glenn, J.K., Morgan, M.A., Mayfield M.B., Kuwahara M. and Gold M.H. (1983). An extracellular  $\text{H}_2\text{O}_2$ -requering enzyme preparation involved in lignin biodegradation by white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Biochemical and Biophysical Ressearch Communications. 114:1077-1083.
- Glumoff, T., Winterhalter K.H. and Smith D.J. (1989). Monoclinic crystals of lignin peroxidase. FEB Letters. 257(1):59-62.
- Glumoff, T., Harvey J.P., Molinari S. and Goble M. (1990). Lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Molecular and kinetic characterization of isozymes. European Journal of Biotechnology. 187:515-52.
- Gunnarsson, L.M Andersson P.E. and Olsson L.E. (1984). Anaerobic treatment of CTMP effluent from peroxide-bleached softwood. Proceedings, Tappi Environmental Conference, Orlando, F.L., 17-19 April. p. 535.
- Haemmerli, S.D., Leisola M.S., and Fiechter A. (1986). Polymerization of lignins by ligninases from *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Microbiology Letters. 35:33-36.

Haemmerli, S.D., Leisola M.S., Sanglard D. and Fiechter A. (1986). Oxidation of benzo(a)pyrene by extracellular ligninases of *Phanerochaete chrysosporium*. The Journal of Biological Chemistry. 261(15):6900-6903.

Haemmerli, S.D., Shoemaker H.E., Schmidt H.W. and Leisola, M.S. (1987). Oxidation of veratryl alcohol by the lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. Involvement of activated oxygen. FEBS Letters. 220:149-154.

Haider, K. and Trojanowski J. (1980). A comparison of the degradation of <sup>14</sup>C-labeled DHP and corn stalk lignins by micro- and macrofungi and bacteria. In: Lignin Biodegradation: Microbiology, chemistry and potential applications, Vol. I. Kirk, T.K., Higuchi T. and Chang H. (eds.) CRC Press. Boca Raton, Florida, pp. 11-134.

Harvey, P.J., Schoemaker H.E., Brown R.M. and Palmer J.M. (1985). Single-electron transfer processes and the reaction mechanisms of enzymic degradation of lignin. FEBS Lett. 183:13-16.

Harvey, P.J., Schoemaker H.E., Brown R.M. and Palmer J.M. (1986). Veratryl alcohol as mediator and the role of radical cations in lignin biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Lett. 195:242-246.

Harvey, P.J., Gilardi, G.F. and Palmer J.M. (1989) Importance of charge transfer reactions in lignin degradation. In: Enzyme systems for lignocellulose degradation. Coughlan M.P. (ed.) Elsevier. Applied Science. Great Britain, pp. 111-120.

Hattori, T. (1992). Aromatic ring opening of lignin monomeric model compounds by lignin peroxidase. Wood Research. 78:15-73.

Hernández, A.A. Tesis para obtener el título de Ingeniero Industrial Químico. Consideraciones en la solución de problemas operativos en la fabricación del papel periódico. Instituto Tecnológico de Tuxtepec Oaxaca, México, 1993.

Huyn, V.B., Chang T.W., Joyce T. W. and T.K. Kirk (1985). Dechlorination of chloroorganics by a white-rot fungus. Tappi Journal. 68:98-102.

Higuchi, T. (1971). Formation and biological degradation of lignin. Advanced Enzymology. 34:207.

Higuchi T. (1985). Degradative pathways of lignin model compounds. In: Biosynthesis and Biodegradation of wood components. Chap 20. Academic Press, New York.

Ian, R. (1979). The influence of nutrient balance on lignin degradation by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Canadian Journal of Botany. 57:2050-2057.

Janshekar, H.T., Brown C., Haltmeier, Leisola M. and Fiechter A. (1982). Bioalteration of Kraft pine lignin by *Phanerochaete chrysosporium*. Archives of Microbiology. 132:14-21.

Jeffries, W., Choi S. and Kirk T.K. (1981). Nutritional regulation of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology. 42(2):290-296.

Jin, L., Shultz T.P. and Darrel D.N. (1990). Structural characterization of Brown-rotted lignin. Holzforschung 44(2):133-138.

Johsrud, S.C. and Eriksson k. (1985). Cross-breeding of selected and mutated homokaryotic strains of *Phanerochaete chrysosporium* K-3: New cellulase deficient strains with increased ability to degrade lignin. Applied of Microbiology and Biotechnology. 21:320-327.

Johsrud, S.C. (1988). Selection and screening of white-rot fungi for delignification and upgrading of lignocellulosic materials. In: Treatment of lignocellulosics with rot fungi. Zadrazil, F. and Reiniger P. (eds.) Elsevier Applied Science. Great Britain, p.p. 50-54.

Joyce, T.W., Chang H.M., Campell A.G. Gerad E.D. and Kirk, Tk. (1984). A continuous biological process to decolourize bleach plant effluents. Biotechnology Advances. 2:301-308.

Kantelinen, A., Waldner R., Niku-Paavola M. and Leisola M. (1988). Comparison of two lignin-degrading fungi: *Plebia radiata* and *Phanerochaete chrysosporium*. Applied Microbiology and Biotechnology. 28:193-198.

Keyser, P., Kirk T.K. and Zeikus J.G. (1978). Ligninolytic enzyme system of *Phanerochaete chrysosporium*: Synthesized in the absence of lignin in response to nitrogen starvation. Journal of Bacteriology. 135(3):790-797.

Kirk, T.K., Connors W.J. and Zeikus G. (1976). Requirement for a growth substrate during lignin decomposition by two wood-rotting fungi. Applied and Environmental Microbiology. 32(1):192-194.

Kirk, T.K., Schultz E., Connors W.J., Lorenz F. and Zeikus G. (1978). Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. Archives of Microbiology. 117:277-285.

Kirk, T.K. (1980). Physiology of lignin metabolism by white-rot fungi. In: Lignin biodegradation: Microbiology, chemistry and potential applications. vol. II. Chapter 4. Kirk, T.K., Higuchi T. and Chang H.(eds.) CRC Press, Boca Raton, Florida pp. 52-62.

Kirk, T.K., Higuchi T. and Chang H. (1980). Lignin biodegradation: summary and perspectives. In: Lignin biodegradation: Microbiology, chemistry and potential applications, vol.II. Chapter 16. Kirk, T.K., Higuchi T. and Chang H. (eds.). CRC Press, Boca Raton,

Florida pp. 235-243.

Kirk, T.K., Croan S. and Tien M. (1986). Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. *Enzyme Microbiology and Technology*. 8:27-32.

Kirk, T.K. and Tien M. (1986). Lignin degrading activity of *Phanerochaete chrysosporium* burds.: comparison of cellulase-negative and other strains. *Enzyme Microbiology and Technology*. 8:75-79.

Kirk, T.K. (1988). Biochemistry of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. In: *Biochemistry and genetics of cellulose degradation: Proceedings of the Federation of the Microbiological Societies Symposium No. 43; 7-9 September 1987, Paris, San Diego, C.A.* Academic Press Inc. 1988:315-332.

Kirk, T.k., Tien M. and Kersten P.J. (1990). Lignin peroxidase from fungi: *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods Enzymol.* 188:159-171.

Kolthof, S. Text book of quantitative inorganic analysis, 13<sup>rd</sup> ed. MacMillan. E.U.A., pp. 574-575, 1961.

Kurek, B. and Odier E. (1990). Influence of lignin peroxidase concentration and localisation in lignin biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 34:264-269.

Kuwahara, M, Gleen J.K., Morgan Ma. and Gold M.H. (1984) Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidases from ligninolytic cultures *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters*. 169:247-250.

Leisola, M., Brown C. Laurila M., Ulmer D. and Fiechter A. (1982). Polysaccharide synthesis by *Phanerochaete chrysosporium* during degradation of Kraft lignin. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. 15:180-184.

Leisola, M., Ulmer D. and Fiechter A. (1983). Rapid solubilization and depolymerization of purified Kraft lignin by thin layers of *Phanerochaete chrysosporium*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. 17:117-120.

Leisola, M., Ulmer D. and Fiechter A. (1983). Problem of oxygen transfer during degradation of lignin by *Phanerochaete chrysosporium*. *European Journal of Microbiology and Biotechnology*. 17:113-116.

Leisola, M., Schmidt B., Thanei-Wyss U. and Fiechter. (1985). Aromatic ring cleavage of veratril alcohol by *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters*. 189(2):267-270.

Leisola, M. and Waldner R. (1988). Production, characterization and mechanism of lignin peroxidases. In: Treatment of lignocellulosics by white rot fungi. Zadrazil, F. and Reinger P. (eds.) Elsevier Applied Science. Great Britain, p.p. 37-42.

Leisola, M. and Garcia S. (1989). The mechanism of lignin degradation. In: Enzyme systems for lignocellulose degradation. Coughlan M.P. (ed.). Elsevier Applied Science, Great Britain, pp. 89-99.

Linko, S. (1992). Production of *Phanerochaete chrysosporium* lignin peroxidase. *Biotechnology Advances*. 10(2):191-236.

Livernoche, D., Jurasek L., Desroches M. and Dorica J. (1983). Removal of color from Kraft mill wastewaters with cultures of white-rot fungi and with immobilized mycelium of *Coriolus versicolor*. *Biotechnology and Bioengineering*. 25:2055-2065.

Lynch, J.M., Stanley S.P. Métodos de laboratorio. 2ª ed. Interamericana. México, pp. 223-224, 442-443, 1990.

Matsumoto, Y. Yin C.F., Joyce T.W., Chang H.M. and Kirk, T.K. (1985). Degradation of chlorinated lignin and chlorinated organics by white-rot fungus. Proceedings of the International Lignin Symposium on Wood and Pulping Chemistry, Hyatt Regency Vancouver, Vancouver, B.C. Canada.

Muñiz Rangel Rasalinda. Tesis para el título de Biólogo. Evaluación comparativa del funcionamiento de modelos físicos de laboratorio de lagunas anaerobias tratando aguas residuales de excreta de cerdo. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias. México, D.F., 1987.

Nerud, F., Zouchová Z. and Misurcová Z. (1991). Ligninolytic properties of different white-rot fungi. *Biotechnology Letters* 13(9):657-660.

Nielson, A., Allard A.S., Hynning P.A. Remberger M. and Viktor T. (1990). The environmental fate of chlorophenolic constituents of bleachery effluents. *Tappi Journal*. 73(3):293.

Pacheco, M.A. Tesis para el título de Ingeniero Industrial Químico. Prueba de rendimiento en una planta de pulpas celulósicas a partir de bagazo de caña. Instituto Tecnológico de Orizaba. México, 1988.

Paszczynski, A., Huynh V. and Crawford R. (1986). Comparison of ligninase-1 and peroxidase-M2 from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 244(2):750-765.

Pellinen, J., Yin C.F., Joyce T.W. and Chang H.M. (1988). Treatment of chlorine bleaching effluent using a white-rot fungus. *Journal of Biotechnology*. 8:67-76.

Pellinen, J., Joyce T.W., and Chang. (1988). Dechlorination of high-molecular-weight chlorolignin by the white-rot fungus *P. chrysosporium*. *Tappi Journal*. :191-194.

Pellinen, J. and Joyce T.W. (198-). White-rot fungi treatment of pulp and paper industry wastewater. *Pulp and Paper Technology*. Part 2:143-147.

Poggi, H.M., Hernandez R., Rinderknecht N., and Calzada J.F. (1989). Supplemented Kraft condensate treatment in high rate anaerobic processes. *Proceedings of the 44th Industrial Waste Conference*. 9-11 May, pp.271-277. Purdue University West Lafayette, Indiana. Lewwis Publishers.

Prasad, D.Y. and Joyce T.W. (1993). Sequential treatment of E1 stage Kraft bleach plant effluent. *Bioresource Technology*. 44(2):141-147.

Rajagopalan, V. and Irvine L. (1990). Effect of agitation on ligninase activity and ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 56(9):2684-2691.

Reese, E.T. and Maguire A. (1969). Surfactants as stimulants of enzyme production by microorganisms. *Applied of Microbiology*. 17:242-245.

Sarkanen, K and Goyal G. (1988). Review of potential chemical processes resulting in the formation of polychlorinated dioxins and dibenzofurans in the bleaching of chemical pulps. *International Pulp Bleaching Conference*. *Tappi Proceedings*, pp.77-83.

Schliephake, K., Lonergan G.T., Jones C.L. and Mainwaring D.E. (1993). Decolourisation of a pigment plant effluent by *Pycnoporus cinnabarinus* in a packed-bed bioreactor. *Biotechnology Letters*. 15(11):1185-1188.

Schmidt, B., Heimgartner U., Kozulic B. and Leisola M. (1990). Lignin peroxidases are oligomannose type glycoproteins. *Journal of Biotechnology*. 13:223-228.

Schoemaker, H.E., Harvey, P.J., Brown R.M. and Palmer J.M. (1985). On the mechanism of enzymatic lignin breakdown. *FEBS Lett*. 183:7.

Sundman, G., Kirk T. and Chang H.M. (1981). Fungal decolorization of Kraft bleach plant effluent. *Tappi Journal*. 64(9):145.

Taras, M.J. and Greenberg A.E. Standard methods for examination of water and waste water. 14<sup>th</sup> ed. Joint Editorial Board. Washington, 160.161, 391-396, 1976.

Tien, M. and Kirk T.K. (1983). Lignin degrading enzyme from the Hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. Science. 221:661-663.

Tien, M and Kirk T.K. (1984). Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium* of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requering oxygenase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:2280-2284.

Tien, M., and Kirk T.K. (1986). Steady-state and transient-state kinetic studies on the oxidation of 3,4-dimethoxybenzyl alcohol catalized by the ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* burds. The Journal of Biological Chemistry. 261(4):1687-1693.

Tien, M. (1987). Properties of ligninase from *Phanerochaete chrysosporium* and their possible applications. Critical Review in Microbiology. 15(2):141-168.

Tien, M and Kirk (1988). Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. In: Methods in enzymology. vol. 161, Part B Lignin, Pectin and Chitin. Wood W. and Kellogg S. (eds) Academic Press Inc. U.S.A. p.p. 242-243.

Trujillo R.O. Tesis para obtener el título de Ingeniero Industrial Químico. Diseño de tanques blanqueadores para el laboratorio de investigación y celulosa del Instituto Tecnológico de Orizaba. Instituto Tecnológico de Orizaba. Veracruz, México, 1988.

Tonon, F., Castro P. and Odier E. (1989). Production of lignin peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*: regulation in connection with nitrogen metabolism. In: Enzyme systems for lignocellulose degradation. Coughlan. Elsevier Applied Science. London. pp.313-320.

Villanueva Ventura María Guadalupe. Tesis para el título de Ingeniero Químico Industrial. Pretratamiento de bagacillo de caña aspejado con hidróxido de sodio para la producción de proteína microbiana. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas. México, D.F., 1987.

Voss, H.R. (1978). Chlorinated neutral organics in Biologically treated bleached Kraft mill effluents. Environmental Science and Technology. 17(9):530-536.

Waldner, R., Leisola M., and Fiechter A. (1988). Comparison of ligninolytic activities of selected white-rot fungi. Applied of Microbiology Biotechnology. 29:400-407.

Wood, D.A., Matcham S.E. and Fermor T.R. (1988). Production and function of enzymes during lignocellulose degradation. In: Treatment of lignocellulosic with white-rot fungi. Zadrazil, F and Reiniger P. (eds.). Elsevier Applied Science. Great Britain, pp.43-49.

Yin, C.F., Joyce T.W. and Chang H.M. (1989). Role of glucose in fungal decolorization of wood pulp bleaching effluents. Journal of Biotechnology. 10:77-84.