



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**Efecto de la fuente de carbono y hierro en la producción de  
ácidos orgánicos por hongos filamentosos y en la degradación de  
colorantes**

Tesis que presenta

**JUANA LIRA PÉREZ**

Para obtener el grado de

**DOCTORA EN CIENCIAS**

En la especialidad de **BIOTECNOLOGÍA**

Directora de la tesis

**Dra. Refugio Rodríguez Vázquez**

México, Ciudad de México

**Enero , 2021**

## **AGRADECIMIENTOS**

HAGO EXTENSIVO MI AGRADECIMIENTO AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (**CONACYT**), POR HABERME OTORGADO LA BECA CON NÚMERO 439486 PARA LA REALIZACIÓN DE ESTÁ INVESTIGACIÓN.

AL LABORATORIO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y AL LABORATORIO DE GENÓMICA, PROTEÓMICA Y METABOLÓMICA AMBOS DEL LABORATORIO NACIONAL DE SERVICIOS EXPERIMENTALES (**LANSE**) POR SUS SERVICIOS DE MICROSCOPIA Y CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS.

FINALMENTE, AL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL (**CINVESTAV**).

## Agradecimientos

Gracias a Dios porque cada día bendice mi vida con la hermosa oportunidad de estar y disfrutar al lado de las personas que sé que más me aman, y a las que yo sé que más amo en mi vida.

Gracias a mis padres por ser los principales promotores de mis sueños, a mis hermanos y sobrinos por cada día confiar y creer en mí y en mis expectativas.

Agradezco profundamente a la Dra. Refugio Rodríguez Vázquez por todo su apoyo y su confianza, por siempre guiarme y darme los mejores consejos para esta investigación, la admiro y es una gran inspiración para todos, gracias por su compañía y su linda amistad.

El desarrollo de esta tesis no lo puedo catalogar como algo fácil, pero lo que sí puedo hacer, es afirmar que durante todo este tiempo pude disfrutar de cada momento, que cada investigación, proceso y proyectos que se realizaron dentro de esta y no fue porque simplemente me dispuse a que así fuera, fue porque mis amigos siempre estuvieron ahí, gracias a todos mis compañeros del laboratorio 44, en especial a Netza, Brenda, Josafat, Lupita y Paulina por su apoyo incondicional y confiar en mí.

Agradezco con amor a Juan Carlos Figueroa por tantas ayudas y aportes no solo para el desarrollo de esta tesis, sino también para mi vida; eres mi inspiración y motivación.

Gracias a la vida por este nuevo triunfo y a todas las personas que me apoyaron y creyeron en la realización de esta investigación.

## INDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>11</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>12</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>13</b>
1.1 Agua subterránea.....	13
1.2 Fuentes de contaminación .....	14
1.2.1 Materia orgánica .....	14
1.2.1.1 Disruptores endocrinos .....	15
1.2.1.1.1 Colorante como un compuesto modelo .....	17
1.2.1.1.1.1 Naranja G.....	19
1.2.1.1.1.2 Azul a la cuba.....	23
1.3 Tratamientos de eliminación.....	24
1.3.1 Oxidación vía Fenton.....	25
1.3.1.1 Oxidación vía Fenton en sistemas biológicos.....	27
1.4 Hongos filamentosos.....	29
1.4.1 <i>Aspergillus niger</i> .....	30
1.5 Ácidos orgánicos.....	31
1.5.1 Ácido oxálico .....	31
1.5.2 Ácido glucónico .....	33
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>37</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>39</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>40</b>
4.1 Objetivo general.....	40
4.2 Objetivos específicos.....	40
<b>5. MATERIALES Y METODOS</b> .....	<b>41</b>
5.1 Microorganismos.....	41
5.1.1 Medios de cultivo Wunder .....	41
5.1.2 Medio de cultivo Sivakumar .....	41
5.1.3 Preparación de inóculo .....	41
5.2 Degradación de colorantes en medio sólido.....	42
5.3 Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	42
5.4 Sorción de naranja G por biomasa fúngica de <i>Aspergillus niger</i> .....	42
5.5 Optimización de la sorción de azul a la cuba 4 por biomasa fúngica.....	43

5.6 Determinación de GOX y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> durante la sorción de azul a la cuba .....	43
5.7 Efecto de la fuente de carbono y de hierro en la remoción de naranja G .....	44
5.8 Perfiles de Fe <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> y Fe <sub>Total</sub> durante la degradación de naranja G .....	45
5.9 Generación de ácidos orgánicos por <i>A. niger</i> durante la degradación de naranja G .....	45
5.10 Degradación de naranja G mediante un co-cultivo de <i>A. niger</i> y basidiomicetes .....	45
5.11 Métodos analíticos .....	46
5.11.1 Determinación de biomasa en peso seco .....	46
5.11.2 Cuantificación de azúcares reductores .....	46
5.11.3 Determinación de pH .....	47
5.11.4 Determinación de potencial redox.....	47
5.11.5 Identificación de ácidos orgánicos por HPLC .....	47
5.11.6 Cuantificación del carbono orgánico total (TOC) .....	48
5.11.7 Determinación de la glucosa oxidasa.....	48
5.11.8 Determinación de la glioxal oxidasa.....	49
5.11.9 Determinación de la lacasas.....	50
5.11.10 Determinación de la Manganese peroxidasa.....	51
5.11.11 Determinación de la lignin peroxidasa.....	52
5.11.12 Cuantificación de proteína total.....	53
5.11.13 Determinación de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	54
5.11.14 Cuantificación de colorantes.....	54
5.11.15 Determinación del complejo ferrioxalato .....	55
5.11.16 Cuantificación de Fe <sup>total</sup> , Fe <sup>+2</sup> y Fe <sup>+3</sup> .....	56
5.11.17 Identificación de naranja G por HPLC .....	57
5.11.18 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	57
5.12 Análisis estadístico .....	58
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>59</b>
6.1 Activación de la cepa.....	59
6.2 Barrido espectrofotométrico de Naranja G .....	59
6.3 Efecto de pH en la remoción de naranja G .....	60
6.4 Determinación del crecimiento radial de <i>A.niger</i> y <i>T.versicolor</i> en presencia de diferentes colorantes.....	60
6.5 Concentración mínima inhibitoria (CMI) y estimación de parámetros cinéticos.....	65
6.6 Sorción de Naranja G por <i>A. niger</i> .....	70

6.7 Optimización del proceso de sorción de azul a la cuba 4 por <i>A.niger</i> . .....	79
6.8 Efecto de la fuente de carbono y de hierro en la decoloración de naranja G .....	107
6.9 Perfiles de Hierro <sup>2+</sup> y Hierro <sup>3+</sup> durante la degradación de naranja G. ....	113
6.10 Generación de ácidos orgánicos por <i>A. niger</i> en medios con diferentes fuentes de carbono y fuentes de hierro. ....	118
6.11 Generación de ácidos orgánicos por <i>A. niger</i> durante la degradación de naranja G .....	121
6.12 Generación de radicales libres vía Fenton modificado por el complejo Glucoferro.....	127
6.13 Degradación de naranja G por <i>A. niger</i> .....	130
6.14 Actividad enzimática GOX y GLOX durante la degradación de OG por <i>A. niger</i> . ....	132
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>135</b>
<b>8. REFERENCIAS .....</b>	<b>137</b>
<b>ANEXO 1 Programación en el software SAS (Statistical Analysis System) versión 6.0. ....</b>	<b>149</b>
<b>ANEXO 2 Artículos Publicados .....</b>	<b>151</b>
<b>ANEXO 3 Capitulo de libro .....</b>	<b>153</b>

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del Ciclo hidrológico.....	13
Figura 2. Estructura química diversos EDCs.....	16
Figura 3. Estructura química del colorante Naranja G.....	19
Figura 4. Espectro de absorción del colorante Naranja G a 3 ppm.....	20
Figura 5. Productos de degradación de Naranja G propuestos por Goel y Lasyal, 2015. ....	21
Figura 6. Ruta de degradación de Naranja G propuesta por Cai y colaboradores, 2016(a).....	22
Figura 7. Ruta de degradación de Naranja G propuesta por Cai y colaboradores, 2016 (b).....	23
Figura 8. Diagrama del ataque de .OH a materia estructural de la madera por hongos de podredumbre blanca y café.....	28
Figura 9. Mecanismo para la degradación de compuestos contaminantes. ....	36
Figura 10. Espectros de absorción de naranja G a diferentes concentraciones. ....	60
Figura 11. Crecimiento radial de <i>A.niger</i> en medio sólido.....	62
Figura 12. Crecimiento radial de <i>A. niger</i> .....	63
Figura 13. Crecimiento radial de <i>A.niger</i> en medio sólido.....	63
Figura 14. Halos de decoloración de <i>T. versicolor</i> en agar.....	64
Figura 15. Cinética de crecimiento de <i>A. niger</i> en medio Wunder. ....	66
Figura 16. Decoloración de naranja G por <i>A.niger</i> en medio Wunder .....	67
Figura 17. Espectros de adsorción de 700 a 200 nm de muestras.....	68
Figura 18. Análisis de residuos. Valores observados contra valores predichos del % DC de naranja G.....	74
Figura 19. Análisis de residuos para el modelo de primer orden para la adsorción de naranja G por <i>Aspergillus niger</i> .....	77
Figura 20. Incrementos en la metodología de ascenso más pronunciado para la adsorción de naranja G por <i>A. niger</i> .....	79
Figura 21. Análisis de residuales diseño factorial fraccionado $2^{4-1=3}$ . (A) Experimentales vs predichos; (B) Corridas vs residuales. ....	83
Figura 22. Análisis de residuales diseño de primer orden. ....	86
Figura 23. Incrementos en la metodología de ascenso más pronunciado para la biosorción de azul a la cuba 4 por <i>A. niger</i> . ....	88
Figura 24. Análisis de residuales DCC.....	91
Figura 24. Diagramas de parámetros significativos de DC en función de valores codificados. ....	92
Figura 25. Remoción de azul a la cuba 4 mediante biomasa activa de <i>A.niger</i> . ....	93
Figura 26. Mecanismo propuesto de biosorción de azul a la cuba por <i>A.niger</i> por fisisorción. ...	95

Figura 27. Actividad de GOX y generación de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> durante la decoloración de azul a la cuba por biomasa activa de <i>A. niger</i> .....	97
Figura 28. Actividad de GOX y generación de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> durante la decoloración de azul a la cuba por biomasa de <i>A. niger</i> inactiva por NaN <sub>3</sub> . ....	99
Figura 29. Actividad de GOX y generación de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> durante la decoloración de azul a la cuba por biomasa de <i>A. niger</i> inactiva por calor.....	101
Figura 30. Microfotografía electrónica de barrido de biomasa de <i>A. niger</i> (acercamiento de 1000x).....	103
Figura 31. Microfotografía electrónica de barrido de biomasa de <i>A. niger</i> (acercamiento de 3700x).....	105
Figura 32. Anomalías en las Microfotografías electrónicas de barrido de biomasa de <i>A. niger</i> . ....	106
Figura 33. Análisis de residuales del diseño experimental de distintas fuentes de carbono/hierro en la decoloración de naranja G .....	109
Figura 34. Grafica de contorno del efecto de las fuentes de carbono y de hierro en la decoloración de naranja G con biomasa activa de <i>A.niger</i> .....	110
Figura 35. <i>A. niger</i> en distintas fuentes de carbono y de hierro durante la decoloración de naranja G .....	111
Figura 36. Reacciones de transformación de la galactosa a glucosa-1-fosfato .....	112
Figura 37. Mecanismo propuesto de interacción de ácidos orgánicos producidos por <i>A. niger</i> y la fuente de hierro. ....	114
Figura 38. Perfiles de Hierro <sup>2+</sup> , Hierro <sup>3+</sup> y Hierro <sup>total</sup> durante la decoloración de naranja G utilizando biomasa activa de <i>A. niger</i> .....	115
Figura 39. Biomasa y pH generados durante la decoloración de naranja G en el seguimiento de los perfiles de Hierro <sup>2+</sup> , Hierro <sup>3+</sup> y Hierro <sup>total</sup> .....	116
Figura 41. Decoloración de naranja G en el seguimiento de los perfiles de Hierro <sup>2+</sup> , Hierro <sup>3+</sup> y Hierro <sup>total</sup> .....	117
Figura 42. Mecanismo propuesto de la biosíntesis de ácido tartárico por <i>A. niger</i> .....	121
Figura 43. Identificación de ácidos orgánicos generados por <i>A. niger</i> .....	122
Figura 44. Detección de ácidos orgánicos pertenecientes al metabolismo de carbohidratos en <i>A. Níger</i> .....	124
Figura 45. Generación de ácidos orgánicos durante la degradación de OG por <i>A. níger</i> . ....	126
Figura 46. Nueva propuesta en el mecanismo de generación de radicales, via Fenton modificado por el complejo glucoferro en <i>A. niger</i> .....	129
Figura 47. Seguimiento de la remoción de OG por método UV/VIS y TOC .....	130
Figura 48. Identificación de posibles productos de degradación de OG por <i>A.niger</i> . ....	132
Figura 49. Actividad enzimática durante la degradación de OG por <i>A. niger</i> .....	133



## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de Azul a la cuba .....	24
Tabla 2. Velocidades máximas de crecimiento radial ( $h^{-1}$ ) .....	64
Tabla 3. Efecto de la concentración de NG en los parámetros cinéticos de <i>A. niger</i> . .....	69
Tabla 4. Valores propuestos para la selección de variables para la adsorción de naranja G por <i>A. niger</i> . .....	71
Tabla 5. Matriz experimental para la selección de variables para la adsorción de naranja G por <i>A. niger</i> . .....	71
Tabla 6. Valores obtenidos para el diseño experimental factorial fraccionado $2^{4-1=3}$ para la adsorción de naranja G por <i>A. niger</i> . .....	72
Tabla 7. Análisis de varianza del diseño experimental factorial fraccionado $2^{4-1=3}$ .....	73
Tabla 8. Matriz experimental para la obtención de modelo de primer orden para la adsorción de naranja G por <i>A. niger</i> .....	74
Tabla 9. Valores obtenidos para la obtención de modelo de primer orden para la adsorción de naranja G por <i>A.niger</i> . .....	75
Tabla 10. Análisis de varianza del diseño experimental factorial fraccionado $2^{4-1=3}$ , para la adsorción de naranja G por <i>A. niger</i> . .....	76
Tabla 11. Valores obtenidos de los valores predichos y residuales en el modelo de primer orden para la adsorción de naranja G por <i>A. niger</i> . .....	76
Tabla 12. Matriz experimental para la trayectoria de ascenso más pronunciado para la adsorción de naranja G por <i>A. niger</i> . .....	78
Tabla 13. Valores obtenidos para la trayectoria de ascenso más pronunciado para la adsorción de naranja G por <i>A. niger</i> . .....	78
Tabla 14. Características de Azul a la cuba 4 .....	80
Tabla 15. Variables independientes y sus niveles para la selección de variables significativas en la biosorción de azul a cuba 4 por <i>A.niger</i> .....	81
Tabla 16. Matriz del diseño factorial fraccionado $2^{4-1=3}$ y resultados experimentales. ....	82
Tabla 17. Estimación de parámetros del diseño experimental factorial fraccionado $2^{4-1=3}$ .....	83
Tabla 18. Matriz para la obtención del modelo de primer orden y resultados experimentales... ..	85
Tabla 19. Estimación de parámetros del diseño de primer orden.....	86
Tabla 20. Diseño y resultados experimentales de la trayectoria de ascenso más pronunciado... ..	87
Tabla 21. Diseño experimental y resultados del diseño compuesto central.....	89
Tabla 22. Estimación de parámetros del diseño compuesto central .....	91
Tabla 23. Diseño experimental y resultados de distintas fuentes de carbono/hierro en la decoloración de naranja G .....	108
Tabla 24. Estimación de parámetros del diseño de primer orden de distintas fuentes de carbono/hierro en la decoloración de naranja G.....	109
Tabla 25. Generación de ácidos orgánicos de <i>A. niger</i> con FC Y FH.....	118

**Tabla 26. Velocidades máximas específicas de generación de ácidos orgánicos por *A. níger*.... 127**

## RESUMEN

Los hongos filamentosos, como son los del género *Aspergillus*, tienen la capacidad de generar  $H_2O_2$  durante su metabolismo, el cual está involucrado en la degradación de compuestos orgánicos peligrosos, principalmente en presencia de sales de hierro en las cuales se generan radicales libres a través de reacciones tipo Fenton. Por lo que en esta investigación se empleó el hongo *Aspergillus niger*, en la degradación de colorantes; naranja G y azul a la cuba, empleando dos fuentes de carbono; glucosa y lactosa. Se evaluó la capacidad del hongo en la degradación de naranja G en medios de cultivo conteniendo dos fuentes de carbono así mismo, se detectaron los siguientes ácidos orgánicos durante la degradación del naranja G: glucónico, oxálico, cítrico, tartárico, málico, succínico, fórmico y acético. Posteriormente se evaluó el papel del  $H_2O_2$  en la remoción de colorantes, así mismo se propuso un mecanismo de adsorción de azul a la cuba en los componentes estructurales de la pared celular de *A. niger*. Se evaluó la interacción de los ácidos orgánicos producidos por el hongo con el hierro en sus dos estados electrónicos ( $Fe^{+2}$  y  $Fe^{+3}$ ) y se propuso la producción del complejo glucoferro mediante reacciones tipo Fenton, que incluyen radicales libres durante el metabolismo de *A. niger* para la degradación de los colorantes. Para finalizar se evaluaron las actividades enzimáticas de óxido reductasas (glucosa y glioxal oxidasa) de manera constitutiva y las generadas en la degradación de los colorantes, comprobando el efecto de los colorantes sobre el incremento de las actividades enzimáticas.

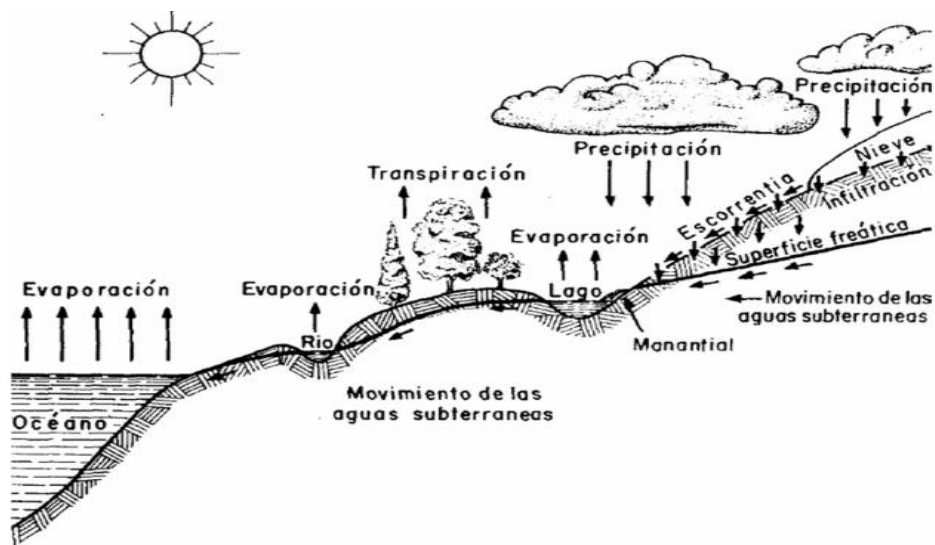
## ABSTRACT

Filamentous fungi, such as those of the genus *Aspergillus*, have the ability to generate  $H_2O_2$  during their metabolism, which is involved in the degradation of hazardous organic compounds, mainly in the presence of iron salts, where free radicals are generated through a Fenton type reaction. Therefore, in this research, the *Aspergillus niger* fungus was used to degrade the dyes; orange G and vat blue, using two carbon sources; glucose and lactose. The fungal capacity to degrade orange G in culture media containing two carbon sources was evaluated, as well as the following organic acids were detected during the degradation of orange G: gluconic, oxalic, citric, tartaric, malic, succinic, formic and acetic. Further, the role of  $H_2O_2$  on dyes removal was evaluated, as well as a mechanism for vat blue adsorption in the structural components of the cell wall of *A. niger* was proposed. The interaction of the organic acids produced by the fungus with the iron in its two electronic state ( $Fe^{+2}$  and  $Fe^{+3}$ ) was evaluated, and the production of a glucoferro complex through a Fenton type reactions which involved free radicals during the metabolism of *A. niger* for dyes degradation. Finally, the enzymatic activities of oxide reductases (glucose and glyoxal oxidases) were evaluated in a constitutive way and those generated in the degradation of the dyes, checking the effect of the dyes on the increase of the enzymatic activities.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Agua subterránea

El agua subterránea es parte del ciclo hidrológico que está bajo la superficie del terreno, a presiones mayores que la atmosférica, que puede ser colectada mediante perforaciones, túneles, galerías de drenaje o la que fluye naturalmente hacia la superficie a través de manantiales o filtraciones a los cursos fluviales (Figura 1) (Ordóñez, 2012). La profundidad a la que se encuentra el agua subterránea depende de la topografía, el terreno y el clima. El almacenamiento total de agua subterránea en una formación depende de la porosidad del suelo y/o rocas (Mook, 2002).



**Figura 1. Representación esquemática del Ciclo hidrológico.** Procesos de Evaporación, Transpiración, Precipitación y Movimientos de las aguas subterráneas (Vélez, 1999).

El agua subterránea es utilizada principalmente para el abastecimiento de agua potable, tanto en viviendas individuales, como en aglomeraciones urbanas, en proyectos agropecuarios para riego y para uso animal; igualmente, muchas industrias consumidoras de grandes cantidades

de agua hacen uso de este recurso (Vélez, 1999). En vista a lo anterior durante las últimas décadas asido de gran importancia la problemática relacionada con la contaminación de aguas subterráneas, debido al riesgo potencial que representan para la salud pública y el ambiente. Puesto que la utilización del agua subterránea se ha venido incrementando en el mundo desde tiempos atrás y cada día gana en importancia, debido al agotamiento o no existencia de fuentes superficiales. Se estima que más de la mitad de la población mundial depende del agua subterránea como fuente de agua potable (Ordóñez, 2012).

## **1.2 Fuentes de contaminación**

Las fuentes más comunes de contaminación del agua subterránea son: áreas urbanas, actividades agrícolas e industriales, aguas residuales que se descargan en los ríos, depósitos de residuos y agua salina o geogénica contaminada atraída por la explotación intensiva de los recursos del agua subterránea (Mook, 2002). Dentro de los principales contaminantes de aguas subterráneas se presentan sales normales ( $\text{Cl}_2$ ,  $\text{SO}_4$ , Ca, Mg, Na, K), nitratos, materia orgánica (biodegradable o no), compuestos tóxicos orgánicos o inorgánicos, metales pesados, microorganismos patógenos, elementos radioactivos, etc. (Vélez, 1999).

### **1.2.1 Materia orgánica**

Los principales inconvenientes que puede causar la materia orgánica en aguas destinadas al consumo, es la presencia de microorganismos patógenos que se nutren de ella y la presencia de sustancias orgánicas no biodegradables o compuestos tóxicos que permanecen en el agua. Debido a los efectos sobre la salud humana de dichos compuestos, es de considerar la importancia que tiene para el ambiente degradarlos, entre ellos los denominados disruptores endócrinos (EDCs), que pueden causar disrupción del sistema endócrino y pueden afectar la

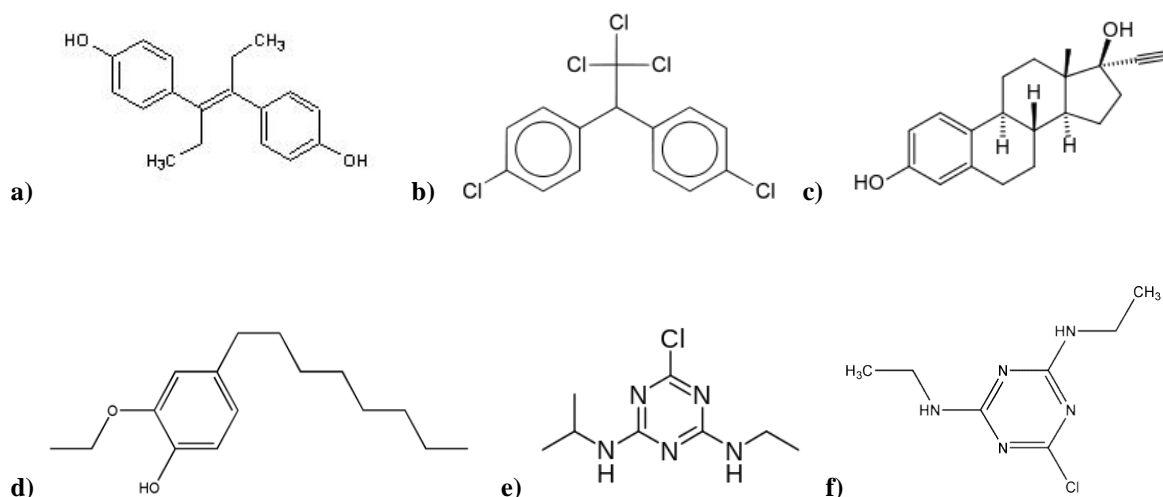
reproducción y el desarrollo de organismos acuáticos expuestos, la vida silvestre o a los humanos (Dickerson y Gore, 2007; Balabanič *et al.* 2011).

### **1.2.1.1 Disruptores endocrinos**

Los EDCs son sustancias químicas capaces de alterar el equilibrio hormonal y actúan a dosis muy bajas. Se les denomina también como; estrógenos ambientales, xenoestrógenos, moduladores endócrinos, ecoestrógenos, hormonas ambientales, compuestos activos hormonalmente y fitoestrógenos. (Chichizola *et al.*2009) (Poynton y Vulpe, 2009).

Los EDCs son agentes exógenos que interfieren con la síntesis, secreción, transporte, acción o eliminación de hormonas naturales en el cuerpo, y son responsables del mantenimiento de la homeóstasis del sistema endocrino, reproducción, desarrollo y comportamiento (Dickerson y Gore, 2007)(Ferreira, 2013). De acuerdo con Alves y colaboradores en el 2007; la presencia de EDCs puede conducir al desarrollo de algunas enfermedades, como el cáncer de la mama, útero y próstata, el desarrollo sexual anormal, la reducción de la fertilidad masculina, el aumento incidente de ovarios poliquísticos, cambios en la glándula tiroides, trastornos en el ovario y la fertilización.

Una elevada cantidad de EDCs son resistentes a la biodegradación, debido a su estabilidad estructural y persistencia en el medio ambiente (Dickerson y Gore, 2007), ya que un número considerable de EDCs incluyen diferentes grupos de compuestos naturales y sintéticos tales como; esteroides, alquilfenoles, compuestos poliaromáticos , hidrocarburos aromáticos policíclicos y compuestos orgánicos de oxígeno (Figura 2)(Balabanič *et al.*, 2011)(Ferreira, 2013).



**Figura 2. Estructura química diversos EDCs.** a) Dietilestilbestrol, b) Diclorodifeniltricloroetano, c) Etinil estradiol, d) Etoxy octilfenol, e) Atrazina, f) Simazina.

Más de 87 000 compuestos de diversa naturaleza y de origen químico son listados como Disruptores endocrinos por el Programa de detección de Disruptores Endocrinos (EDSP) de la US. EPA (Environmental Protection Agency) y son clasificados en varias categorías: Hormonas, fármacos, productos de cuidado personal, químicos industriales, plaguicidas e hidrocarburos policíclicos aromáticos y algunos colorantes (Vidal *et al.*, 2016) (Kim *et al.*, 2007).

Debido a que una gran cantidad de compuestos orgánicos tóxicos como son los disruptores endócrinos se consideran contaminantes potenciales, debido a su alta toxicidad, su dificultad a la degradación natural y su alta persistencia en el medio ambiente. Se han empleado algunos compuestos modelo para la degradación, que incluyen estructuras con anillos aromáticos, con el objetivo de encontrar nuevos métodos para reducir al mínimo los impactos; como es el 4,6-di(tert-butil) guaiacol como modelo de compuestos fenólicos (Kawai *et al.*, 1988); 2,3-dihydroxy-1-(4-ethoxy-3-metoxifenil)-1-formiloxipropano, como modelo de compuestos no fenólicos (Kawai *et al.*, 1999), el azul de metileno y el naranja de



metileno, como modelos de compuestos orgánicos de estructuras aromáticas (Mesquita *et al.*, 2016) (Al-Qaradawi y Salman, 2002).

#### **1.2.1.1.1 Colorante como un compuesto modelo**

El primer colorante sintético fue desarrollado en 1856 por William Henry Perkin, quien durante un experimento con sulfato de anilina y dicromato de potasio obtuvo un precipitado de color negro púrpura y después de una extracción con metanol, descubrió el color púrpura, el cual fue denominado púrpura de anilina ("Life and Work of William Henry Perkin", 1932) y hasta la fecha se han elaborado más de 100 mil colorantes por síntesis química.

Son clasificados por sus tipologías de sus estructuras químicas, como el grupo cromóforo, al cual se le atribuye el color y su grupo funcional, que es el causante de la unión de las fibras. Cabe mencionar que los grupos cromóforos son estructuras, y debido a su distribución electrónica, son capaces de adsorber y reflejar selectivamente longitudes de onda en la región del espectro visible (400 a 700 nm). Tienen generalmente estructuras aromáticas y pueden ser del tipo nitroso o nitroderivado, azoicos o azo, antraquinónicos, triarilmetanos, metínicos, carotenoides, ftalocianinos, xanteno, indigoides, estilbenos, etc. Este tipo de compuestos pueden contener metales en su estructura como; cromo, cadmio, cobre, mercurio, zinc o plomo (Correia *et al.*, 1994).

Los colorantes que se les ha prestado mayor atención y más utilizados en el mundo, son del tipo azo ( $--N=N--$ , grupo funcional cromóforo) y los antraquinónicos (Barrios *et al.*, 2015).

Los colorantes tipo azo tienen 6 electrones con movilidad que están deslocalizados con los anillos aromáticos adyacentes. El grupo azo tiene la capacidad de ser sustituido por una variedad de estructuras orgánicas e inorgánicas que le otorgan propiedades químicas

específicas a cada molécula, por esta razón existen más de 3000 variedades de colorantes azo. Aunque todos los compuestos azoicos son coloreados, no todos son útiles como colorantes (Barrios *et al.*, 2015). Las antraquinonas son caracterizadas por su estructura atómica condensada que es altamente resistente a la biodegradación. Se utilizan de manera industrial para teñir fibras de algodón y celulosa, generando un riesgo a salud debido a sus productos secundarios como; las aminas aromáticas que tienen un potencial carcinógeno probado y bien documentado (Pupo *et al.*, 2013) (Muz *et al.*, 2017).

Todos los colorantes sintéticos son caracterizados por su resistencia a la luz, al lavado y al ataque microbiano, haciéndolos atractivos y funcionales para industria textil, pero dando lugar a compuestos no biodegradables, característica por la cual su presencia en aguas residuales representa un gran problema en la generación de residuos tóxicos. Los colorantes tipo azo son solubles principalmente en agua, y son contaminantes inevitables de la industria textil, imprenta, papelera y farmacéutica, se consideran como compuestos xenobióticos por su persistencia en el medio ambiente (Robinson *et al.*, 2001).

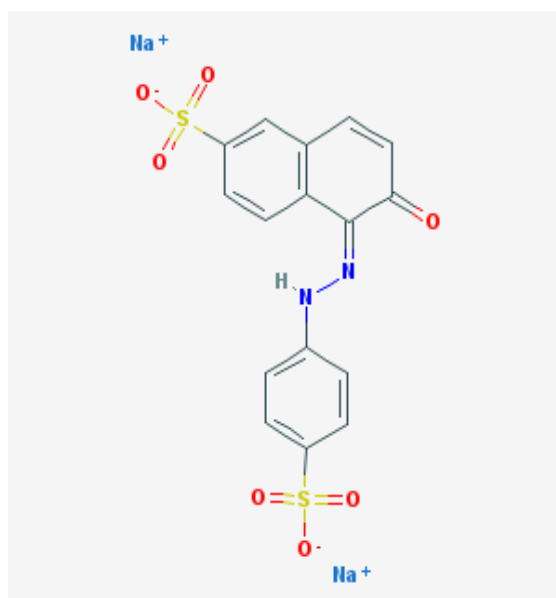
Se ha reportado que los colorantes son causantes de alergias, dermatitis, irritación en la piel y cáncer en humanos. La industria textil, alimenticia, de teñido, de impresión, de galvanoplastia, curtidora, cosmética y la de pintura son las principales fuentes de contaminación del agua, debido al mal manejo de residuos y la liberación de efluentes al ambiente (Venkatesha, 2012) (Gusain *et al.*, 2016).

En México, la Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, la NOM-CCA-014-ECOL/1993 y la NOM-065-ECOL-1994 establecen los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a

cuerpos receptores provenientes de la industria textil ("DOF - Diario Oficial de la Federación", 2016).

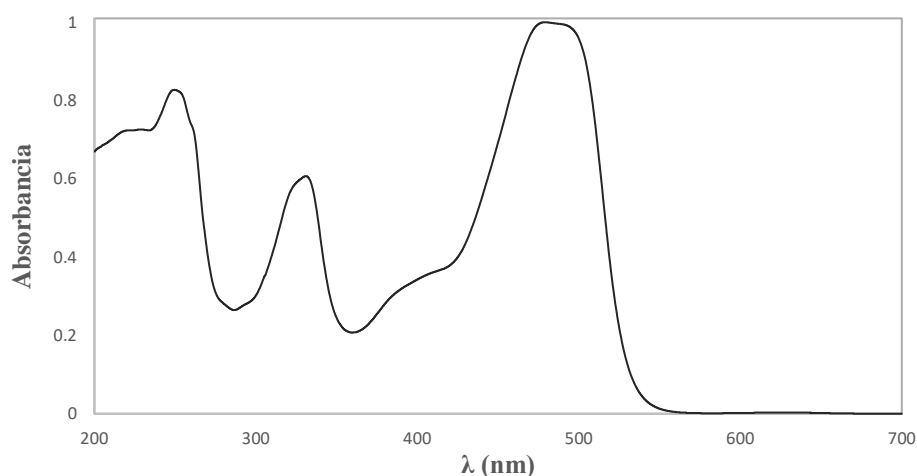
#### 1.2.1.1.1.1 Naranja G

El Naranja G (sal sódica de ácido sulfónico de 4-dimetil aminoazobenceno)(NG), es un colorante ácido (Figura 3), también nombrado como sal de disodio del ácido 1,3-naftalenedisulfónico o 7-hidroxi-8-(fenolazo), con fórmula  $C_{16}H_{10}N_2O_7S_2Na_2$ , con peso molecular 452.38 g/mol, pertenece a los colorantes tipo azo con dos grupos sulfónicos y sus posibles productos de degradación, tales como son las aminas aromáticas son altamente carcinogénicos (Lachheb *et al.*, 2002), Por sus características estructurales puede ser utilizado como modelo de degradación de estructuras aromáticas, debido a que presenta enlaces tipo C=C que comúnmente están presentes en una gran variedad de contaminantes como son los disruptores endócrinos.



**Figura 3. Estructura química del colorante Naranja G.**

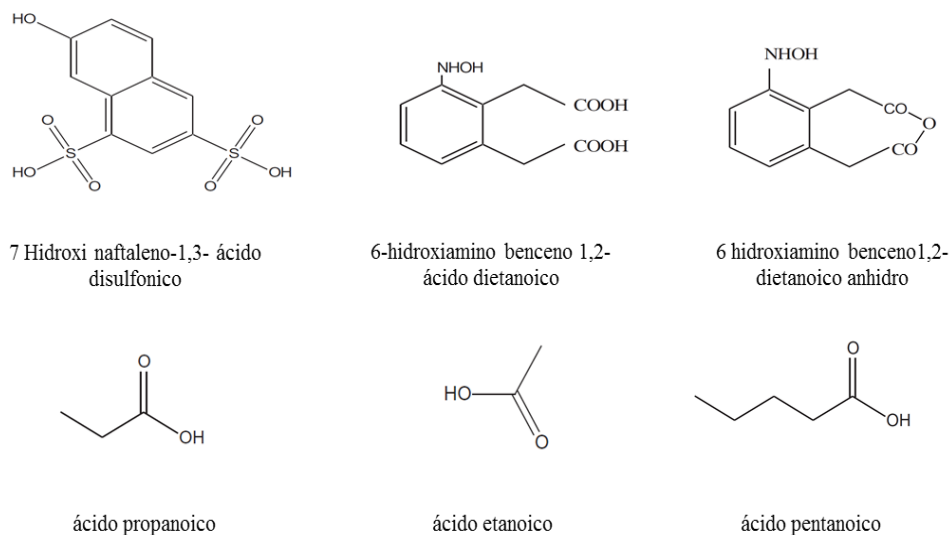
En el espectro de absorción visible de Naranja G (Figura 4), se observa un pico máximo de absorción a 475 nm, el cual caracteriza a al grupo azo. En la región de los 300 a 200 nm se caracterizan los compuestos aromáticos de origen fenólico, como el naftaleno sustituido con grupo OH<sup>-</sup> y un benceno, ambos unidos por un grupo azo, es utilizado en una gran variedad formulaciones en la industria textil, es caracterizado por presentar baja biodegradabilidad y es tóxico para especies marinas (Pereira *et al.*, 2016).



**Figura 4. Espectro de absorción del colorante Naranja G a 3 ppm.**

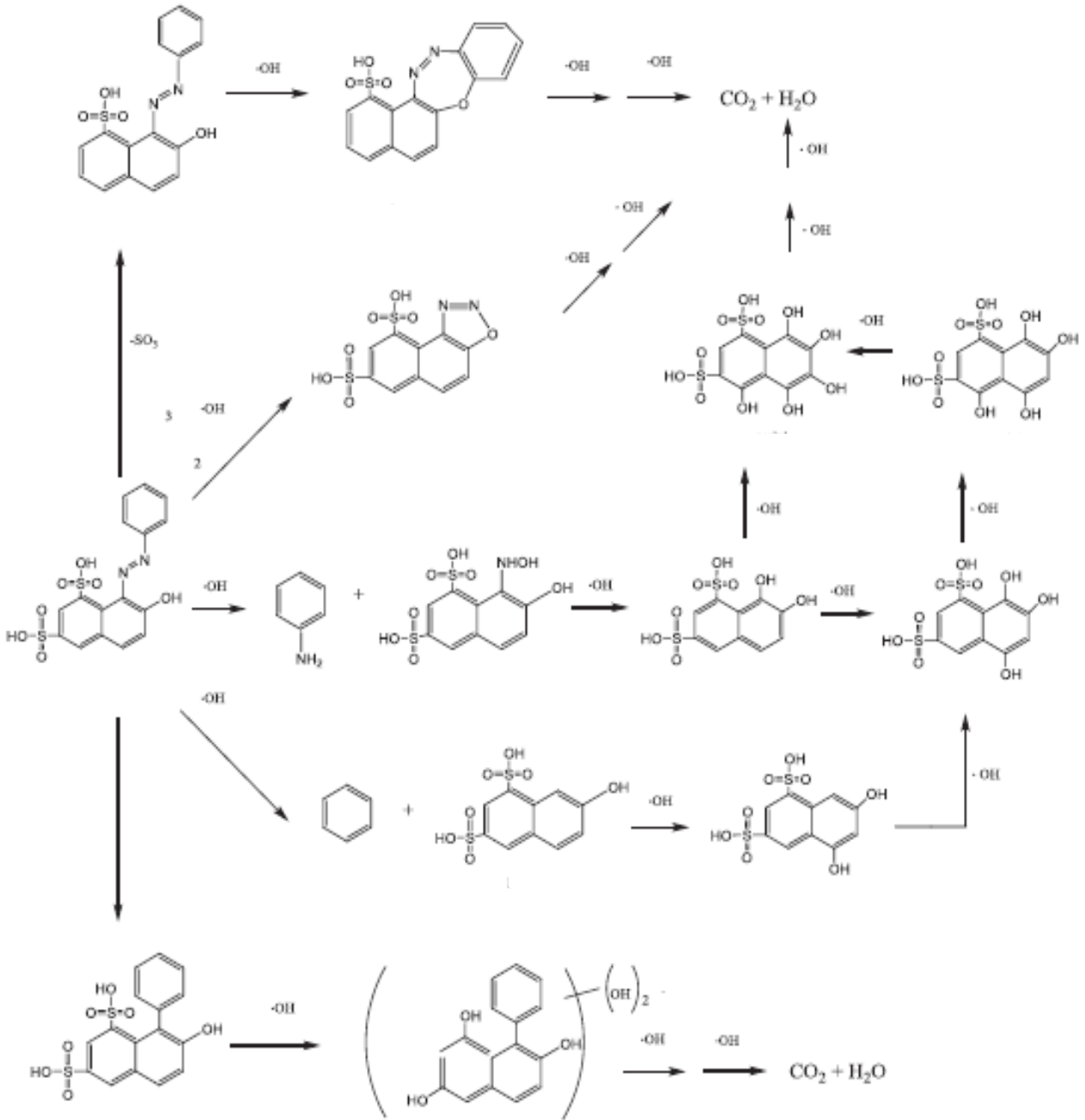
Pereira en el 2016 , reportó su remoción empleando métodos físico químicos como el electro/Fenton y el foto/electro/Fenton, donde se lleva la oxidación por medio de la producción de radicales libres, demostrando que los colorantes tipo azo presentan una refacción particular hacia las oxidaciones electroquímicas, la cual es relacionada con el efecto de la posible sustitución del nitrógeno del enlace azo. Durante la oxidación se presenta la generación de ácidos oxálico, oxámico y formico, posiblemente formados por la escisión de los anillos aromáticos y la formación de complejos como Fe<sup>+3</sup> –oxalato y Fe<sup>+3</sup> – oxamato, también se sugiere la posible formación de intermediarios que pueden reducir el NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y generar especies volátiles como N<sub>2</sub> y N<sub>x</sub>O<sub>y</sub>.

Se han reportado diferentes metabolitos posiblemente formados durante la oxidación de Naranja G por distintos métodos de oxidación, Goel y Lasyal en el 2015, al emplear nano partículas de iridio y hexacianoferrato mostraron la formación de metabolitos más simples y menos peligrosos como; el 6-hidroxiamino benceno 1,2- ácido dietanóico, 6 hidroxiamino benceno1,2-dietanóico anhidro , 7 hidroxí naftaleno-1,3- ácido disulfónico y en mayor proporción ácidos pentanóico, propanóico y etanóico (Figura 5).



**Figura 5. Productos de degradación de Naranja G propuestos por Goel y Lasyal, 2015.**

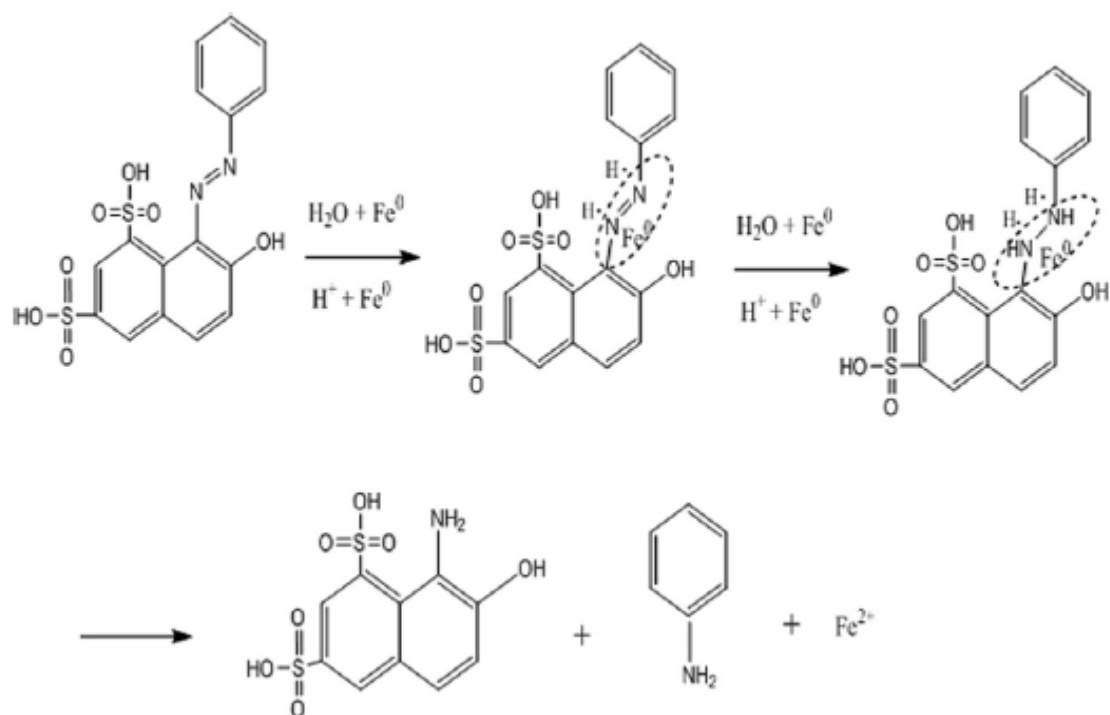
Cai y colaboradores en el 2016(a), reportaron la decoloración de Naranja G mediante cavitación hidrodinámica y un proceso Fenton, propusieron una ruta de degradación, integrando posibles productos generados por el ataque de los radicales hidroxilo, como son anilinas que resultan del rompimiento del enlace C-N, posibles productos hidroxí como 7-hidroxí-8-hidroxiamino naftaleno1-3 ácido disulfónico y del enlace N=N la generación de bencenos y 2 naftol-6,8-ácido disulfónico , está ruta se muestra en la Figura 7.



**Figura 6.** Ruta de degradación de Naranja G propuesta por Cai y colaboradores, 2016(a).

De igual manera se reportó una ruta basada en los productos generados de un proceso Fenton utilizando ozono (Figura 7), el cual fue catalizado con una fuente de hierro con valencia cero lo que involucra el ataque de los átomos de hidrógeno el enlace azo, que provoca la ruptura

el doble enlace, destruyendo así el grupo cromóforo y la oxidación del Fe a ion ferroso (Cai *et al.*, 2016(b)).



**Figura 7. Ruta de degradación de Naranja G propuesta por Cai y colaboradores, 2016 (b).**

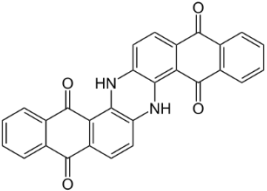
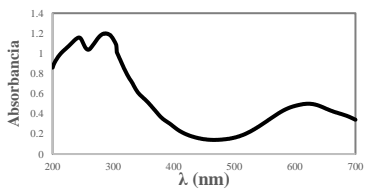
#### 1.2.1.1.2 Azul a la cuba

Los colorantes a la cuba representan aproximadamente el 15% del consumo total de la industria textil, se utilizan principalmente en el teñido de fibras de algodón, sedas y celulosas (Chaari *et al.*, 2009). Son insolubles en agua, pero son disueltos después de una reducción en condiciones alcalinas (Sirianuntapiboon *et al.*, 2006).

El azul a la cuba es también conocido como azul indantreno (características en la tabla 1), fue el primer de los colorantes tipo indantreno preparado por R. Bonn en 1901, es empleado para su uso en textiles, genera coloraciones muy sólidas frente el lavado y a la acción de la luz del sol, pero no resiste a la acción del cloro; A pesar de la excelente calidad de los colorantes a la cuba, prácticamente no se han desarrollado nuevos colorantes a base de

antraquinonas, en los últimos 20 años (Chang *et al.*, 2009). La alta resistencia de los grupos cromóforos y funcionales presentes en las estructuras de los colorantes (azo y antraquinona), a los diversos tratamientos de remoción y su alta estabilidad a la luz del sol, hacen necesario desarrollar métodos de tratamiento inmediatos para remover estos compuestos sin producir otros contaminantes que puedan causar daños ambientales.

**Tabla 1. Características de Azul a la cuba**

<b>Nombre: Azul a la cuba</b> <b>Formula química: C<sub>28</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub></b> <b>Solubilidad en agua: &lt;0.1g / 100 mL a 21°C</b>		<b>Peso Molecular : 442.43 g/mol</b> <b>Colour Index: 69800</b>	
<b>Estructura Molecular</b>		<b>Espectro de adsorción</b>	
			

### 1.3 Tratamientos de eliminación

Para el tratamiento de contaminantes en aguas subterráneas se han evaluado y propuesto diferentes técnicas, las cuales dependen del tipo de sustancia a tratar y de los parámetros de operación de cada una de ellas, por lo que se han reportado procesos basados en principios fisicoquímicos, procedimientos biológicos, y algunos tratamientos avanzados (Kim *et al.*, 2007). Dentro de los tratamientos fisicoquímicos se encuentran los procesos tradicionales de tratamientos de aguas tales como; la coagulación y la floculación, donde se añade un coagulante al agua para crear una atracción entre las partículas en suspensión y se agita lentamente para inducir la agrupación de partículas entre sí para formar flóculos. Sin embargo, estos procesos son incapaces de remover compuestos como las hormonas, productos farmacéuticos y productos domésticos (Bolong *et al.*, 2009).



Entre los procesos que se han empleado para eliminar diversos tipos de contaminantes orgánicos, también se encuentran los Procesos de Oxidación Avanzada (POAs), los cuales generan radicales hidroxilos en cantidades suficientes para ser capaces de oxidar a la mayoría de compuestos orgánicos químicos complejos presentes en aguas subterráneas (Andreozzi, 1999) (Esplugas *et al.*, 2012). Sin embargo, la eficacia de eliminación es una función de la estructura de contaminante, la dosis de oxidante y se requiere de una manipulación cuidadosa, debido a que la reacción de estos químicos produce bioproductos, cuyos efectos se desconocen (Bolong *et al.*, 2009).

Los tratamientos de aguas subterráneas y superficiales empleando métodos convencionales no son del todo satisfactorios, al punto que se ha detectado que muchos compuestos persisten sin alteración alguna aún después de aplicar tratamientos terciarios (Teijon *et al.*, 2010). Por tal razón, es importante identificar y evaluar la eficiencia de otras tecnologías para el tratamiento de aguas, con el fin de proponer alternativas que permitan minimizar la presencia de contaminantes orgánicos a un bajo costo económico, energético y ambiental (Gil *et al.*, 2012).

### **1.3.1 Oxidación vía Fenton**

Existe una gran variedad de publicaciones sobre el uso de los PAOs para la remoción de la materia orgánica y/o contaminantes de aguas contaminadas, de donde se destacan las relacionadas con el proceso de oxidación tipo Fenton, por su efectividad para descontaminación de aguas contaminadas procedentes de industrias petroquímicas, textiles, farmacéutica, papeleras, etc. (Rubio *et al.*, 2014) (Babuponnusami y Muthukumar, 2014)

(Merayo *et al.*, 2013) (Rahim Pouran *et al.*, 2015) (Coelho *et al.*, 2006) (Bianco *et al.*, 2011) (Ghosh *et al.*, 2010). Son muy útiles para contaminantes refractarios que resisten otros métodos de tratamiento, principalmente el biológico, en muchos casos estos procesos consumen menos energía que otros métodos.

La ventaja del proceso Fenton es que se puede obtener una degradación parcial o total de contaminantes inorgánicos y orgánicos persistentes, dando lugar a una disminución de la toxicidad del efluente contaminado (Durán *et al.*, 2011) (Nakagawa *et al.*, 2016), otra ventaja de este método es que no se produce una contaminación secundaria como en el uso de métodos físico (Bagal y Gogate, 2014), no depende de una fuente de energía para producir radicales hidroxilo y las reacciones de oxidación pueden llevarse a cabo en condiciones de presión y temperatura ambiente, los reactivos utilizados son abundantes, comercialmente accesibles y de fácil manejo (Rubio *et al.*, 2014).

La presencia de ligandos del hierro orgánico e inorgánico afecta la reacción Fenton, en la rapidez de reacción como en el tiempo de vida media de los radicales libres, provocando cambios en la concentración de  $\text{Fe}^{+2}$  que afecta a la formación del radical hidroxilo. Por ello, estas reacciones ocurren también con iones metálicos de transición como el  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Cr}^{+3}$  o el  $\text{Cu}^{+2}$ , y se las conoce como reacciones tipo Fenton o Fenton modificado. También se ha demostrado que la presencia de oxalato en condiciones ácidas produce un incremento en la producción de radicales hidroxilo (Godell *et al.* 1997) (Bokare y Choi, 2014).

El grado y la velocidad total de mineralización son independientes del estado de oxidación inicial del Fe. En cambio, la eficiencia y la velocidad inicial de mineralización son mayores cuando se parte de  $\text{Fe}^{+2}$ , en contra parte, las sales de  $\text{Fe}^{+3}$  producen una concentración

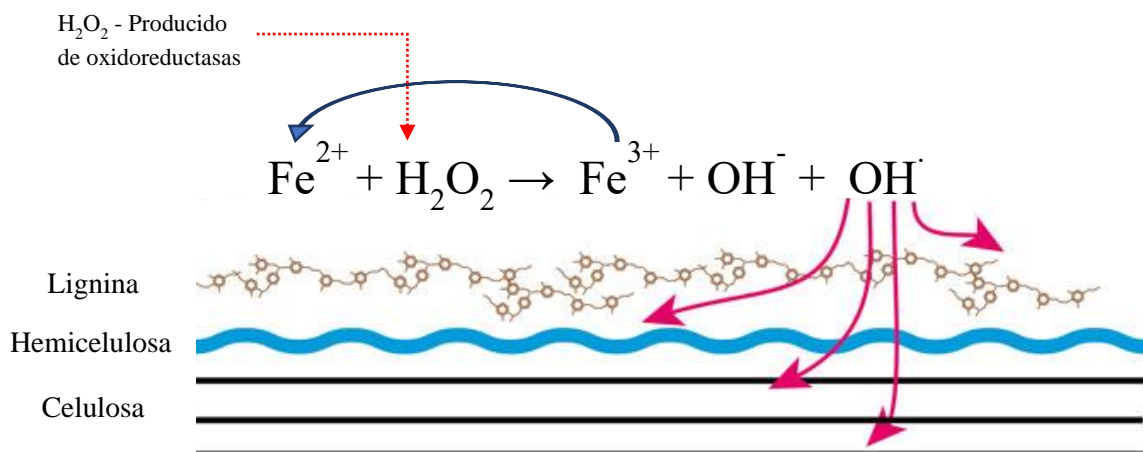
---

estacionaria de  $\text{Fe}^{+2}$ , usando un pH menor que 2.8 (Pignatello *et al.*,2006)(Shima *et al.*,2015)(Babuponnusami y Muthukumar , 2014).

Las reacciones del radical  $\bullet\text{OH}$  con compuestos orgánicos conducen a la formación de radicales de carbono alfa, siempre está presente en muy baja concentración y reacciona de maneras conocidas con los enlaces de los compuestos orgánicos, principalmente, por la abstracción de H de C-H, N-H, u O-H, en los enlaces tipo C=C, la adición de H a los anillos aromáticos por medio de las reacciones 11-13 (Vonsonntag *et al.*, 1997). Los radicales hidroxilo reaccionan con una amplia gama de compuestos, típicamente las reacciones con éstos radicales están limitadas por difusión (Díaz Fonseca, 2011).

#### ***1.3.1.1 Oxidación vía Fenton en sistemas biológicos***

Muchos hongos de podredumbre blanca y café han mostrado producir peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), que es empleado en el proceso de deslignificación por medio del proceso Fenton, provocando la liberación de radicales  $\bullet\text{OH}$  directamente a celulosas, hemicelulosas y a la lignina (Figura 8), creando el rompimiento de diversos enlaces que facilitan la penetración a la pared celular por enzimas lignocelulolíticas.



**Figura 8. Diagrama del ataque de .OH a materia estructural de la madera por hongos de podredumbre blanca y café.**

La abstracción de los hidrógenos de estructuras como polisacáridos en la celulosa por medio de radicales hidroxilos se lleva a cabo mediante la producción de radicales transitorios en el carbono alfa que reaccionan rápidamente con O<sub>2</sub> generando radicales peroxilos (Ek *et al.*, 1989) (Cohen *et al.*, 2002)(Figura 15). Donde si el radical peroxilo tiene un grupo hidroxil en el mismo carbono, elimina al hiperóxido (·OOH) (Hammel *et al.*, 2002).

Estos procesos, explican en gran parte los mecanismos propuestos en el grupo de trabajo (Izcapa *et al.*, 2007; Acosta, 2010) durante la degradación de contaminantes orgánicos por hongos, vía oxidativa (Ramírez, 2009) o reductiva (Izcapa, 2007), sobre todo los filamentosos, dando como resultado productos finales inocuos tales como; dióxido de carbono, agua y sales (Mesquita *et al.*, 2016) o metabolitos de DDE, DDMU, DDD, entre otros (Izcapa *et al.*, 2009). Usualmente no generan desechos que requieren de un proceso de tratamiento y/o disposición, son muy útiles para contaminantes refractarios que resisten otros métodos de tratamiento, principalmente el biológico, sirven para tratar contaminantes a muy baja concentración (por ejemplo, ppb), no se forman subproductos de reacción, o se forman

en baja concentración, son ideales para disminuir la concentración de compuestos formados por pretratamientos alternativos, consumen mucha menos energía que otros métodos (por ejemplo, la incineración).

#### **1.4 Hongos filamentosos**

Hay una gran variedad de microorganismos, tales como bacterias y hongos, que tienen la capacidad de degradar contaminantes orgánicos, se ha reportado una amplia gama de estudios de biodegradación centrados en bacterias debido a la facilidad que ofrecen para estudiar su metabolismo (De la Rosa Cruz *et al.*, 2014). Sin embargo, la capacidad de los hongos para transformar una gran variedad de compuestos orgánicos y llevarlos hasta compuestos más simples ofrece un potencial indiscutible para su utilización en procesos de biorremediación.

La degradación de compuestos orgánicos tóxicos por hongos de podredumbre blanca ha sido ampliamente documentada mientras que la información acerca de los hongos filamentosos es escasa, a pesar de que estos microorganismos son también abundantes en gran medida sitios contaminados. Por lo tanto, todo el potencial de biodegradación de los hongos filamentosos no ha sido plenamente investigado (Potin *et al.*, 2004).

El uso de hongos filamentosos aislados de sitios contaminados ofrecen varias ventajas por varias razones; debido a que la mayoría de ellos ya están adaptados a los contaminantes tienen mayor posibilidad de sobrevivir, su capacidad de extenderse a través del suelo por medio de su crecimiento micelial aumentan sus posibilidades de acceder a los contaminantes (Potin *et al.*, 2004), Muchos hongos son xero- y osmotolerantes, algunos producen enzimas extracelulares que pueden ayudar al metabolismo inicial de los hidrocarburos (Apri *et al.*, 1999).

Se ha reportado que algunos de los hongos filamentosos con capacidad degradativa de contaminantes orgánicos de estructuras complejas, son especies del género *Aspergillus*, el cual se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza pudiéndose aislar de una gran variedad de sustratos. Debido a su la facilidad de dispersión de sus conidios y a su pequeño tamaño, éstos pueden permanecer en suspensión en el ambiente durante un largo tiempo y son una causa frecuente de micosis invasivas. Otras especies del género como *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* y *A. nidulans* (*Emericella nidulans*) ocasionan infecciones invasivas (Abarca, 2000). Algunas especies de dichos hongos son capaces de degradar diferentes tipos de celulosa y biodegradar compuestos fenólicos y una gran variedad de colorantes (Abd El-Rahim *et al.*, 2011).

#### **1.4.1 *Aspergillus niger***

*Aspergillus niger* es un hongo filamentosos hialino, saprofito, perteneciente al filo Ascomycota, clase Eurotiomycetes, orden eurotiales, familia *Trichocomaceae* y genero *Aspergillus*. Se encuentra formado por hifas hialinas septadas y puede tener reproducción sexual (con formación de ascosporas en el interior de ascas) y asexual (con formación de conidios).

En el 2008, Ali y colaboradores reportaron la capacidad de *Aspergillus niger* en la remoción de rojo y amarillo sinosol, obteniendo remociones por arriba el 80% (Ali *et al.*, 2007), en el mismo año Khalaf reportaron la capacidad de un co-cultivo de *A.niger* y *Spirogya* sp. en la biosorción de un efluente con diversos colorantes tipo sinosol, presentando porcentajes entre 80-85% de sorción; En el 2009, Abd El-Rahim emplearon la cepa para la bioremoción de verde y violeta directo logrando generar una remoción del 92%; En el 2010, en un co-cultivo

junto con *Trichoderma* lograron la biosorción de 600ppm de naranja G (Sivasamy y Sundarabal, 2010), en el 2013, Ilyas y Rehman reportaron la decolorización de un efluente con Rojo sinozol en un co-cultivo *Nigrospora* sp.; En el 2014 Benghazi reportó la actividad de dicho hongo, aunado a *Phanerochaete* en la remoción de azul brillante y rojo ácido y en 2016, Tao Lu reportó su actividad en la remoción de rojo congo.

## **1.5 Ácidos orgánicos**

Durante la degradación fúngica de compuestos con estructuras complejas, en particular de la lignina, se ha reportado que la síntesis de moléculas de bajo peso molecular que están involucrados directamente en el metabolismo, como los ácidos orgánicos que facilitan la degradación de la lignina para generar múltiples compuestos de menor peso molecular (Tien y Kirk, 1983) (Mäkelä, 2002) y su catabolismo está relacionado con la obtención de radicales libres (Dutton y Evans, 1996).

### **1.5.1 Ácido oxálico**

El ácido oxálico, es un producto metabólico comúnmente encontrado en medios líquidos en presencia de hongos en el caso de *A. niger*, puede presentarse como un subproducto no deseado de la fermentación del ácido cítrico, su biosíntesis es favorecida a pH cerca o por arriba de la neutralidad (-5-8). Además puede ser debido a los diferentes mecanismos según las condiciones nutricionales en las que se encuentre la cepa; vía la descomposición de oxalacetato a oxalato por medio de la oxalato hidrolasa o por la oxidación del glioxalato vía el ciclo del glioxilato o por la piruvato carboxilasa que es capaz de formar oxalacetato vía citoplasmática evadiendo la producción mitocondrial (Kubicek *et al.*, 1988) (Ruijter *et al.*, 1999).

El ácido oxálico posee tres propiedades importantes: actúa como donador de protones, de electrones y es un fuerte agente quelante de metales, posee un pKa de 1.2 y 4.3. Tiene una amplia variedad de aplicaciones industriales y domésticas (Díaz Fonseca, 2011). Es el ácido orgánico más comúnmente secretado por los hongos filamentosos (Makela *et al.*, 2009) e interviene de diferentes formas durante la degradación de la celulosa y la hemicelulosa presentes en la lignina, a través de la quelación de iones inestables de  $Fe^{+3}$  a  $Fe^{+2}$  y de  $Mn^{3+}$ , proveyendo  $H_2O_2$  y disminuyendo el pH fuera de las hifas, creando así un gradiente de pH, entre el ambiente inmediato del hongo y la pared celular de la madera, promoviendo la degradación de lignina por una hidrólisis ácida. (Mäkelä *et al.*, 2002) (Goodell *et al.*, 1997).

Según Dutton y Evans (1996) el ácido oxálico confiere un beneficio significativo de supervivencia en ambientes diversos o lleva a cabo funciones esenciales en el metabolismo de hongos para esté haya resistido a las presiones evolutivas. El ácido oxálico en forma de oxalato está implicado en diversas funciones del crecimiento y metabolismo de los hongos, en reacciones de defensa y la captación de nutrientes. Se han descrito dos rutas para la biosíntesis del ácido oxálico, la primera es en las mitocondrias y se produce como un componente de desecho del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, e involucra la ruptura hidrolítica del oxaloacetato en oxalato y acetato por la oxaloacetasa. La segunda vía tiene lugar en los glioxisomas a través del ciclo del glioxilato, mediante la oxidación del glioxilato a oxalato por acción de la glioxal oxidasa (Mäkelä *et al.*, 2002) y también por la ruptura hidrolítica del oxaloacetato (Munir *et al.*, 2001).



### 1.5.2 Ácido glucónico

El ácido glucónico (AG), es un ácido orgánico que facilita la degradación fúngica de la lignina, es un ácido suave producto del metabolismo celular de muchos organismos. Es producido por una variedad de microorganismos entre los que destacan las bacteria *Azospirillum* spp (Rodríguez *et al.*,2004), *Escherichia coli* HB101 (Shih *et al.*,1992), *Acetobacter diazotrophicus* (Attwood *et al.*, 1991), *Gluconobacter oxydans* (Velizarov & Beschkov, 1998), *Zymomonas mobilis* (Silveira *et al.*, 1999), *Schizosaccharomyces pombe* (Peinado *et al.*,2007) y los hongos filamentosos *Aspergillus carbonarius* (Yang *et al.*, 2016), *Aureobasidium pullulans* (Anastassiadis y Rehm, 2006), *Penicillium variable* P16 (Vassilev *et al.*, 1996).

A diferencia de otros ácidos orgánicos derivados de la glucólisis en donde la glucosa es utilizada por el organismo, convertida en ácido y exportada al medio, el ácido glucónico se produce extracelularmente. La glucosa del medio es oxidada en ácido glucónico en una reacción por medio de acción de la glucosa oxidasa. Esta habilidad de producción del ácido gluconico es más inusual que el catabolismo de la glucosa mediante la glucolisis (Bohlmann, Cameselle *et al.*,1998) (Ramachandran *et al.*, 2006).

En cultivos con *Aspergillus niger* la generación de diversos ácidos orgánicos como el cítrico, oxálico y el glucónico dependerán de las condiciones nutricionales como la fuente de carbono y las condiciones de operación (Bohlmann *et al.*,1998) (Mandal y Banerjee, 2005), en limitaciones de fuente de carbono, presencia de sales de Fe y Mn, se favorece la producción de diversos ácidos orgánicos, en especial de ácido oxálico, por la inducción de la oxalacetasa al ajustar el pH de 7 con carbonato de calcio (Lenz *et al.*,1976); Pedersen y colaboradores en el 2000, reportaron la inducción de la oxalacetato hidrolasa que lleva acabo la hidrólisis

---

M en C. Lira Pérez Juana (2021), Cinvestav Página 33

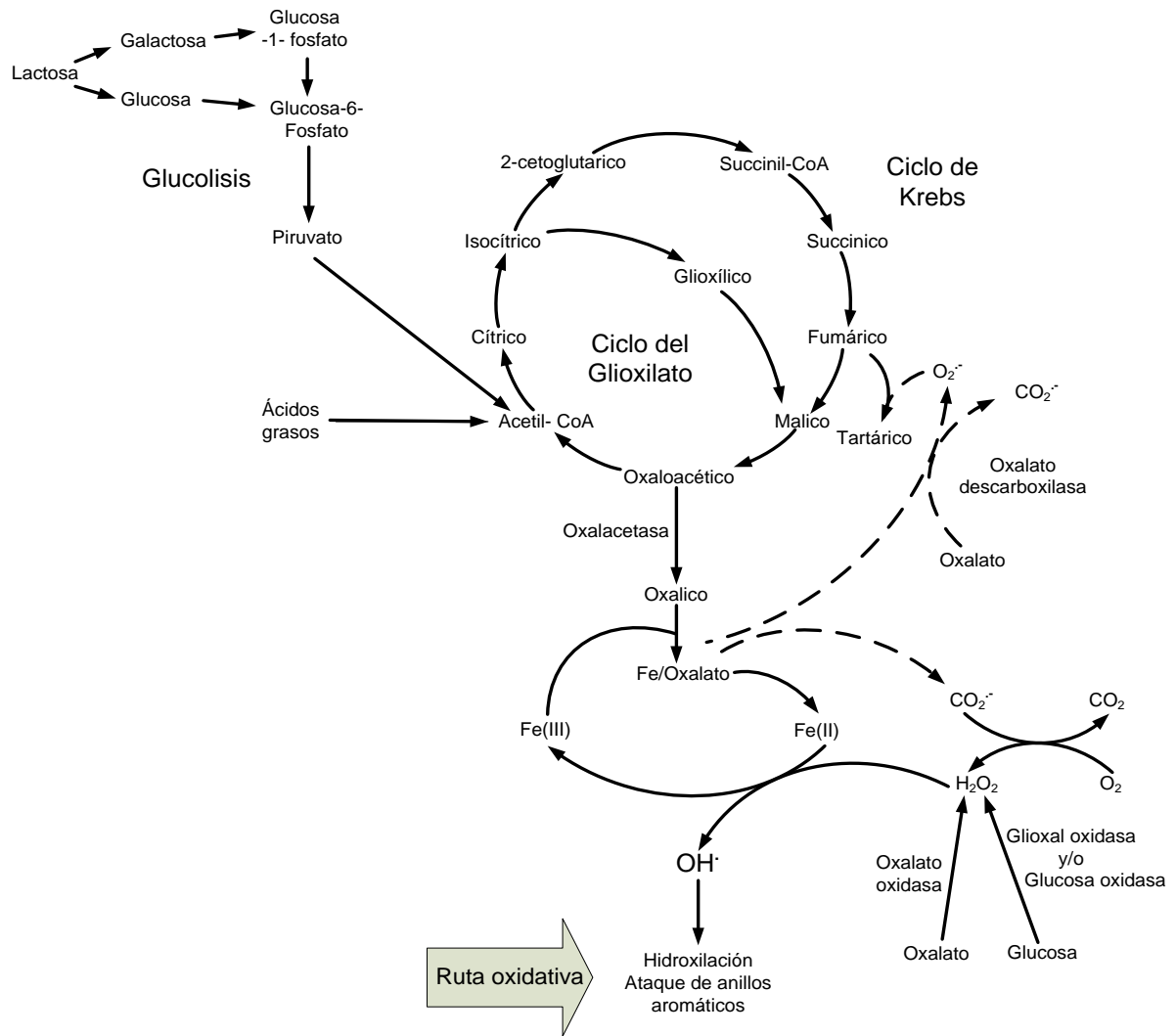
del oxalacetato en oxalato y acetato, depende no solo del pH del medio sino también de la fuente de carbono, generando mayor actividad en medios con fuentes de carbono como el acetato y lactosa, con fuentes de nitrógeno con nitratos y extracto de levadura, encontrando menor actividad en medios con glucosa. Díaz Fonseca en el 2011, sugiere que el mayor efecto sobre la producción de ácidos orgánicos es la fuente de nitrógeno, puesto que los compuestos nitrogenados como el amonio, glutamina y el glutamato son usados preferentemente por los hongos para su metabolismo primario y en concentraciones bajas o nulas, utilizan fuentes alternas como los nitratos, nitritos, purinas, aminas y algunos aminoácidos de proteínas.

Se ha reportado que algunas cepas de *A. niger* son capaces de generar principalmente ácido oxálico y cítrico de fuentes como la galactosa y lactosa dependiendo las condiciones de operación y en el caso de utilizar glucosa es rápidamente convertida en ácido glucónico (Mandal y Banerjee, 2005) (Díaz, 2011).

Se han reportado una gran variedad de rendimientos debido a que *A. niger* es capaz de producir altas concentraciones de ácido oxálico utilizando glucosa o lactosa como fuente de carbono, manteniendo el pH superior a 6 en medios ricos en nitrógeno y fósforo; Empleando solo lactosa como fuente de carbono alcanza un rendimiento de 0.6 kg de ácido oxálico/ kg de lactosa y se presenta una ausencia de ácido cítrico y glucónico (Bohlmann *et al.*, 1998). Así como el consumo de lactosa es mucho menor en comparación al de la glucosa durante los mismo periodos, duplicando los rendimientos en la generación de ácido oxálico (Mandal y Banerjee, 2005). Muller en 1965, reporta que *A. niger* genera de 0.846 mg de ácido oxálico/L por gramo de glucosa a las 48 h en un medio con sulfato de amonio y 0.0970 mg/L por 100

gramos de lactosa con la misma fuente de nitrógeno, por lo que está no afecto en la generación de ácidos orgánicos; 6.3g de ácido oxálico/50g de glucosa (Diaz ,2011); 26.62 g de ácido oxálico /100 g de lactosa, 8.13 g de ácido oxálico/100g de sacarosa y 5.75 g de ácido oxálico /100g de glucosa reportan Mandal y Banerjee en 2005, Ritschkoff, y col. en 1995 reportaron la producción de 13g de ácido oxálico/20g de glucosa en 45 h en cultivos con *Postia placenta*.

En el grupo de trabajo se ha detectado la producción de peróxido de hidrógeno, así como la formación de los ácidos orgánicos oxálico y tartárico, lo que provoca una reducción del pH y se ha logrado detectar la formación de radicales libres que se correlacionan a la degradación de compuestos orgánicos peligrosos (Izcapa *et al.*, 2009). Con base a estos hallazgos, en este trabajo se propone un mecanismo de degradación de compuestos orgánicos por *A.niger* a través de la formación de radicales libres como radicales hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ), radicales anión superóxido ( $\text{O}_2\bullet^-$ ), radicales anión dióxido de carbono( $\text{CO}_2\bullet^-$ ). Posiblemente generados por el complejo ferrioxalato a través de la reacción de  $\text{Fe}^{+3}$  con ácido oxálico producido por el hongo, y por las reacciones redox de  $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$  involucradas en la reacción Fenton, (figura 9). Por lo que el sistema empleando hongos en un sistema con Fe resulta de interés en la biodegradación de compuestos tóxicos presentes en aguas subterráneas.



**Figura 9. Mecanismo para la degradación de compuestos contaminantes.** Propuesto por Rodríguez- Vázquez (Comunicación Personal).

## 2. JUSTIFICACIÓN

Es de gran importancia la problemática relacionada con la contaminación por compuestos tóxicos de aguas subterráneas, debido al riesgo potencial que representan para la salud pública y el ambiente. Debido a que la utilización del agua subterránea se ha venido incrementando en el mundo desde tiempos atrás y cada día gana en importancia, por el agotamiento o no existencia de fuentes superficiales. Se estima que más de la mitad de la población mundial depende del agua subterránea como fuente de agua potable.

Los tratamientos de aguas subterráneas y superficiales empleando métodos convencionales no son del todo satisfactorios, al punto que se ha detectado que muchos compuestos persisten sin alteración, aún en la etapa posterior de aplicar tratamientos terciarios convencionales. Por tal razón, es importante identificar y evaluar la eficiencia de otras tecnologías para el tratamiento de aguas, con el fin de proponer alternativas que permitan minimizar la presencia de contaminantes orgánicos a un bajo costo económico, energético y ambiental.

Uno de los métodos de tratamiento alternativo y/o complementario a los sistemas de biodegradación convencionales son los PAOs. Estos procesos degradan los compuestos orgánicos de más bajo peso molecular, dando resultado productos finales inocuos tales como el dióxido de carbono, agua y sales. Estas tecnologías implican la generación de radicales hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) en cantidades suficientes como para degradar la materia orgánica del medio. Este tipo de procesos, a través de la generación de radicales libres por microorganismos y particularmente por hongos, ha sido documentado en investigaciones previas por el grupo de trabajo (Izcapa *et al.*, 2009). Dado la bondad del proceso biológico, resulta de importancia en la biorremediación de suelo o agua contaminada. Sobre todo, considerando la presencia

de algunos metales como el Fe, que podrían estar originando un aumento en las propiedades catalíticas, en presencia de algunos metabolitos generados por los hongos, como son los ácidos orgánicos (Izcapa *et al*, 2009). Por lo que el sistema empleando los hongos en presencia con Fe resulta de interés en la biodegradación de compuestos tóxicos presentes en aguas profundas.

---

### 3. HIPÓTESIS

El tipo de fuente de carbono (glucosa y lactosa) y de hierro ( $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ ) del cultivo de *Aspergillus niger*, afectará la generación de ácidos orgánicos y la eficiencia de remoción de naranja G

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la fuente de carbono y de hierro en la producción de ácidos orgánicos y en la degradación del colorante naranja G por *Aspergillus niger*.

### 4.2 Objetivos específicos

Evaluar la generación de ácidos orgánicos por *A. niger* utilizando glucosa y lactosa como fuente de carbono.

Evaluar el efecto de dos fuentes de hierro ( $\text{FeSO}_4$  y  $\text{FeCl}_3$ ) y su interacción con los ácidos orgánicos en la degradación del colorante naranja G.

Determinar el rol de la actividad enzimática de oxidoreductasas de *A. niger* en la degradación de naranja G.



## 5. MATERIALES Y METODOS

### 5.1 Microorganismos

La cepa de *Aspergillus niger* CDBB-H-175 se obtuvo de la Colección nacional de cepas microbianas y cultivos celulares del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

#### 5.1.1 Medios de cultivo Wunder

La composición del medio de cultivo Wunder (Wunder et al.,1994), en g/L: glucosa, 10; polipeptona, 1.0;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1.0 ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.875;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.125;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.1;  $\text{NaCl}$ , 0.1;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.02;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.001.

#### 5.1.2 Medio de cultivo Sivakumar

La composición del medio de cultivo Sivakumar (Sivakumar et al.,2010) en g/L: glucosa, 20,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.0; extracto de levadura, 2.5;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  , 0.05;  $\text{MgSO}_4$  ,0.5;  $\text{CaCl}_2$  , 0.01;  $\text{FeSO}_4$  , 0.01;  $\text{MnSO}_4$  , 0.001;  $\text{ZnSO}_4$ , 0.001;  $\text{CuSO}_4$  , 0.002.

#### 5.1.3 Preparación de inóculo

La biomasa para inóculo se preparó creciendo el hongo en medio sólido Agar Papa Dextrosa (PDA) a 28°C durante 5 días. Después del crecimiento de la colonia se adicionaron 6 discos de agar de 6 mm de diámetro, cortados de la parte más externa del micelio, a cada matraz Erlenmeyer de 500 mL de capacidad conteniendo 170 ml de medio Wunder. El hongo se incubó a 28°C y 125 rpm. Después de 3 días se filtraron los matraces a un filtro metálico de poro de 1 mm para obtener la biomasa, trabajando dentro de la campana de flujo laminar con

todo el material esterilizado, se tomó una muestra para determinar la humedad de la biomasa en una termobalanza y se realizaron los cálculos para inocular 1.5 g/L de biomasa peso seco.

## **5.2 Degradación de colorantes en medio sólido**

Una vez que la cepa fue cultivada en PDA se cortaron discos de agar con micelio de 6 mm, se inocularon en el centro de cajas Petri de 90 mm las cuales contenían medio Wunder, adicionadas con colorante (naranja G, azul a la cuba, rosa de bengala, azul turquesa, verde de malaquita), a 100, 250 y 500 mg/L de cada colorante, como control se inocularon cajas con medio sin colorante. Las cajas Petri inoculadas se colocaron en un incubador bacteriológico a 28°C y cada 24 horas se midió el diámetro del micelio con un Vernier milimétrico durante 7 días y se determinaron las velocidades máximas de crecimiento radial ( $\mu$  max.).

## **5.3 Concentración mínima inhibitoria (CMI)**

Se inocularon 1.5 g/L de biomasa de *A. niger* en medio contenido en matraces Erlenmeyer de 150 mL de capacidad y 40 ml de medio Wunder, adicionados con 10, 100, 200, 400, 800, 1600 y 3200 mg/L de naranja G. El hongo se incubó a 28°C y 125 rpm, durante 12 días y se tomaron muestras cada 48 h, se calcularon los parámetros: velocidad específica máxima de crecimiento ( $\mu$  max), velocidad específica de consumo de glucosa ( $K_G$ ), velocidad específica de decoloración ( $K_{NG}$ ) y decoloración de naranja G.

## **5.4 Sorción de naranja G por biomasa fúngica de *Aspergillus niger***

Se propuso un diseño experimental factorial fraccionado  $2^{4-1=3}$ . Las variables independientes fueron seleccionadas con base en lo reportado por Mustafa y col. en el 2017; Los valores propuestos para las variables fueron concentración de color (200 y 400 mg/L), pH (2 y 5),

agitación (60 y 180 rpm), tiempo de contacto (30 y 90 min), como variable respuesta se calculó el porcentaje de decoloración y la capacidad de adsorción ( $q_e$ ). La cantidad de colorante adsorbido por la biomasa al equilibrio se calculó utilizando la ecuación 2:

$$q_e = \frac{(C_i - C_f)}{W} V \quad (2)$$

Donde,  $q_e$  es la cantidad de colorante sorbido por gramo de biosorbente en equilibrio (mg/g),  $C_i$  y  $C_f$  son la concentración inicial y final del colorante (mg/L) respectivamente,  $V$ (L) es el volumen de la solución con el colorante y  $W$ (g) es el peso del sorbente utilizado. Una vez obtenido el modelo de respuesta del diseño experimental se aplicó un diseño experimental de optimización.

### **5.5 Optimización de la sorción de azul a la cuba 4 por biomasa fúngica**

Se aplicó un diseño factorial fraccionado  $2^{4-1=3}$ . Las variables independientes fueron seleccionadas con base en lo reportado por Mustafa y col. en el 2017. Los valores propuestos para las variables fueron concentración de color (50 y 100 mg/L), pH (3 y 5), agitación (60 y 180 rpm), tiempo de contacto (30 y 90 min), como variable respuesta se calculó el porcentaje de decoloración y se estimó la capacidad de adsorción ( $q_e$ ). Posteriormente de la selección de variables, se obtuvo el modelo de primer orden para la optimización de la variable respuesta mediante la metodología de ascenso más pronunciado y se aplicó el diseño compuesto central (DCC).

### **5.6 Determinación de GOX y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante la sorción de azul a la cuba**

Para determinar el rol de la actividad enzimática GOX, la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante la sorción de azul a la cuba , en biomasa fúngica de *A. niger*, se decidió emplear tres tipos de inactivación de biomasa, con el objetivo de disminuir la actividad biológica de la cepa, M en C. Lira Pérez Juana (2021), Cinvestav

priorizando la remoción del colorante por solo sorción en los componentes estructurales de la pared celular de la cepa.

Se emplearon dos procesos de inactivación de la biomasa activa de *A. niger*, el primero fue empleando un método de calor en cual se llevó a cabo por dos ciclos de calentamiento en agua desionizada a 90 °C durante 15 min. Posteriormente se aplicaron tres enjuagues con abundante agua desionizada, el segundo fue empleando un inhibidor metabólico, azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ) a una concentración de 5 mM, la cual se puso en contacto con la biomasa activa durante 60 min a 125 rpm y se aplicaron tres enjuagues con abundante agua desionizada (Devi et al. 2008), como control se utilizó biomasa activa sin ningún tratamiento. Posteriormente de los tratamientos la biomasa fue inoculada a medios contenidos en matraces Erlenmeyer de 150 mL de capacidad, con 40 ml de medio Wunder, adicionados con 150 mg/L de azul a la cuba. El hongo se incubó a 28°C y 180 rpm, durante 150 min y se tomaron muestras cada 15 min; al medio sin biomasa se le determinó la actividad enzimática, generación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y remoción de colorante.

### **5.7 Efecto de la fuente de carbono y de hierro en la remoción de naranja G**

Con el objetivo de conocer el efecto de la fuente de carbono en la producción de ácidos orgánicos y su interacción con distintas fuentes de hierro durante la de decoloración de naranja G, se planteó un diseño factorial  $2^2$ , en este tipo de diseños experimentales se observan los efectos principales de las variables (Montgomery, 2003). Las variables independientes fueron la fuente de carbono (10 g/L), glucosa y lactosa y la fuente de hierro (0.001g/L), sulfato ferroso y cloruro férrico; La variable respuesta fue la remoción de naranja G. Las condiciones empleadas fueron: medio de cultivo Wunder, agitación de 125 rpm, pH.

En el medio libre de células se identificaron y cuantificaron los ácidos orgánicos generados por *A. niger* en las diferentes condiciones.

### **5.8 Perfiles de Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> y Fe<sub>Total</sub> durante la degradación de naranja G**

Se llevó el seguimiento del cambio de valencia del hierro durante la remoción de naranja G, como indicativo de las reacciones redox entre Fe<sup>+</sup> y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generando durante el metabolismo de *A. niger*. Por lo que se inocularon 1.5 g/L de biomasa en medio Wunder, pH 6, glucosa como fuente de carbono, FeSO<sub>4</sub> como fuente de hierro, agitación de 125 rpm, 28°C, 200 mg/L de naranja G, con muestreo cada 48 horas, durante de 240 h. En el medio libre de células se cuantificó el hierro en base al método de fenantrolina para Fe<sup>2+</sup> y Fe<sub>Total</sub>, la diferencia entre el Fe<sub>Total</sub> y el Fe<sup>2+</sup> se consideró como Fe<sup>3+</sup>.

### **5.9 Generación de ácidos orgánicos por *A. niger* durante la degradación de naranja G**

Durante la degradación de naranja G se llevó acabo el seguimiento e identificación de la generación de ácidos orgánicos por la cepa de *A. niger*, se inocularon 1.5 g/L de biomasa en matraces Erlenmeyer de 150 mL de capacidad conteniendo 40 ml de medio Wunder, adicionados con 200 mg/L de naranja G. El hongo se incubó a 28°C y 125 rpm. Como control se emplearon las mismas condiciones eliminando el colorante con el objetivo de conocer la generación de ácidos orgánicos de manera constitutiva por la cepa. En el medio libre de células se preparó para la identificación y cuantificación de peroxidasa ácidos orgánicos.

### **5.10 Degradación de naranja G mediante un co-cultivo de *A. niger* y basidiomicetes**

Se llevó el seguimiento de la degradación de naranja G, generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la actividad enzimática ligninolítica (lacasas, manganeso peroxidasa, lignina peroxidasa) en mono cultivos y co-cultivos de *A. niger*, Los basidiomicetes empleados fueron: *T. máxima*,

*Ganoderma* spp. y *T. versicolor*. Se utilizó el medio Sivakumar adicionado con 100 mg/L de naranja G, 29 °C, y 125 rpm.

## **5.11 Métodos analíticos**

### **5.11.1 Determinación de biomasa en peso seco**

Los cultivos fueron filtrados al vacío en un matraz Kitasato con un embudo de porcelana y papel filtro de poro medio a peso constante. Se secó el papel filtro con la biomasa en la estufa a 80°C durante 24 h, posteriormente se colocó en un desecador durante una hora y se pesó para determinar la biomasa en peso seco.

### **5.11.2 Cuantificación de azúcares reductores**

La cuantificación de azúcares reductores fue de acuerdo con Miller et al., (1959), en el caso de la lactosa se empleó el mismo método de cuantificación (Villena y Gutiérrez, 2003). Se preparó el reactivo DNS según Miller et al., 1959 con una composición:

- 1% Ácido dinitrosalicílico
- 0.2% Fenol
- 0.05% Bisulfito de sodio
- 1% Hidróxido de sodio 0.25N
- 20% Tartrato de sodio y potasio

Se pesaron 20g de NaOH y se disolvieron en 800 mL de agua destilada, lentamente se añadieron 400g de tartrato de sodio y potasio, una vez bien disuelto se agregó 1 g de bisulfito de sodio, se agregaron 3.75 mL de fenol líquido, 500 mL de agua destilada, lentamente y poco a poco se agregaron 20 g de ácido dinitrosalicílico alternado con poco de agua hasta alcanzar el aforo de 2 L, la mezcla se realizó todo esto se llevó a cabo en un agitador magnético y a baja temperatura evitando la ebullición.

Se elaboraron las curvas estándares de glucosa y lactosa con concentraciones conocidas de 0 a 2 g/L. Las curvas y las muestras libres de micelio se trataron de la misma manera. Se tomó 1 mL de muestra y se le adicionó 1 mL de reactivo DNS, se agitó y se calentó por 5 min en agua a 80°C, posteriormente se agregó 4 mL de agua destilada a temperatura ambiente y se dejó enfriar por 5 min, se midió la absorbancia a  $\lambda$  de 575 nm. De acuerdo con la absorbancia de las curvas estándar se generaron las ecuaciones para determinar glucosa y lactosa en las muestras: glucosa =  $ABS/0.6895$ ,  $r^2= 0.9916$ , lactosa=  $ABS/0.4921$ ,  $r^2= 0.9815$ .

### **5.11.3 Determinación de pH**

El pH se midió mediante un potenciómetro marca Hanna modelo H12212. El equipo se calibró a pH 4 y 7 a temperatura ambiente. Las lecturas de pH se realizaron en muestras libres de biomasa.

### **5.11.4 Determinación de potencial redox**

El potencial redox se midió mediante una sonda multiparamétrica marca Hanna modelo H19829-00041, sonda número H17609829-1

### **5.11.5 Identificación de ácidos orgánicos por HPLC**

La identificación de los ácidos orgánicos: oxálico, cítrico, málico, succínico, fórmico y acético se realizó por comparación con los tiempos de retención del mix de estándares marca Bio-rad número de catálogo 125-0586 y los ácidos glucónico y tartárico por comparación con los tiempos de retención de los estándares comerciales (Sigma-Aldrich) correspondientes. El tratamiento de las muestras se efectuó de la siguiente manera: el medio obtenido de la filtración de los cultivos de *A. niger* se filtraron al vacío en un matraz Kitasato M en C. Lira Pérez Juana (2021), Cinvestav

con un embudo de porcelana y papel filtro de poro medio, se confirmó que el pH fuera de valore de 2-3, de lo contrario se ajustó el pH con HCl 3N y la mezcla se filtró por una membrana de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$ . Del eluato se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  con una presión de 50 mbar durante 4 seg, la detección se realizó en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) con detector de diodos marca Thermo scientific, modelo UltiMate 3000 a 210 nm empleando como fase móvil 0.005M de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a un flujo de 0.6 mL/min a temperatura ambiente, como fase estacionaria se utilizó una columna Aminex HPX-87H marca Bio-Rad, con soporte de Copolímero de Sulfonato-divinil-benceno-estireno, de 30 cm de longitud y 7.8 mm de diámetro.

#### **5.11.6 Cuantificación del carbono orgánico total (TOC)**

El TOC se determinó mediante un analizador de TOC de combustión marca Teledyne Tekmar, modelo TOC torch. Se empleó una curva estándar con ftalato de hidrógeno y potasio de 0 a 25 ppm, para la determinación de las muestras una vez libres de micelio se filtraron con una membrana de 0.2  $\mu\text{m}$ .

#### **5.11.7 Determinación de la glucosa oxidasa**

La actividad de la glucosa oxidasa (GOX) se determinó de acuerdo con Sousa et al.,2017. Se uso como sustrato cromogénico la O-dianisidina a una temperatura de 35°C. La actividad de GOX fue expresada como actividad enzimática volumétrica (U/mL) donde una unidad (U) se definió como la oxidación enzimática de 1  $\mu\text{mol}$  O- dianisidina  $\text{mL}^{-1} \text{min}^{-1}$ . En el caso del blanco se remplazó el extracto enzimático con agua. El procedimiento de la mezcla de reacción fue:



1. En un tubo de ensaye agregar 100  $\mu\text{L}$  de D-glucosa 0.01M
2. Agregar 100  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático y mezclar
3. Agregar 750  $\mu\text{L}$  de O-dianisidina (0.02%) en buffer de fosfatos pH 7.0 y mezclar
4. Agregar 1000  $\mu\text{L}$  de peroxidasa de rábano (POD) 5 U/mL
5. Mezclar y dejar reaccionar 10 min a una temperatura de 35 °C
6. Agregar 500  $\mu\text{L}$  de HCl 4N
7. Leer en espectrofotómetro a 500 nm

Las unidades enzimáticas se obtuvieron de acuerdo con la ecuación:

$$U_{GOX} = \frac{(ABS \times Vt \times FD) * t}{\epsilon \times \lambda \times Vm}$$

Donde:

$ABS = ABS_{500 \text{ nm}}$

$Vt =$  Volumen total del ensayo (2 mL)

$t =$  Tiempo de reacción (10 min)

$\epsilon =$  Coeficiente de extinción milimolar de O-dianisidina a 500 nm ( $7.5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

$\lambda =$  Longitud de la celda (1 cm)

$Vm =$  Volumen de la muestra (extracto enzimático) (0.1 mL)

$FD =$  Factor de dilución

### 5.11.8 Determinación de la glioxal oxidasa

La actividad de la glioxal oxidasa (GLIOX) se determinó de acuerdo con Roncal et al.,2011.

Se usó como sustrato cromogénico rojo de fenol y como sustrato enzimático metil glioxal a una temperatura de 28°C. La actividad de GLIOX fue expresada como actividad enzimática volumétrica (U/mL) donde una unidad (U) se definió como la oxidación enzimática de 1  $\mu\text{mol}$  rojo de fenol  $\text{mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . En el caso del blanco se reemplazó el extracto enzimático con agua. El procedimiento de la mezcla de reacción fue:

1. En un tubo de ensaye agregar 300  $\mu\text{L}$  de Buffer de succinatos 50 mM pH 6.0
2. Agregar 200  $\mu\text{L}$  de Metil glioxal 10 mM y mezclar
3. Agregar 300  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático mezclar
4. Agregar 100  $\mu\text{L}$  de rojo de fenol 0.01% y mezclar

5. Agregar 100  $\mu\text{L}$  de peroxidasa de rábano (POD) 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$
6. Mezclar y dejar reaccionar 10 min a una temperatura de 28  $^{\circ}\text{C}$
7. Agregar 75 $\mu\text{L}$  de NaOH 2M
8. Leer en espectrofotómetro a 610 nm

Las unidades enzimáticas se obtuvieron de acuerdo con la ecuación:

$$U_{GLIOX} = \frac{(ABS \times Vt \times FD) * t}{\epsilon \times \lambda \times Vm}$$

Donde:

$ABS = ABS_{610 \text{ nm}}$

$Vt =$  Volumen total del ensaño (1 mL)

$t =$  Tiempo de reacción (10 min)

$\epsilon =$  Coeficiente de extinción milimolar del rojo de fenol a 610 nm ( $3.57 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

$\lambda =$  Longitud de la celda (1 cm)

$Vm =$  Volumen de la muestra (extracto enzimático) (0.3 mL)

$FD =$  Factor de dilución

### 5.11.9 Determinación de la lacasas

Las actividades de Lacasas se determinaron de acuerdo con Jimenez et al.,2018. Mediante la oxidación de 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS) a temperatura ambiente (25 $^{\circ}\text{C}$ ) la mezcla de reacción contenía 5.0 mM ABTS (Roche, Germany) y 100 mM regulados de acetatos (pH 4.5). El cambio en la absorbancia en presencia de la enzima fue monitoreado por 3 min a 420 nm ( $\epsilon = 3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). La actividad de lacasas fue expresada como actividad enzimática específica (U/mg proteína) donde una unidad (U) se definió como la oxidación enzimática de 1  $\mu\text{mol}$  ABTS  $\text{mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . El procedimiento de la mezcla de reacción fue:

1. En un tubo de ensaye agregar 600  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático.
2. Agregar 300  $\mu\text{L}$  de buffer de acetatos 0.1M pH 4.5 y mezclar
3. Agregar 100  $\mu\text{L}$  de ABTS 5mM y mezclar

4. Iniciar la lectura en espectrofotómetro a 420 nm de 0- 3 min

Las unidades enzimáticas se obtuvieron de acuerdo con la ecuación:

$$U_{Lac} = \frac{ABS \times Vt}{t \times \varepsilon \times \lambda \times Vm} \times 1000000 \times FD$$

Donde :

$ABS = ABS_{Final} - ABS_{Inicial}$

$Vt =$  Volumen total del ensaño (1 mL)

$t =$  Tiempo de reacción (3 min)

$\varepsilon =$  Coeficiente de extinción milimolar del ABTS a 420 nm ( $36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

$\lambda =$  Longitud de la celda (1 cm)

$Vm =$  Volumen de la muestra (extracto enzimático) (0.6 mL)

$FD =$  Factor de dilución

#### **5.11.10 Determinación de la Manganese peroxidasa**

Las actividades de MnP se determinaron de acuerdo con Glenn y Gold, 1983. En un matraz volumétrico de 1 ml, se agregaron 2 mM  $\text{MnSO}_4$ , 0.1% albúmina de huevo, 25 mM de lactato de sodio, 0.2% rojo fenol, extracto enzimático del cultivo y 20 mM de regulador lactato-succinato (pH 4.5). La reacción fue iniciada agregando 2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  (2 N). La absorbancia se midió a 610 nm frente a un blanco que sustituía el extracto enzimático con medio de cultivo estéril en su mezcla de reacción. El coeficiente de extinción molar del rojo de fenol oxidado a 610 nm es  $22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Las actividades de MnP se expresaron como actividades enzimáticas específicas ( $\text{U mg protein}^{-1}$ ) en donde una unidad de actividad de MnP (U) se definió como la formación enzimática de  $1 \mu\text{mol}$  rojo de fenol oxidado  $\text{mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . El procedimiento de la mezcla de reacción fue:

1. En un tubo de ensaye agregar 50  $\mu\text{L}$  de rojo de fenol 0.2%
2. Agregar 50  $\mu\text{L}$  de lactato de sodio 0.5M y mezclar

3. Agregar 50  $\mu\text{L}$  de sulfato de manganeso 2mM y mezclar
4. Agregar 50  $\mu\text{L}$  de Albumina de huevo 2% y mezclar
5. Agregar 50  $\mu\text{L}$  acido succínico 0.4M y mezclar
6. Agregar 700  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático y mezclar
7. Agregar 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  2mM
8. Mezclar y dejar reaccionar 5 minutos a temperatura ambiente
9. Agregar 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaOH}$  2 N
10. Leer en espectrofotómetro a 610 nm

Las unidades enzimáticas se obtuvieron de acuerdo con la ecuación:

$$U_{MnP} = \frac{ABS \times Vt}{t \times \varepsilon \times \lambda \times Vm} \times 1000000 \times FD$$

Donde :

$ABS = ABS_{610\text{nm}}$

$Vt =$  Volumen total del ensaño (1 mL)

$t =$  Tiempo de reacción (5 min)

$\varepsilon =$  Coeficiente de extinción milimolar del rojo de fenol a 610 nm ( $4460 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

$\lambda =$  Longitud de la celda (1 cm)

$Vm =$  Volumen de la muestra (extracto enzimático) (0.7 mL)

$FD =$  Factor de dilución

#### 5.11.11 Determinación de la lignin peroxidasa

La actividad de LiP se determinó de acuerdo con Magalhaes, 1996. La actividad de LiP se determinó mediante la oxidación de alcohol veratrílico a veratril aldehído a 310 nm. Una unidad de actividad enzimática se consideró como la cantidad de enzima necesaria para oxidar un  $\mu\text{mol}$  de alcohol veratrilico  $\text{mL}^{-1}\text{min}^{-1}$ . El procedimiento de la mezcla de reacción fue:

1. En un tubo de ensaye agregar 1.8 mL de extracto enzimático
2. Agregar 100  $\mu\text{L}$  de alcohol veratrílico 50 mM y mezclar
3. Agregar 500  $\mu\text{L}$  de buffer de tartrato de sodio 0,5 M (pH 3,0) y mezclar
4. Agregar 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 mM
5. Mezclar y dejar reaccionar 5 minutos a temperatura ambiente

6. Leer en espectrofotómetro a 310 nm

Las unidades enzimáticas se obtuvieron de acuerdo con la ecuación:

$$U_{LIP} = \frac{ABS \times Vt}{t \times \varepsilon \times \lambda \times Vm} \times 1000000 \times FD$$

Donde :

$ABS = ABS_{310nm}$

$Vt =$  Volumen total del ensaño (2.5 mL)

$t =$  Tiempo de reacción (5 min)

$\varepsilon =$  Coeficiente de extinción milimolar del alcohol veratrilico a 310 nm ( $9330 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

$\lambda =$  Longitud de la celda (1 cm)

$Vm =$  Volumen de la muestra (extracto enzimático) (1.8 mL)

$FD =$  Factor de dilución

#### 5.11.12 Cuantificación de proteína total

Se estimó la proteína total en los extractos enzimáticos por el método de Bradford (Bradford, 1976) se usó albúmina de huevo como un patrón (0-0.2 mg/mL). Según el fundamento la prueba para determinar proteínas por el método de Bradford se basa en el acoplamiento del colorante Azul de Commassie (Blue G-250) a las proteínas. El color máximo se desarrolla en cinco minutos y es estable por una hora.

La curva estándar se construyó a partir de una solución stock de proteína de albúmina de suero de huevo ( $\gamma$ -albumina) de 1 mg/mL. El procedimiento de la mezcla de reacción de las muestras fue:

1. Agregar en un tubo de ensaye 2 mL de extracto enzimático
2. Agregar 2 mL del reactivo de Bradford y mezclar suavemente.
3. Dejar reaccionar 5 minutos a temperatura ambiente y medir la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro.
4. De acuerdo con la absorbancia de la curva estándar se generó la ecuación para determinar la proteína total en las muestras:  $\text{Proteína} = \text{ABS}/0.1615 \text{ } r^2 = 0.9914$

### 5.11.13 Determinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Se empleó la técnica de (Kiassen et al.,1994) en donde se adicionaron 1mL del reactivo A (66 g/L de hidróxido de sodio y 0.2 g/L de molibdato de amonio tetrahidratado (mantener en agitación 10 min) y 1 mL del reactivo B (20 mg/L de biftalato de potasio) a 1 mL de sobrenadante. Se dejó reaccionar por 2 min y se leyó la absorbancia de la muestra a 351 nm. De acuerdo con la absorbancia de la curva estándar se generó la ecuación  $H_2O_2 = ABS/0.3581$ ,  $r^2 = 0.9936$ .

### 5.11.14 Cuantificación de colorantes

La concentración de colorantes se determinó usando un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800. El porcentaje de decoloración de colorantes se definió como la diferencia en la concentración del colorante antes y después de la adsorción y se obtuvo usando la ecuación:

$$Decoloración (\%) = \frac{(C_i - C_f)}{C_i} \times 100$$

Donde  $C_i$  y  $C_f$  son las concentraciones iniciales y finales del colorante (mg/L), respectivamente.

Naranja G: Se generó una curva estándar con concentraciones conocidas a una longitud de onda de 475 nm, obteniendo la ecuación: Naranja G =  $ABS/0.0319$ ,  $r^2 = 0.9952$  para su cuantificación.

Azul a la cuba: Se generó una curva estándar con concentraciones conocidas a una longitud de onda de 630 nm, obteniendo la ecuación: Azul a la cuba =  $ABS/0.0091$ ,  $r^2 = 0.9966$  para su cuantificación.

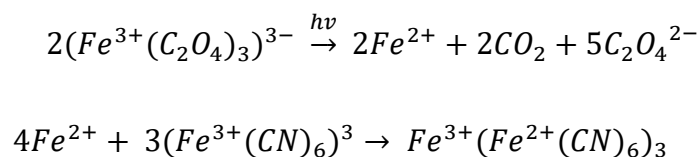
Rosa de bengala: Se generó una curva estándar con concentraciones conocidas a una longitud de onda de 555 nm, obteniendo la ecuación: Rosa de bengala = ABS/0.0402,  $r^2= 0.9553$  para su cuantificación.

Azul turquesa: Se generó una curva estándar con concentraciones conocidas a una longitud de onda de 620 nm, obteniendo la ecuación: Azul turquesa = ABS/0.0185,  $r^2= 0.9964$  para su cuantificación.

Verde de malaquita: Se generó una curva estándar con concentraciones conocidas a una longitud de onda de 620 nm, obteniendo la ecuación: Verde de malaquita = ABS/0.0663,  $r^2= 0.9963$  para su cuantificación.

#### 5.11.15 Determinación del complejo ferrioxalato

Para la determinación cualitativa de la formación del complejo ferrioxalato se empleó un método colorimétrico mediante la reacción del ferrioxalato con el hexaciano ferricianato de potasio ( $K_3Fe(CN)_6$ ) que produce la coloración azul de Prusia por fotólisis después de dos horas de exposición a la luz del sol, de acuerdo con la siguiente reacción.



En tubo de ensayo se agregaron 10 ml de medio de cultivo filtrado y 0.375 mg de  $K_3Fe(CN)_6$  se agitó la mezcla de reacción y se expuso la radiación solar durante dos horas y se observa si se aprecia la formación de la coloración azul, también se leyó la absorbancia a 340 nm para determinar la presencia de  $Fe^{3+}$  y de  $Fe^{2+}$  a 420 nm.

### 5.11.16 Cuantificación de Fe<sup>total</sup>, Fe<sup>+2</sup> y Fe<sup>+3</sup>

La cuantificación de Fe<sup>total</sup>, Fe<sup>+2</sup> y Fe<sup>+3</sup> fue mediante la técnica de fenantrolina modificada según Kaksonen et al., 2014. Donde se prepararon las soluciones:

HCl 0.2 M. Se adicionó lentamente 1.64 mL de HCl para diluir en 25 mL de agua destilada.

Se aforó a 100 mL el volumen final de la solución. Nota:  $\rho = 1.2$  g/mL y pureza 37 % p/p.

1,10-Fenantrolina monohidratada (1g/L). Se disolvió 0.1 g de Fenantrolina monohidratada en 40 mL de agua destilada y se aforó a 100 mL el volumen final de la solución.

Buffer de acetato de amonio. Se disolvió 25 g de acetato de amonio (CH<sub>3</sub>OONH<sub>4</sub>), en 18 ml de agua destilada y 70 ml de ácido acético glacial.

Clorhidrato de Hidroxilamina 0.1 g/mL. Se disolvió 10g de clorhidrato de hidroxilamina (NH<sub>2</sub>OH\*HCl), en 100 mL de agua destilada.

Acetato de sodio. Se disolvió 25 gr de acetato de sodio (CH<sub>3</sub>COONa·3H<sub>2</sub>O), en 100 mL.

Para la preparación de muestra:

En un tubo de ensayo se adicionó 1 mL de la solución de HCl 0.2 M., 2 mL la solución de 1,10-Fenantrolina monohidratada (1 g/L), 1 mL de la solución de Buffer de acetato de amonio, 1 mL de la muestra diluida, se mezcló y se midió en el espectrofotómetro a 510 nm.

Nota: para medir Fe<sup>Total</sup>, en un tubo se puso 1 mL de la solución de Clorhidrato de hidroxilamina, 1 mL de la solución de acetato de sodio y 1 mL del medio del cultivo. Esto se tomó como la muestra problema y se agregó como lo menciona el paso.



Se elaboró una curva estándar con una solución Stock de sulfato ferroso (200  $\mu\text{g Fe}^{2+}/\text{mL}$ ). La cual se elaboró: Se vació lentamente 2 mL de HCl concentrado en 5 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ , se disolvió 0.1 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , sulfato ferroso heptahidratado y se aforó a 100 mL y de acuerdo con la absorbancia de la curva estándar se generó la ecuación  $\text{Fe}^{2+} = (57.787)(\text{ABS})$ ,  $r^2 = 0.9997$ . La cuantificación de  $\text{Fe}^{3+}$  fue mediante la diferencia del  $\text{Fe}^{\text{total}}$  y el  $\text{Fe}^{+2}$ .

#### **5.11.17 Identificación de naranja G por HPLC**

La identificación de naranja G y sus posibles metabolitos se realizó por comparación con los tiempos de retención del estándar de naranja G comercial (Sigma-Aldrich). El tratamiento de las muestras se efectuó de la siguiente manera: el medio obtenido de la filtración de los cultivos de *A. niger* se filtraron al vacío en un matraz Kitasato con un embudo de porcelana y papel filtro de poro medio, la mezcla se filtró por una membrana de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$ . Del eluato se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  con una presión de 50 mbar durante 4 seg, la detección se realizó en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) con detector de diodos marca Thermo scientific, modelo UltiMate 3000 a 475 nm con un scan de 200 a 780nm, empleando como fase móvil acetonitrilo/ácido acético a un flujo de 0.8 mL/min a temperatura ambiente con un gradiente de 5 a 95 en 20 min, como fase estacionaria se utilizó una columna XR-ODSII.

#### **5.11.18 Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

A la biomasa residual obtenida después de los procesos de remoción se les aplicó un lavado con el regulador de fosfatos 0.1 M con pH 7.2, se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en el regulador de fosfatos durante 1 hora, se aplicaron 3 enjuagues de 5 min cada uno con el regulador de fosfatos, se postfijó con tetróxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) al 1% en el regulador de M en C. Lira Pérez Juana (2021), Cinvestav

fosfatos, se aplicaron 3 enjuagues de 5 min cada uno con buffer de fosfatos, todo a temperatura ambiente. La deshidratación se llevó a cabo con alcohol de 50%, 60%, 70%, 80%, 90% durante 10 min cada uno y 3 veces con alcohol absoluto al 100%. Posteriormente se secaron a punto crítico en un critical point dryer Samdri-95 de Tousimis. Y finalmente se sombreadaron con oro en un recubridor Denton Vacuum.

### **5.12 Análisis estadístico**

Cada experimentación se llevó a cabo por triplicado, todos los datos presentados son el promedio y las barras de error representan la desviación estándar. Para la evaluación de las diferencias estadísticamente significativas se aplicó una comparación de medias LSD (Least Significant Differences) y Tukey empleando el software SAS (Statistical Analysis System) versión 6.0. Para todo el análisis estadístico se empleó una  $\alpha = 0.05$ . La programación empleada se presenta en el **ANEXO**.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

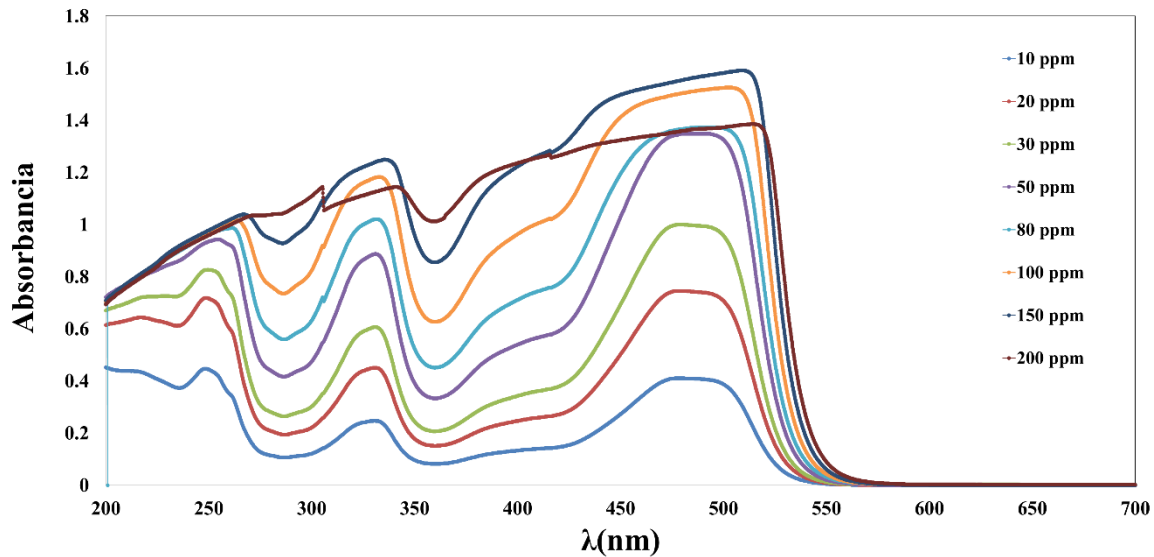
### 6.1 Activación de la cepa

La cepa de *Aspergillus niger* CDBB-H-175 y *Trametes versicolor* CDBB-H-1236 fueron proporcionadas por la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

La activación de las cepas fue en cajas Petri con agar papa dextrosa (PDA), la incubación fue a 28°C en un incubador bacteriológico por un periodo de 8 días entre siembra y siembra, la activación se llevó acabo con una doble resiembra. La conservación de *T.s versicolor* CDBB-H-1236 se realizó en cajas Petri con PDA, se colocó un bloque del agar con el micelio en el centro de la caja y se incubó a 28°C durante 8 días . El hongo se conservó en refrigeración y se resembró mensualmente.

### 6.2 Barrido espectrofotométrico de Naranja G

Los barridos espectrales se realizaron con soluciones de Naranja G de 10 a 200 mg/L y se realizó un barrido de 700 nm a 200 nm en un espectrofotómetro UV-vis Perkin Elmer, Lambda 3A. Los espectros se muestran en la figura 10, en la cual se observa una modificación en la absorción a 300 nm a concentraciones por arriba de 150 mg/L, por lo que las mediciones espectrofotométricas se realizarán por debajo de 100 mg/L.



**Figura 10. Espectros de absorción de naranja G a diferentes concentraciones.**

### **6.3 Efecto de pH en la remoción de naranja G**

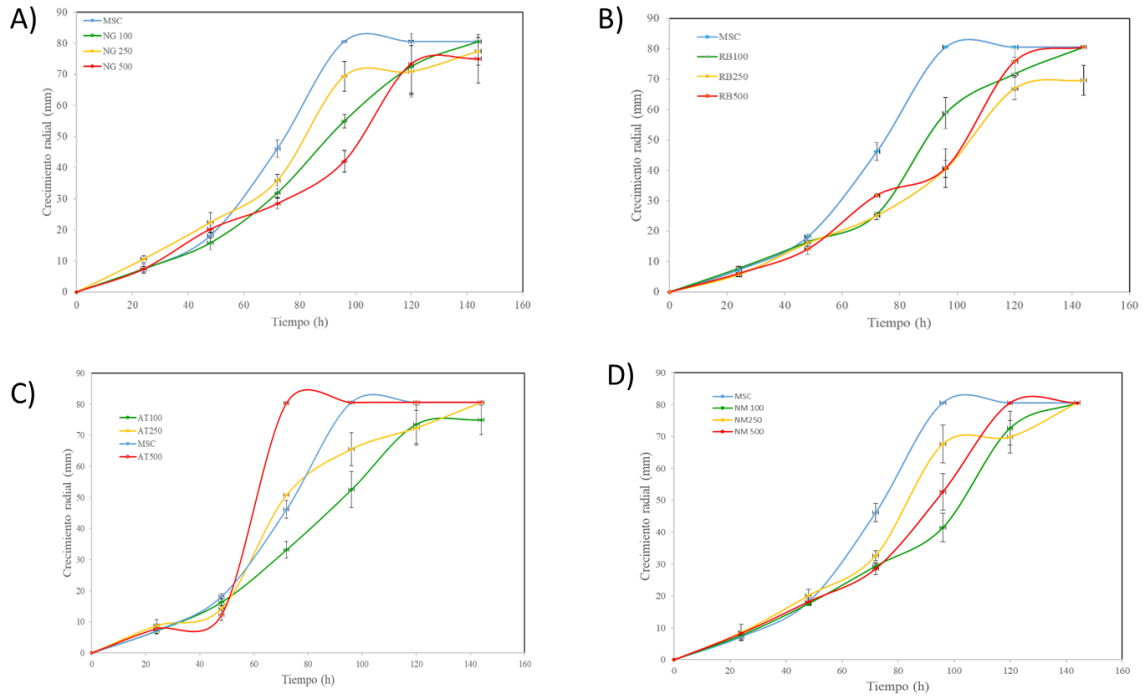
Se evaluó el cambio de pH de la solución con colorante con el fin de determinar su efecto en la decoloración, se comprobó las bandas características del colorante en el espectro de absorción a las diferentes diluciones y valores de pH en el cultivo. Para lo cual se obtuvieron los espectros de absorción en la región visible del Naranja G, a los diversos valores de pH entre 3 y 9 se observó que las bandas de absorción características del grupo azo del colorante, se mantuvieron constantes y sin cambio alguno al variar el pH. Tampoco se observó algún desplazamiento de los picos de absorción. Por lo que se considera que el pH no será un factor importante en la cuantificación e identificación de la estructura de naranja G y su remoción será primordialmente debida a las condiciones metabólicas del hongo.

### **6.4 Determinación del crecimiento radial de *A.niger* y *T.versicolor* en presencia de diferentes colorantes.**

Se utilizará como un control positivo al hongo *T. versicolor* debido a que es un hongo filamentoso con la capacidad de activar su sistema enzimático, en particular las enzimas ligninolíticas para la degradación de distintos colorantes.

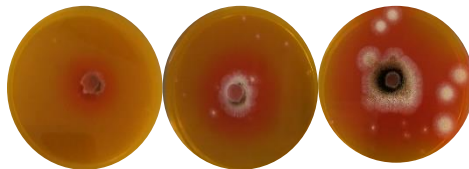
El crecimiento radial de los hongos se midió en medio sólido en placa, para determinar la capacidad de *A. niger* de esporular y de tolerar la presencia de diferentes tipos de colorantes. Las cepas se activaron y conservaron previamente en placa en medio sólido PDA, se cortaron discos de agar de 6 mm con micelio, para inocularlos en el centro de cajas Petri de 9 cm, las cuales contenían medio Wunder, a las cuales se les añadió 100, 250 y 500 mg/L de naranja G, rosa de bengala, naranja de metileno, azul turquesa 86 y verde de malaquita, cada uno de los colorantes por separado, y como control se inocularon cajas con medio sin colorante. Las cajas Petri se colocaron en una incubadora a 28°C cada 24 horas, se midió el diámetro de las colonias con un vernier durante 7 días y se determinaron las velocidades máximas de crecimiento radial ( $\mu$  max). En las siguientes gráficas (Figura 12-14) se presentan las curvas de crecimiento radial de *A. niger* en presencia de diferentes colores a diferentes concentraciones y el control sin colorante.

La cepa utilizada de *Aspergillus niger* CDBB-H-175 tuvo la capacidad de crecer, tener actividad metabólica y capacidad de esporular en los medios sólidos que contenían naranja G, naranja de metileno, azul turquesa 86 y rosa de bengala. Por lo contrario la cepa en los medios sólidos con verde de malaquita, no presentó una actividad metabólica, tampoco crecimiento a ninguna concentración, por lo que no se mostrarán las curvas de crecimiento, ni la velocidad máxima de crecimiento radial.



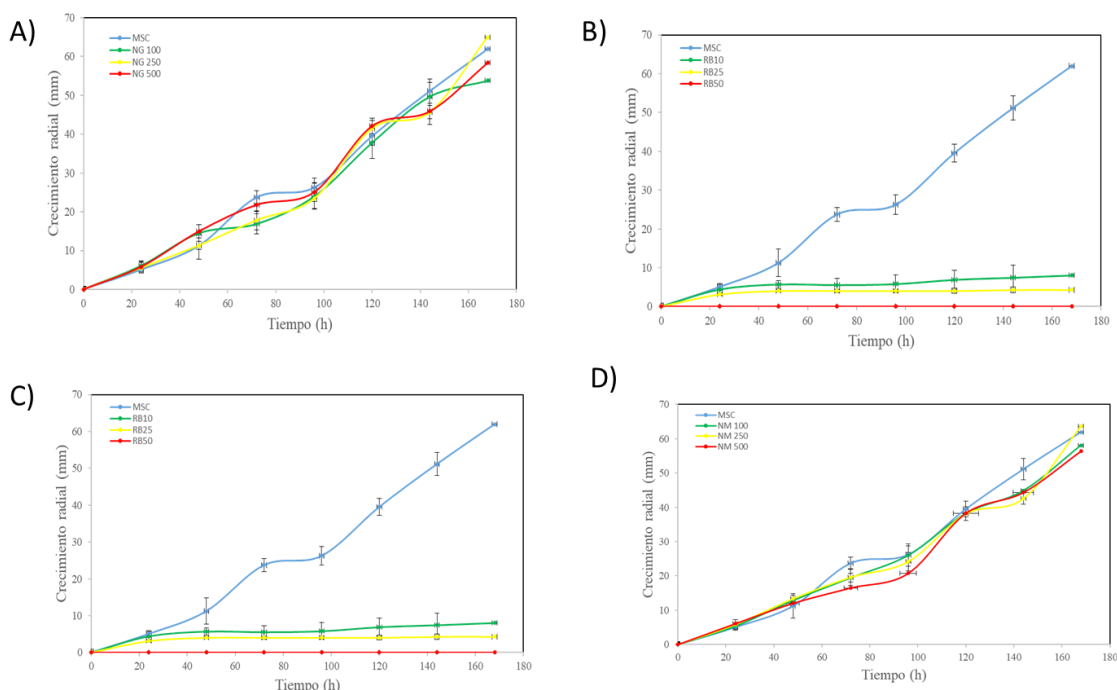
**Figura 11. Crecimiento radial de *A.niger* en medio sólido.** Adicionado con los colorantes: A) naranja B) rosa de bengala, C) azul turquesa 86, D) naranja de metileno

Se comprobó la producción de ácidos orgánicos por *A. niger* en el agar que contenía el colorante naranja de metileno, puesto que este compuesto presentó un cambio de coloración a pH ácido, por lo que el crecimiento del hongo en las placas con agar mostraron halos a las diferentes coloraciones, después de las 24 hr de incubación como se muestra en la figura 12.

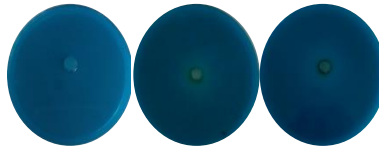


**Figura 12. Crecimiento radial de *A. niger* .** En agar con 10 mg/L de naranja de metileno, a las 24-48-72 h de incubación.

En la figura 13 se presentan las curvas de crecimiento radial de *T. versicolor* en presencia de diferentes colorantes y concentraciones así como el control, sin colorante. La cepa utilizada de *T. versicolor* tuvo la capacidad de crecer, tener actividad metabólica y capacidad de generar micelio en los medios sólidos que contenían naranja G, naranja de metileno y azul turquesa 86. Por lo contrario en los medios sólidos con verde de malaquita, la cepa sólo presentó una ligera actividad metabólica presentando a los de decoloración (Figura 14). Pero no presentó crecimiento en ninguna concentración, tampoco presentó crecimiento en los medios con rosa de bengala por lo que no se mostrarán las curvas de crecimiento.



**Figura 13. Crecimiento radial de *A.niger* en medio sólido.** Adicionado con los colorantes: A) naranja B) rosa de bengala, C) azul turquesa 86, D) naranja de metileno



**Figura 14. Halos de decoloración de *T. versicolor* en agar.** Adicionado con 100 mg/L verde de malaquita a las 24-48-72 h de incubación.

Se calcularon las velocidades específicas de crecimiento para estimar las velocidades máximas de crecimiento radial de *A. niger* y *T. versicolor* en los diferentes medios a diferentes concentraciones, resultados que se muestran en la tabla 2. En las cuales se realizó una prueba de comparación múltiple de Dunnett para estimar la diferencia estadísticamente.

**Tabla 2. Velocidades máximas de crecimiento radial ( $h^{-1}$ )**

	<i>A. niger</i>	<i>T. versicolor</i>
Medio sin color	0.023	0.022
Rosa de bengala (mg/L)		
100	0.019*	0.006
250	0.016*	0.003
500	0.019*	0
Azul turquesa 84 (mg/L)		
100	0.018	0.019
250	0.023	0.017*
500	0.025	0.019
NG (mg/L)		
100	0.020*	0.014*
250	0.019*	0.016*
500	0.017*	0.018*
Naranja de metileno (mg/L)		
100	0.017*	0.017*
250	0.019	0.017*
500	0.016*	0.017*
Verde de malaquita (mg/L)		

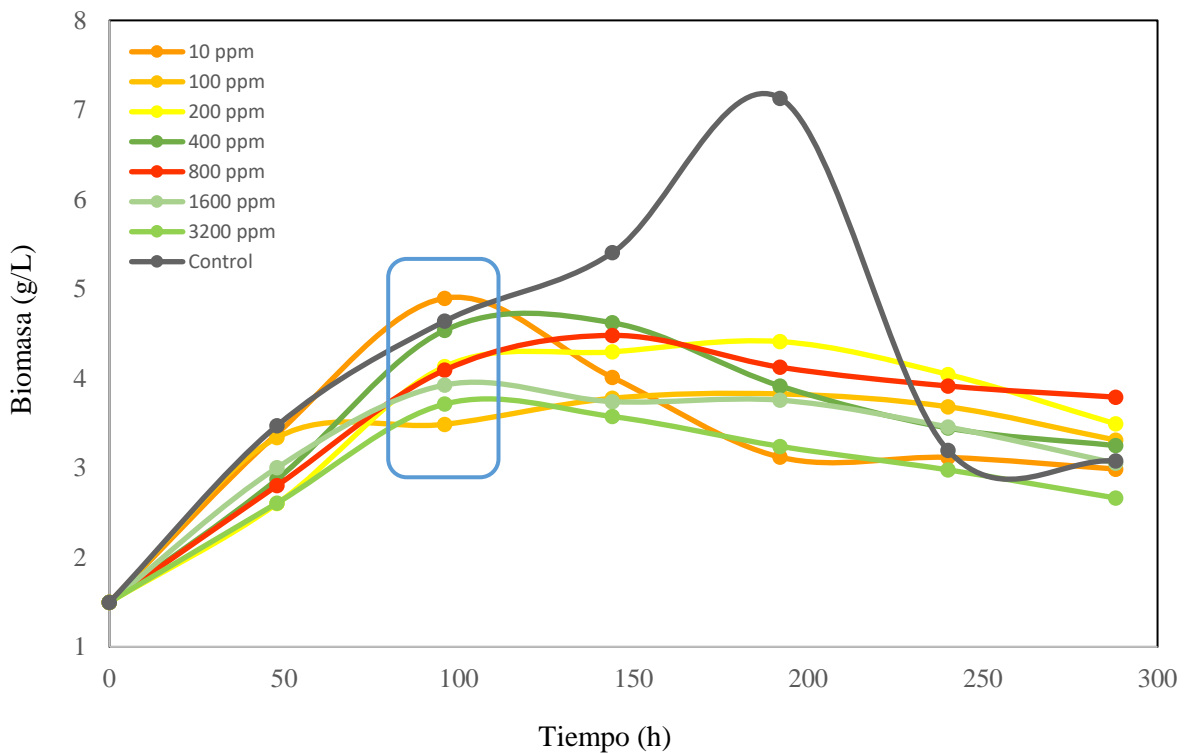


100	0*	0*
250	0*	0*
500	0*	0*

\*Diferencia estadísticamente significativa con una  $\alpha = 0.05$

### 6.5 Concentración mínima inhibitoria (CMI) y estimación de parámetros cinéticos

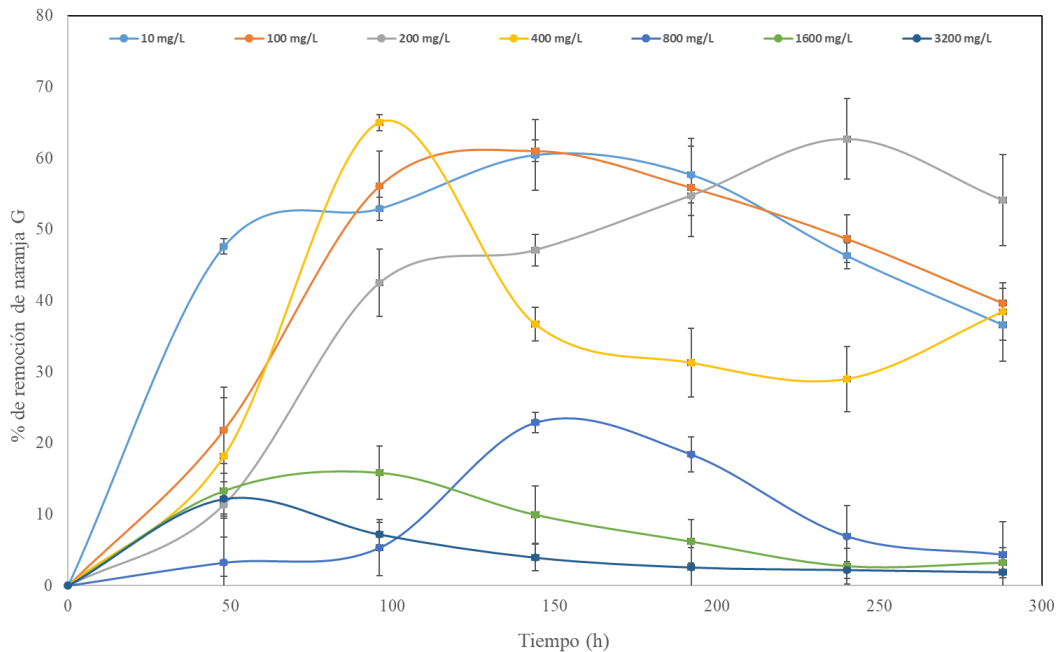
Para observar el efecto de la concentración de NG en el crecimiento de *A. niger* se adicionó de 10 a 3200 mg/L y durante 12 días se tomaron muestras cada 48 h, con lo que se generaron las curvas de crecimiento mostradas en la figura 15. En donde se observa que el crecimiento en el medio control a las 192 h, fue exponencial, alcanzando una biomasa máxima (BM) de 7.13g/L y posteriormente tuvo un rápido decaimiento de la biomasa. En el caso de los medios con NG se tuvo una reducción en la producción de biomasa en todas las concentraciones, lo que sugiere un posible cambio en el metabolismo enfocado a la producción de enzimas degradativas y no a la producción de biomasa, como se ha observado en previos trabajos.



**Figura 15. Cinética de crecimiento de *A. niger* en medio Wunder.** Adicionado con 10, 100, 200, 400, 800, 1600 y 3200 mg/L de NG.

En las cinéticas de crecimiento del hongo adicionadas con NG (Figura 16), donde se observa, una primera fase de crecimiento rápido hasta las 100 h, manteniendo una fase estacionaria hasta las 200 h. posteriormente la fase muerte en 400 mg/L. En caso de 100 mg/L y 200 mg/L de NG se obtuvo una BM de 3.83 g/L y de 4.41 g/L a las 192 h, respectivamente, con 400 mg/L de 4.62 g/L a las 144 h, tiempos que coinciden con los tiempos máximos de remoción de colorante. En todas las condiciones la cepa de *A. niger* tuvo la capacidad de esporular y crecer.

Los resultados demostraron que la eficiencia de remoción de OG es diferente con las diferentes concentraciones del colorante, como se muestra en la figura 16. Los cambios en la concentración de NG se presentaron desde las primeras 48h, donde se obtuvo un 61% de decoloración en el caso de 100 mg/L a las 144 h, un 62% de decoloración en el 200 mg/L a las 240 h, un 65% de decoloración en el 400 mg/L a las 96 h y en caso de 800 mg/L se tiene tan sólo un 18% de decoloración. A esta concentración se presentó una disminución en la producción de biomasa, tomando este punto como la concentración mínima inhibitoria para la cepa de *A. niger*, provocando una reducción de la capacidad de decoloración de NG. Saini en el 2017 reportó el 100% de decoloración de 50 mg/L con nanopartículas de ZnO, Gusain en el 2016 el 92% de decoloración de 50 mg/L con adsorción con zirconia, Zhang en 2016 el 90 % de 10 mg/L degradación de con el uso de enzimas cloroperoxidasas , Qiang en el 2015 el 100% de 10 mg/L por radiación ultrasónica. Por lo que con este estudio se tiene resultados comparables con los procesos estudiados y empleados para la decoloración de este colorante.

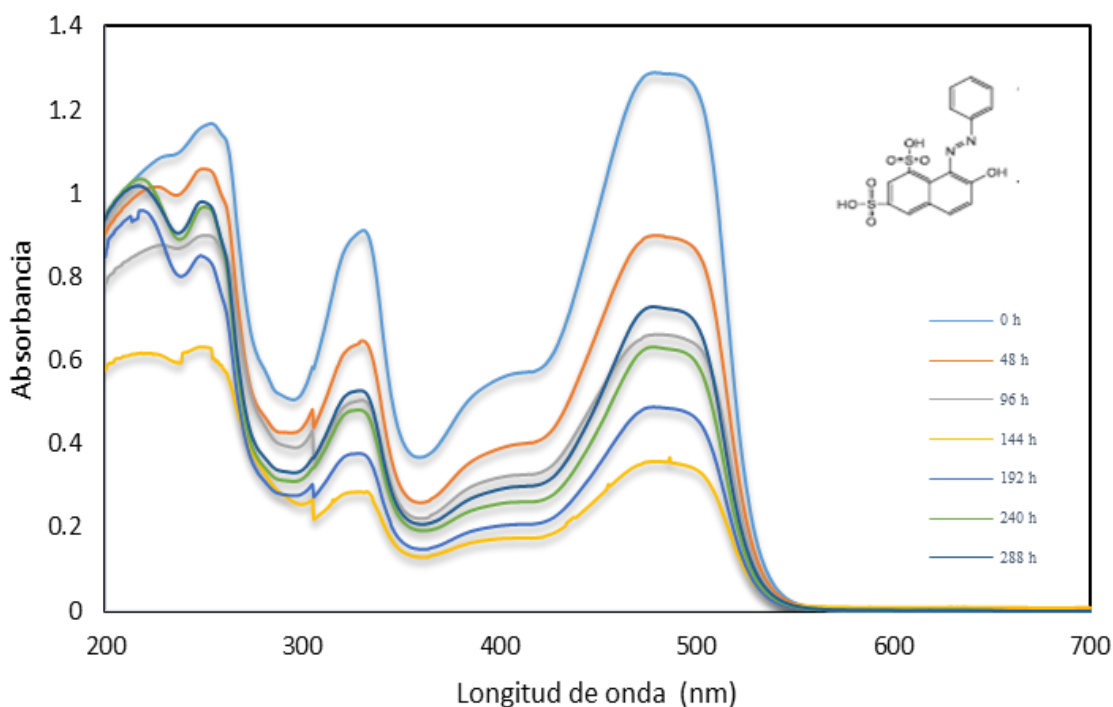


**Figura 16. Decoloración de naranja G por *A.niger* en medio Wunder**

Es importante mencionar con 400 mg/L se obtuvo el mejor porcentaje de decoloración del colorante durante las primeras 96 h y posteriormente hubo un aumento de la lectura de absorción del colorante en el medio, que coincide con la fase de disminución de la biomasa. Esto posiblemente podría ocurrir por efectos de desorción del colorante de la biomasa, puesto que se sabe que la biomasa de hongos filamentosos tiene la capacidad de adsorber estos tipos de colorantes. Con 200 mg/L de NG se obtiene un menor porcentaje de decoloración, además de que se presenta un menor efecto de sorción del colorante, que podría ser debido principalmente a un efecto biótico y no sólo su remoción abiótica por adsorción. Lo anterior se comprueba en los espectros de absorción, que mostraron una biodegradación del colorante en la condición de 200 mg/L, observando una disminución en la absorbancia (figura 17) en la región de 500 nm, donde se presenta la absorción del grupo funcional azo del colorante y

M en C. Lira Pérez Juana (2021), Cinvestav

la aparición de un menor pico de absorción en la región de 300 nm, aunque en esta condición también se presentó el efecto de desorción de NG que coincidió con la fase de muerte del microorganismo.



**Figura 17. Espectros de adsorción de 700 a 200 nm de muestras.** De la cinética de *A. niger* en medio Wunder con 200 mg/L de NG.

Con los datos obtenidos de las cinéticas se calcularon los parámetros cinéticos mostrados en la Tabla 3; velocidad específica máxima de crecimiento ( $\mu$  max), velocidad específica de consumo de glucosa ( $K_G$ ), velocidad específica de decoloración ( $K_{NG}$ ) y la decoloración de naranja G por *A. niger*. Los resultados mostraron que se obtuvo un 65% de decoloración con 400 mg / L del colorante y el porcentaje más bajo en la condición de 800 mg/L de tan solo el 18 %, en el caso de la biomasa máxima se obtuvo a las 144 h, aunque se disminuyó un 40%

en el medio control. La velocidad máxima de crecimiento fue con 100 mg/L, lo que nos sugiere la afinidad del microorganismo por el colorante, generando el doble del valor del medio control. Así mismo, en la condición de 800 mg/L se obtuvo la menor velocidad de crecimiento; esto como se mencionó podría ser por el efecto inhibitorio del colorante al hongo. Guzmán en 1996, reportó la degradación de NG con una cepa de *P. chrysosporium* y *Pleorotus ostreatus*, obteniendo  $\mu_{max}$  ( $h^{-1}$ ) de 0.0108 y 0.0061 respectivamente, una  $K_G$  ( $h^{-1}$ ) de 0.001 y 0.0143, una  $K_{NG}$  ( $h^{-1}$ ) 0.0423 y 0.0639 y un 98 % de remoción con las dos cepas en un medio rico adicionado con 500 mg/L de NG.

**Tabla 3. Efecto de la concentración de NG en los parámetros cinéticos de *A. niger*.**

NG (mg/L)	BM (g/L)	Tiempo de BM (h)	$\mu_{max}$ ( $h^{-1}$ )	$K_G$ ( $h^{-1}$ )	$K_{NG}$ ( $h^{-1}$ )	% Rc
0	7.125 <sup>a±</sup> 0.56	192	0.006 <sup>e</sup>	0.012 <sup>b</sup>	-	-
10	4.897 <sup>b±</sup> 0.24	192	0.009 <sup>a</sup>	0.021 <sup>e</sup>	0.021 <sup>a</sup>	60.45
100	3.827 <sup>d±</sup> 0.04	192	0.012 <sup>f</sup>	0.016 <sup>b</sup>	0.017 <sup>b</sup>	61.04
200	4.412 <sup>bc±</sup> 0.06	192	0.008 <sup>bc</sup>	0.016 <sup>c</sup>	0.015 <sup>ab</sup>	62.68
400	4.622 <sup>b±</sup> 0.28	144	0.009 <sup>ab</sup>	0.016 <sup>b</sup>	0.015 <sup>ab</sup>	65.01
800	4.480 <sup>bc±</sup> 0.37	144	0.008 <sup>d</sup>	0.012 <sup>d</sup>	0.015 <sup>a</sup>	22.90
1600	3.927 <sup>cd±</sup> 0.04	96	0.008 <sup>cd</sup>	0.018 <sup>b</sup>	0.012 <sup>c</sup>	15.86
3200	3.714 <sup>d±</sup> 0.09	96	0.007 <sup>d</sup>	0.021 <sup>a</sup>	0.012 <sup>d</sup>	12.21

Nota: letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas a un  $\alpha=0.05$ .

Debido a que en la experimentación referente a la CMI de naranja G sobre *A. niger*, se presentaron efectos de sorción se decidió evaluar el potencial de utilizar la biomasa fúngica como adsorbente de colorantes en sistemas líquidos. Por lo que se planteó un diseño factorial fraccionado con cuatro variables a dos niveles, con la finalidad de establecer las mejores condiciones para incrementar los procesos de adsorción.

El porcentaje de decoloración de NG fue definido como la diferencia de la concentración del colorante antes y después de la adsorción y fue obtenida usando la ecuación 1:

$$\% \text{ de decoloración} = \frac{(C_i - C_f)}{C_i} \times 100 \quad (1)$$

Donde,  $C_i$  y  $C_f$  son la concentración inicial y final del colorante (mg/L) respectivamente.

La cantidad de colorante adsorbido por la biomasa de *A.niger* al equilibrio se calculó utilizando la ecuación 2:

$$q_e = \frac{(C_i - C_f)}{W} V \quad (2)$$

Donde,  $q_e$  es la cantidad de colorante adsorbido por gramo de biosorbente en equilibrio (mg/g),  $C_i$  y  $C_f$  son la concentración inicial y final del colorante (mg/L) respectivamente,  $V$ (L) es el volumen de la solución con el colorante y  $W$ (g) es el peso del biosorbente utilizado.

## 6.6 Sorción de Naranja G por *A. niger*

### Selección de variables

Se propuso un diseño experimental factorial fraccionado  $2^{4-1=3}$ . Las variables independientes fueron seleccionadas con base en lo reportado por Mustafa et al., (2017); La tabla 4 muestra los valores propuestos para las variables concentración de color, pH, agitación, tiempo de contacto, y como variable respuesta se calculó el porcentaje de decoloración y la capacidad de adsorción ( $q_e$ ). La matriz experimental consistió en ocho corridas que se muestran en la tabla 5 con valores codificados y valores naturales, cada experimentación se realizó por triplicado. Para el análisis estadístico se tomó en cuenta solo los resultados del porcentaje de decoloración.

**Tabla 4. Valores propuestos para la selección de variables para la adsorción de naranja G por *A. niger*.**

Variables	Niveles	
	-1	1
Color (mg/L)	200	400
pH	2	5
Agitación (rpm)	60	180
Tiempo (min)	30	90

La relación entre las variables independientes y el porcentaje de decoloración fue determinada usando un método de modelo lineal generalizado (GLM) que es una generalización flexible de la regresión lineal ordinaria, con el objetivo de describir cómo es que las variables independientes y sus interacciones afectan al proceso de sorción del colorante en la biomasa fúngica. De igual manera se aplicó un método de regresión lineal múltiple (REG) para identificar las variables independientes que tiene efecto significativo en la variable respuesta y poder predecir el comportamiento de estas variables sobre el porcentaje de decoloración del colorante, con el paquete estadístico SAS versión 9.1

**Tabla 5. Matriz experimental para la selección de variables para la adsorción de naranja G por *A. niger*.**

Corrida	Valores Codificados				Valores Naturales			
	Color	pH	Agitación	Tiempo	Color	pH	Agitación	Tiempo
1	-1	-1	-1	-1	200	2	60	30
2	1	-1	-1	1	400	2	60	90
3	-1	1	-1	1	200	5	60	90
4	1	1	-1	-1	400	5	60	30
5	-1	-1	1	1	200	2	180	90
6	1	-1	1	-1	400	2	180	30
7	-1	1	1	-1	200	5	180	30
8	1	1	1	1	400	5	180	90

A las estimaciones del porcentaje de decoloración y capacidad de adsorción se les realizó una comparación múltiple de medias empleando un método de la mínima diferencia

significativa (MDS), a una  $\alpha$  de 0.05, en la cual letras diferentes tiene diferencia estadísticamente significativa e iguales no tiene diferencia significativa como se muestra en la tabla 6.

**Tabla 6. Valores obtenidos para el diseño experimental factorial fraccionado  $2^{4-1} = 3$  para la adsorción de naranja G por *A. niger*.**

Corrida	Color (mg/L)	pH	Agitación (rpm)	Tiempo (min)	% Decoloración	qe (mg/g)
1	200	2	60	30	13.36c $\pm$ 1.66	20.11ed $\pm$ 2.75
2	400	2	60	90	5.98e $\pm$ 0.49	16.63ef $\pm$ 1.34
3	200	5	60	90	14.89bc $\pm$ 1.73	22.4cd $\pm$ 2.84
4	400	5	60	30	4.18e $\pm$ 0.8	11.62f $\pm$ 2.35
5	200	2	180	90	22.24a $\pm$ 0.81	33.47b $\pm$ 1.22
6	400	2	180	30	10.05d $\pm$ 1.61	27.97cb $\pm$ 4.9
7	200	5	180	30	13.31c $\pm$ 0.99	20.04ed $\pm$ 1.54
8	400	5	180	90	16.28b $\pm$ 2.04	45.29a $\pm$ 5.955

Nota: letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas a un  $\alpha=0.05$ .

En donde se obtuvo el mayor porcentaje de decoloración, 22.24% en la corrida 5 con las condiciones de 200 mg/L de colorante, pH 2, agitación de 180 rpm y 90 min de tiempo de contacto.

La relación entre las 4 variables independientes y el porcentaje de decoloración pueden ser aproximados mediante el siguiente modelo polinomial de respuesta:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_i x_i + \varepsilon \quad (3)$$

Donde  $y$  es la variable respuesta (% de decoloración)(% DC);  $x_i$ 's son las variables independientes y  $\varepsilon$ , es el termino residual que representa el error experimental. El parámetro  $\beta_0$  es la gran media que es una constante del modelo;  $\beta_i$  es un coeficiente lineal. Los datos obtenidos fueron ajustados al modelo lineal general y por medio de una regresión lineal se



obtuvieron los coeficientes. El polinomio de respuesta fue calculado con los valores codificados. El cual fue:

$$\%DC = 12.5 - 3.44 x_1 - 0.4x_2 + 2.9x_3 + 2.27x_4 + 1.44x_1x_2 + 1.07x_1x_3 - 0.33x_1x_4 + \varepsilon \quad (4)$$

Donde  $x_1$ , es la concentración del color,  $x_2$ , es el pH,  $x_3$  es la agitación y  $x_4$  es el tiempo de contacto.

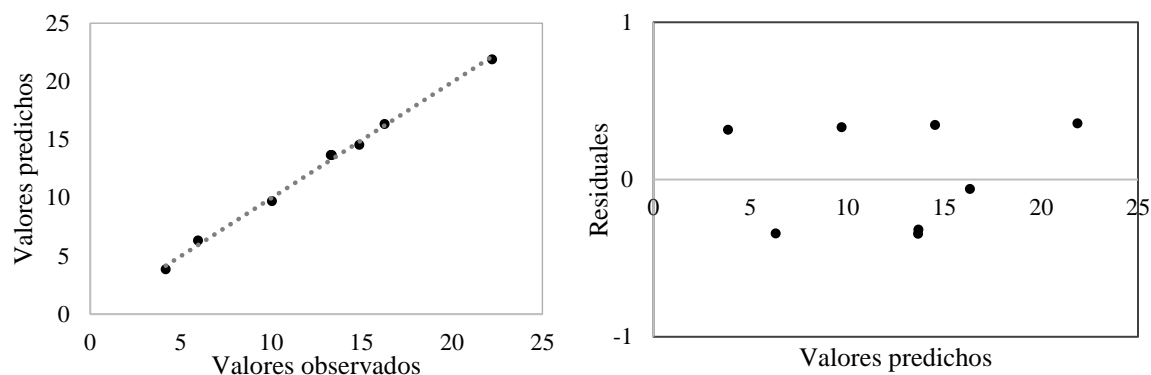
Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) (Tabla 7) para justificar la significación y adecuación de la regresión desarrollada, donde se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.9691 y un coeficiente de variación de 9.41:

**Tabla 7. Análisis de varianza del diseño experimental factorial fraccionado  $2^{4-1=3}$**

	GL	PE	ES	Valor - t	Pr >  t	SE
<b>Intercepción</b>	1	12.505	0.24	52.03	<0.0001	a
<b>Color</b>	1	-3.445	0.24	-14.34	<0.0001	a
<b>pH</b>	1	-0.403	0.24	-1.68	0.1128	b
<b>Agitación</b>	1	2.902	0.24	12.07	<0.0001	a
<b>Tiempo</b>	1	2.278	0.24	9.48	<0.0001	a
<b>Color *pH</b>	1	1.446	0.24	6.02	<0.0001	a
<b>Color*Agitación</b>	1	1.077	0.24	4.48	0.0004	a
<b>Color*Tiempo</b>	1	-0.335	0.24	-1.39	0.1825	b

GL Grados de libertad , PE parámetro estimado, ES Error estándar, SE Significancia estadística, a significativo, b no significativo

La grafica de valores observados contra valores predichos (% de decoloración) y el de valores predichos contra residuales se muestran en las figuras 1



**Figura 18. Análisis de residuos. Valores observados contra valores predichos del % DC de naranja G.**

Como se observa en la figura 18 los puntos residuales generalmente caen sobre la línea recta que indica el error de la distribución normal y valida que el polinomio de respuesta ajusta adecuadamente con los datos experimentales.

Ya que según los resultados de la regresión lineal, el color y la agitación son significativas, se diseñó la matriz experimental para la obtención del modelo de primer orden, el cual consistió en un diseño diseño factorial con puntos centrales.

La matriz experimental consistió en ocho corridas que se muestran en la tabla 8 con valores codificados y valores naturales, cada experimentación se realizó por triplicado.

**Tabla 8. Matriz experimental para la obtención de modelo de primer orden para la adsorción de naranja G por *A. niger*.**

Corrida	Valores codificados		Valores reales	
	Color (mg/L)	Agitación (rpm)	Color (mg/L)	Agitación (rpm)
1	-	-	50	60
2	+	-	200	60
3	-	+	50	180
4	+	+	200	180
5	0	0	125	120
6	0	0	125	120
7	0	0	125	120
8	0	0	125	120

A las estimaciones del % DC y capacidad de adsorción se les realizó una comparación de medias empleando un método de la mínima diferencia significativa (MDS), a una  $\alpha$  de 0.05, en la cual letras diferentes tiene diferencia estadísticamente significativa e iguales no tiene diferencia significativa.

**Tabla 9. Valores obtenidos para la obtención de modelo de primer orden para la adsorción de naranja G por *A.niger*.**

Corrida	Color (mg/L)	Agitación (rpm)	% DC	qe (mg/g)
1	-	-	23.27a	8.57d
2	+	-	17.19c	25.26b
3	-	+	24.05a	8.87d
4	+	+	19.55b	29.17a
5	0	0	17.39bc	16.33c
6	0	0	19.39bc	18.21c
7	0	0	17.33bc	16.28c
8	0	0	17.86bc	17.06c

Nota: letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas a un  $\alpha=0.05$ .

En la tabla 9 se observa que se obtuvo el mayor porcentaje de decoloración, 24% en la corrida 3 con las condiciones de 50 mg/L de colorante, pH 2, agitación de 180 rpm y 90 min de tiempo de contacto. De igual manera se aplicó un método de regresión lineal múltiple (REG) para identificar si las variables independientes tienen efecto significativo en la variable respuesta y poder predecir el comportamiento de estas variables sobre el porcentaje de decoloración del colorante.

El polinomio de respuesta fue calculado con los valores codificados. El cual fue:

$$y (\% DC) = 18.16 - 2.57 x_1 + 0.82x_2 + 0.4x_1x_2 + 2.7x_1^2 + \varepsilon \quad (5)$$

Donde  $x_1$ , es la concentración del color,  $x_2$ , es la agitación.

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) (Tabla 10) para justificar la significación y adecuación de la regresión desarrollada, donde se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.9299 y un coeficiente de variación de 4.123.

**Tabla 10. Análisis de varianza del diseño experimental factorial fraccionado  $2^{4-1=3}$ , para la adsorción de naranja G por *A. niger*.**

	GL	PE	ES	Valor - t	Pr >  t	SE
<b>Intercepción</b>	1	18.18	0.31	59.46	<0.0001	a
<b>Color</b>	1	-2.57	0.28	-9.00	<b>&lt;0.0001</b>	a
<b>Agitación</b>	1	0.82	0.28	2.86	<b>0.0170</b>	a
<b>Color *Agitación</b>	1	0.39	0.28	1.40	0.193	b
<b>Color*Color</b>	1	2.69	0.42	6.45	<0.0001	a

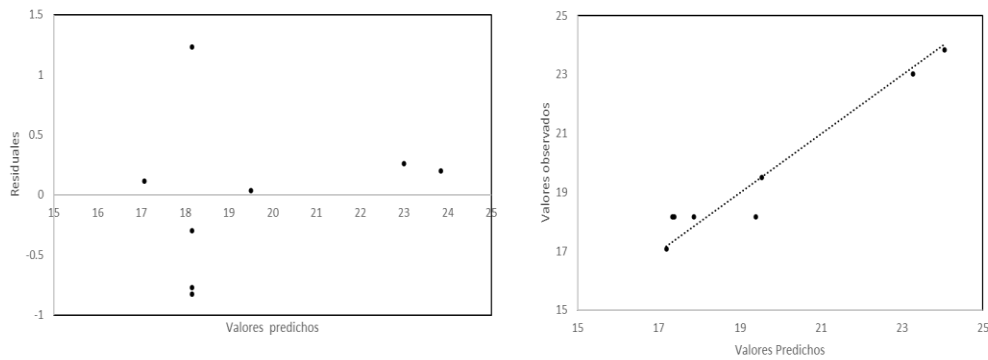
GL Grados de libertad, PE parámetro estimado, ES Error estándar, SE Significancia estadística, a significativo, b no significativo

En base a los resultados obtenidos se realizó un análisis de residuales (tabla 11) con el objetivo de validar el polinomio de respuesta obtenido y comprobar si el modelo es aplicable para la predicción del % DC con una mínima cantidad de experimentos.

**Tabla 11. Valores obtenidos de los valores predichos y residuales en el modelo de primer orden para la adsorción de naranja G por *A. niger*.**

Corrida	Color	Agitación	% DC	Predicho	Residuales
1	-1	-1	23.27	23.01	0.26
2	1	-1	17.19	17.07	0.12
3	-1	1	24.05	23.85	0.20
4	1	1	19.55	19.51	0.04
5	0	0	17.39	18.16	-0.77
6	0	0	19.39	18.16	1.23
7	0	0	17.33	18.16	-0.83
8	0	0	17.86	18.16	-0.30

La grafica de valores observados contra valores predichos (% de decoloración) y el de valores predichos contra residuales se muestran en las figuras 19.



**Figura 19. Análisis de residuos para el modelo de primer orden para la adsorción de naranja G por *Aspergillus niger*.**

Como se observa en la figura 16 los puntos residuales generalmente caen sobre la línea recta que indica el error de la distribución normal y valida que el polinomio de respuesta ajusta adecuadamente con los datos experimentales.

Se aplicó el método de ascenso más pronunciado el cual es un procedimiento para moverse secuencialmente sobre la trayectoria del ascenso más pronunciado, para optimizar, en la dirección del incremento máximo de la respuesta. El modelo ajustado de primer orden es ( $\hat{Y} = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i$ ) y la superficie de respuesta de primer orden, con los contornos de  $\hat{Y}$ , es una serie de líneas paralelas. La dirección del ascenso más pronunciado es aquella en la que  $\hat{Y}$  se incrementa con mayor rapidez. Por lo general se toma como la trayectoria del ascenso más pronunciado a la recta que pasa por el centro de la región de interés y que es normal a la superficie ajustada. Por lo que los incrementos sobre la trayectoria son proporcionales a los coeficientes de regresión  $\beta_i$  (Montgomery, 2003).

Una vez que se obtuvo el modelo lineal y se identificó que las dos variables son significativas para el modelo con una  $\alpha$  de 0.05, se indicó con los coeficientes de  $x_1$  y  $x_2$  que hay que desplazarse 2.57 unidades en dirección de  $x_1$  por cada 0.82 en dirección de  $x_2$ . Sabiendo que

la trayectoria pasa por el punto ( $x_1 = 0, x_2 = 0$ ) y tiene una pendiente de  $2.57/0.82$ . Por lo que:

$$\frac{\alpha}{\alpha} = \frac{2.57}{2.57} \text{ y } \frac{\beta}{\alpha} = \frac{0.82}{2.57} \quad (6)$$

Indicando que los incrementos serán respetando la relación 1 unidad de color ( $x_1$ ) por de 0.32 agitación ( $x_2$ ), con la cual se generó la matriz experimental de los incrementos para aplicar la trayectoria de ascenso más pronunciado para la adsorción de NG por *A. niger*. En la tabla 12 se muestran los valores codificados y los valores naturales.

**Tabla 12. Matriz experimental para la trayectoria de ascenso más pronunciado para la adsorción de naranja G por *A. niger*.**

$\Delta$	Valores codificados		Valores naturales	
	Color (mg/L)	Agitación (rpm)	Color (mg/L)	Agitación (rpm)
Origen - $7.5\Delta$	-7.5	2.4	237.5	90
Origen	0	0	125	120
Origen + $7\Delta$	7	2.24	20	148
Origen + $7.5\Delta$	7.5	2.4	12.5	150
Origen + $8\Delta$	8	2.56	5	152

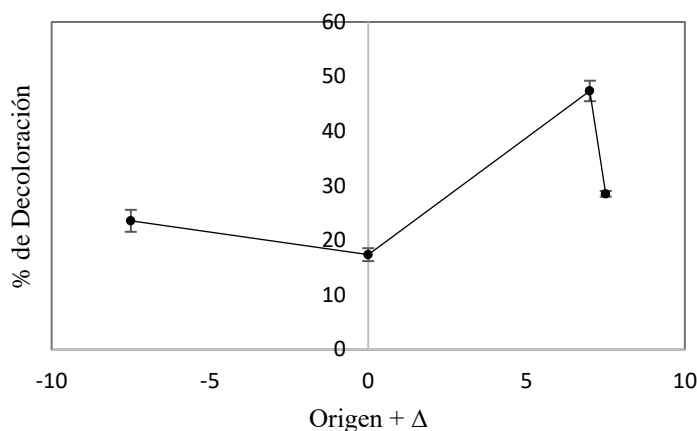
En la tabla 13 se muestran los valores experimentales obtenidos durante la trayectoria de ascenso más pronunciado para la adsorción de NG por *A. niger* cada corrida se llevó a cabo por duplicado.

**Tabla 13. Valores obtenidos para la trayectoria de ascenso más pronunciado para la adsorción de naranja G por *A. niger*.**

$\Delta$	Color (mg/L)	Agitación (rpm)	% Decoloración	qe (mg/g)
Origen - $7.5\Delta$	-7.5	2.4	23.59d	16.33b
Origen	0	0	17.39a	7.64c
Origen + $7\Delta$	7	2.24	47.37b	2.5d
Origen + $7.5\Delta$	7.5	2.4	28.53d	0.5d

Nota: letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas a un  $\alpha=0.05$ .

Se observan incrementos de la variable respuesta que el % de decoloración hasta el séptimo paso; sin embargo, el paso posterior a este punto resulta en un decremento de la variable respuesta (Figura 20).



**Figura 20. Incrementos en la metodología de ascenso más pronunciado para la adsorción de naranja G por *A. niger*.**

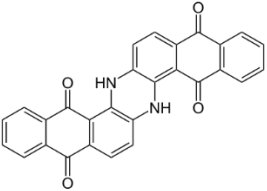
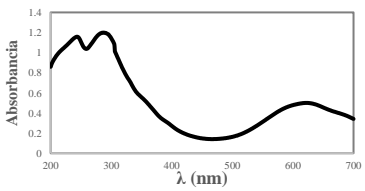
### **6.7 Optimización del proceso de sorción de azul a la cuba 4 por *A.niger*.**

Los colorantes que se les ha prestado mayor atención y más utilizados en el mundo, son del tipo azo ( $--N=N--$ , grupo funcional cromóforo) y los antraquinónicos (Barrios et al., 2015). Las antraquinonas son caracterizadas por su estructura atómica condensada que es altamente resistente a la biodegradación. Se utilizan de manera industrial para teñir fibras de algodón y celulosa, generando un riesgo a salud debido a sus productos secundarios como las aminas aromáticas que tienen un potencial carcinógeno probado y bien documentado (Pupo *et al.*, 2013) (Muz *et al.*, 2017). Se ha reportado que los colorantes son causantes de alergias, dermatitis, irritación en la piel y cáncer en humanos. La industria textil, alimenticia, de teñido, de impresión, de galvanoplastia, curtidora, cosmética y la de pintura son las

principales fuentes de contaminación del agua, debido al mal manejo de residuos y la liberación de efluentes al ambiente (Venkatesha, 2012) (Gusain *et al.*, 2016).

Los colorantes a la cuba representan aproximadamente el 15% del consumo total de la industria textil, se utilizan principalmente en el teñido de fibras de algodón, sedas y celulosas (Chaari *et al.*, 2009). Son insolubles en agua, pero son disueltos después de una reducción en condiciones alcalinas (Sirianuntapiboon *et al.*, 2006). Entre los colorantes actualmente disponibles, los colorantes a la cuba como el Azul a la cuba 4 también conocido como azul indantreno como se muestra en la tabla 14, fue el primer de los colorantes de indantreno preparado por R. Bonn (1901), éste produce coloraciones muy sólidas frente el lavado y a la acción de la luz del sol, pero no resiste a la acción del cloro; A pesar de su excelente calidad prácticamente no se han desarrollado nuevos colorantes a base de antraquinonas en los últimos 20 años (Chang *et al.*, 2009). La alta resistencia de estos grupos a los tratamientos microbianos y su alta estabilidad a la luz del sol, hacen necesario desarrollar métodos de tratamiento inmediatos para remover estos compuestos sin producir otros contaminantes que puedan causar daños ambientales.

**Tabla 14. Características de Azul a la cuba 4**

Nombre: Azul a la cuba 4		Peso Molecular : 442.43 g/mol
Formula química: C <sub>28</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> , Solubilidad en agua: <0.1g / 100 mL a 21°C		
<b>Estructura Molecular</b>		<b>Espectro de adsorción</b>
		



### Selección de variables

La relación entre las variables independientes y el porcentaje de decoloración fue determinada usando un método de modelo lineal generalizado (GLM) que es una generalización flexible de la regresión lineal ordinaria, con el objetivo de describir el efecto de las variables independientes y sus interacciones el proceso de biosorción del colorante en la biomasa fúngica. De igual manera se aplicó un método de regresión lineal múltiple (REG) para identificar las variables independientes que tiene efecto significativo en la variable respuesta y predecir el comportamiento de estas variables sobre el porcentaje de decoloración del colorante, con el paquete estadístico SAS versión 9.1, empleando los valores codificados.

Se aplicó un diseño factorial fraccionado  $2^{4-1} = 3$ . Las variables independientes fueron seleccionadas con base en lo reportado por Mustafa *et al.*,(2017); La tabla 15 muestra los niveles y valores propuestos para las variables: concentración de color, pH, agitación, tiempo de contacto, como variable respuesta se calculó el porcentaje de decoloración y se estimó la capacidad de adsorción ( $q_e$ ).

**Tabla 15. Variables independientes y sus niveles para la selección de variables significativas en la biosorción de azul a cuba 4 por *A.niger*.**

Variables	Niveles	
	-1	1
Color (mg/L)	50	100
pH	3	5
Agitación (rpm)	60	180
Tiempo (min)	30	90

La selección de variables consistió en un diseño factorial fraccionado con una matriz experimental de ocho corridas que se muestran en la tabla 16 donde se incluyen los valores

codificados, los valores predichos y la capacidad de adsorción ( $Q_e$ ), cada experimentación se realizó por triplicado.

**Tabla 16. Matriz del diseño factorial fraccionado  $2^{4-1=3}$  y resultados experimentales.**

Corrida No.	Color (mg/L)	pH	Agitación (rpm)	Tiempo(min)	Experimental DC (%)	Predichos DC (%)	Qe (mg/g)
1	50 (-1)	3 (-1)	60 (-1)	30 (-1)	15.65d ± 3.75	14.65	4.05f
2	100 (1)	3 (-1)	60 (-1)	90 (1)	36.97b ± 4.1	36.95	16.67bc
3	50 (-1)	5 (1)	60 (-1)	90 (1)	35.90bc ± 3.45	35.89	14.72c
4	100 (1)	5 (1)	60 (-1)	30 (-1)	36.91ab ± 2.38	37.55	27.02 <sup>a</sup>
5	50 (-1)	3 (-1)	180 (1)	90 (1)	30.37c ± 0.63	30.35	8.77e
6	100 (1)	3 (-1)	180 (1)	30 (-1)	43.07a ± 4.87	43.09	19.42b
7	50 (-1)	5 (1)	180 (1)	30 (-1)	20.74d ± 3.48	20.35	8.35d
8	100 (1)	5 (1)	180 (1)	90 (1)	34.17bc ± 3.12	34.45	24.80 <sup>a</sup>

Nota: letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas a un  $\alpha=0.05$ .

Se realizó el diseño  $2^{4-1=3}$  para la identificación de las variables independientes más significativas en el proceso de biosorción donde se obtuvo el valor más alto de DC, 43.07 % en la corrida 6 con las condiciones de 100 mg/L de colorante, pH 3, 180 rpm y 30 min de tiempo de contacto. La relación entre las 4 variables independientes y el porcentaje de decoloración pueden ser aproximados mediante el siguiente modelo polinomial de respuesta:

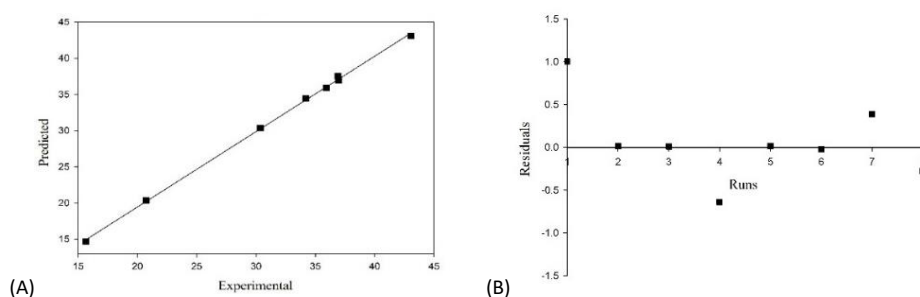
$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_i x_i + \varepsilon \quad (7)$$

Donde  $y$  es la variable respuesta DC (%);  $x_i$ 's son las variables independientes y  $\varepsilon$ , es el término residual que representa el error experimental. El parámetro  $\beta_0$  es la gran media que es una constante del modelo;  $\beta_i$  es un coeficiente lineal. Los datos obtenidos fuer son ajustados al modelo lineal general y por medio de una regresión lineal se obtuvieron los coeficientes. Bajo este análisis se obtuvo el polinomio de respuesta:

$$\%Dc = 31.66 + 6.35 x_1 + 0.4x_2 + 0.4x_3 + 2.75x_4 - 2.41x_1x_2 + 0.36 x_1x_3 - 5.06x_1x_4 + \varepsilon \quad (8)$$

Donde  $x_1$  es la concentración de colorante,  $x_2$  es pH,  $x_3$  es la agitación y  $x_4$  es el tiempo de contacto.

Como se observa en la figura 21 los puntos residuales estimados con el polinomio de respuesta generalmente caen sobre la línea recta que indica el error de la distribución normal y validando que el polinomio de respuesta ajusta adecuadamente con los datos experimentales.



**Figura 21. Análisis de residuales diseño factorial fraccionado  $2^{4-1=3}$ . (A) Experimentales vs predichos; (B) Corridas vs residuales.**

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y la estimación de parámetros (Tabla 17) para justificar la significación y adecuación de la regresión desarrollada, donde se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.91 y un coeficiente de variación de 10.74.

**Tabla 17. Estimación de parámetros del diseño experimental factorial fraccionado  $2^{4-1=3}$**

	GL	PE	ES	Valor - t	Pr >  t	SE
<b>Intercepción</b>	1	31.665	0.694	45.63	<b>&lt;0.0001</b>	a
$x_1$	1	6.346	0.694	9.14	<b>&lt;0.0001</b>	a
$x_2$	1	0.399	0.694	0.58	0.5729	b
$x_3$	1	0.397	0.694	0.57	0.5751	b
$x_4$	1	2.758	0.694	3.98	<b>&lt;0.0011</b>	a
$x_1x_2$	1	-2.407	0.694	-3.47	<b>0.0032</b>	a
$x_1x_3$	1	0.357	0.694	0.52	0.6135	b
$x_1x_4$	1	-5.057	0.694	-7.29	<b>&lt;0.0001</b>	a

GL Grades de libertad, PE Parametric estimate, ES Error standard, SE Significance statistical, a signification, b no signification

El análisis de varianza del diseño factorial fraccionado determino que las variables independientes que son estadísticamente significativas en la biosorción de azul a la cuba 4

por *A. niger*, cuando  $P < 0.05$  (varianza de 95%) fueron la concentración de colorante,  $x_1$ , y el tiempo de contacto,  $x_4$ , así como las interacciones de colorante/pH y colorante/Tiempo de contacto.

Aun que se ha vinculado la decoloración de colorantes con la agitación debido a que se incrementa la transferencia de masa y oxígeno entre las células y el medio (Ali et al., 2008). La variable independiente agitación en este estudio no fue significativa según el análisis de varianza, ya ha sido reportado que en la biorremediación de rojo azo con *A. niger*, la agitación no es un parámetro significativo (Mahmoud et al., 2017).

#### ***Obtención de modelo de primer orden para la optimización de variables***

Un diseño factorial completo se requieren al menos tres niveles por variable para poder estimar coeficientes de términos cuadráticos en el modelo de respuesta por lo que el empleo de este tipo de diseños es útil si ya se conoce si ciertas variables independientes no muestran interacción y significancia en la variable respuesta (Aslan, 2008). Por lo anterior y basándose en los resultados del análisis de varianza y la estimación de parámetros de la selección de variables (sección 6.6.1.1), las variables independientes concentración de color y tiempo son estadísticamente significativas en el proceso de biosorción, la optimización de estas variables fue empleando un diseño factorial completo, donde generalmente se describe la aproximación de la superficie real en una región pequeña de las  $x_1$  (Montgomery, 2014), el cual consistió en un diseño factorial  $2^2$  con 5 puntos centrales, empleando como puntos centrales 100 mg/L y 90 min respectivamente, se muestran en la tabla 18 donde se incluyen los valores codificados, los valores predichos y la capacidad de adsorción ( $Q_e$ ). Los valores

de  $x_2$  y  $x_3$  se mantuvieron constantes según el modelo obtenido en la selección de variables por lo que el pH se mantuvo en su valor alto de 5 y la agitación en su valor alto de 180 rpm.

**Tabla 18. Matriz para la obtención del modelo de primer orden y resultados experimentales.**

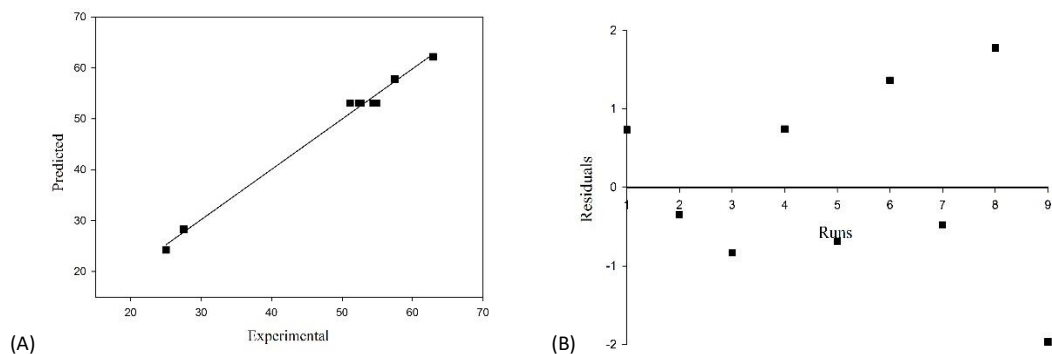
Corrida No.	Color (mg/L)	Tiempo (min)	Experimental DC (%)	Predichos DC (%)	Qe (mg/g)
1	50 (-1)	30 (-1)	25d ± 2.42	24.27	9.23d
2	150 (1)	30 (-1)	57.5b ± 2.42	57.85	55.42b
3	50 (-1)	150 (1)	27.52d ± 3.04	28.35	10.15d
4	150(1)	150 (1)	62.91a ± 1	62.17	60.64a
5	100 (0)	90 (0)	52.4c ± 3.04	53.09	33.65c
6	100 (0)	90 (0)	54.45c ± 3.04	53.09	34.36c
7	100 (0)	90 (0)	52.61c ± 3.04	53.09	33.89c
8	100 (0)	90 (0)	54.86c ± 3.04	53.09	34.86c
9	100 (0)	90 (0)	51.12c ± 3.04	53.09	32.48c

Nota: letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas a un  $\alpha=0.05$ .

Se obtuvo el mayor porcentaje de DC en la corrida con los valores altos de las dos variables independientes alcanzando un 62 % y una Qe de 60.64 mg/g. Los datos obtenidos fueron ajustados al modelo lineal general y por medio de una regresión lineal se obtuvieron los coeficientes. Donde  $x_1$  es la concentración de color y  $x_2$  es el tiempo de contacto. Bajo este análisis se obtuvo el polinomio de respuesta:

$$\%Dc = 53.08 + 16.85 x_1 + 2.11 x_2 + 0.59 x_1 x_2 - 9.73 x_1^2 + \varepsilon \quad (9)$$

En base a los resultados obtenidos se realizó un análisis de residuales con el objetivo de validar el polinomio de respuesta obtenido y comprobar si el modelo es aplicable para la predicción de DC con una mínima cantidad de experimentos. Como se observa en la figura 22 los puntos residuales estimados con el polinomio de respuesta generalmente caen sobre la línea recta que indica el error de la distribución normal y valida que el polinomio de respuesta ajusta adecuadamente con los datos experimentales (Sahan y Ozturk,2014).



**Figura 22. Análisis de residuales diseño de primer orden. (A) Experimentales vs predichos; (B) Corridas vs residuales.**

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y la estimación de parámetros (Tabla 19) para justificar la significación y adecuación de la regresión desarrollada, donde se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.9865 y un coeficiente de variación de 4.47:

**Tabla 19. Estimación de parámetros del diseño de primer orden**

	GL	PE	ES	Valor - t	Pr >  t	SE
Intercepción	1	53.088	0.942	56.32	<0.0001	A
$x_1$	1	16.848	0.745	22.61	<0.0001	A
$x_2$	1	2.108	0.745	2.83	0.0222	A
$x_1x_2$	1	0.598	0.745	0.80	0.4450	B
$x_1^2$	1	-9.729	1.201	-8.1	<0.0001	A

GL Grades de libertad, PE Parametric estimate, ES Error standard, SE Significance statistical, a signification, b no signification

El análisis de varianza del modelo de primer orden determino que las dos variables independientes son estadísticamente significativas en la biosorción de azul a la cuba 4 por *A. niger*, cuando  $P < 0.05$  (varianza de 95%), el cual es necesario para poder aplicar una metodología de optimización de variables.

**Metodología de ascenso más pronunciado**

Se aplicó el método de ascenso más pronunciado el cual es un procedimiento para moverse secuencialmente sobre la trayectoria del ascenso más pronunciado, es decir, en la dirección del incremento máximo de la respuesta.

Una vez que se obtuvo el modelo lineal y se identificó que las dos variables (concentración de color y tiempo) son significativas para el polinomio de respuesta obtenido de la metodología de primer orden (6) con una  $\alpha$  de 0.05 nos indicó con los coeficientes de  $x_1$  (16.85) y  $x_2$  (2.108) habían que desplazarse 16.85 unidades en dirección de  $x_1$  por cada 2.108 en dirección de  $x_2$ , para alejarse del centro del diseño, el punto ( $x_1 = 0$ ,  $x_2 = 0$ ) a lo largo de la trayectoria de máximo ascenso y teniendo una pendiente de  $2.11/16.85$ . Por lo que:

$$\frac{\alpha}{\alpha} = \frac{16.85}{16.85} = 1 \text{ y } \frac{\beta}{\alpha} = \frac{2.11}{16.85} = 0.125 \quad (10)$$

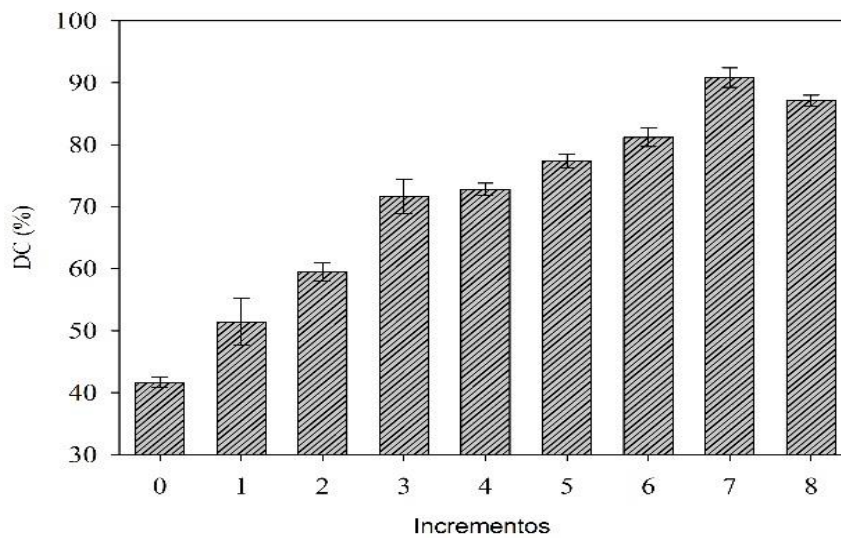
Durante todos los diseños experimentales se utilizó un incremento básico de concentración de color ( $x_1$ ) de 50 mg/L y de tiempo ( $x_2$ ) de 60 min. Usando la relación entre  $\beta_i$  y  $x_i$  se observa que la concentración de color de 50 mg/L es equivalente a un incremento en la variable codificada  $x_1$  de  $\Delta x_1 = 1$ . Por lo que los incrementos a lo largo de la trayectoria de ascenso fueron  $\Delta x_1 = 1$  y  $\Delta x_2 = 0.125 \Delta x_2 = 7.5$  min con los cuales se generó la matriz experimental de los incrementos para aplicar la trayectoria de ascenso más pronunciado en el proceso de biosorción del colorante. Los resultados aparecen en la tabla 20, donde se muestran los incrementos en variables codificadas y naturales.

**Tabla 20. Diseño y resultados experimentales de la trayectoria de ascenso más pronunciado.**

Incrementos	Variables codificadas		Variables naturales		Respuesta
	Color (mg/L)	Tiempo (min)	Color (mg/L)	Tiempo (min)	DC (%)
0	0	0	100	90	$41.65 \pm 0.82$

$\Delta$	1	0.125	50	7.5	-
1	1	0.125	150	97.5	51.42 $\pm$ 3.80
2	2	0.25	200	105	59.45 $\pm$ 1.48
3	3	0.375	250	112.5	71.62 $\pm$ 1.74
4	4	0.5	300	120	72.81 $\pm$ 0.96
5	5	0.625	350	127.5	77.34 $\pm$ 1.11
6	6	0.75	400	135	81.19 $\pm$ 1.48
7	7	0.875	450	142.5	90.85 $\pm$ 0.58
8	8	1	500	150	87.11 $\pm$ 0.88

En la figura 23 se grafica el rendimiento para cada incremento en la trayectoria de máxima pendiente de ascenso. Se observó un aumento en la variable respuesta DC hasta el séptimo incremento; sin embargo, en el octavo se produce un decremento en el rendimiento.



**Figura 23. Incrementos en la metodología de ascenso más pronunciado para la biosorción de azul a la cuba 4 por *A. niger*. Optimización de variables utilizando el diseño compuesto central (DCC)**

El DCC es una útil alternativa eficaz a los diseños factoriales, fue desarrollado originalmente por Box y Wilson y mejorado por Box y Hunter, este tipo de diseño genera tanta información como un diseño factorial de tres niveles y requiere menos pruebas que un diseño factorial



completo (Aslan, 2008), por lo que la optimización de variables del proceso de biosorción de azul a la cuba 4 por *A. niger* fue mediante la aplicación de un diseño de superficie de respuesta tal como el DCC en cual consistió en una matriz experimental de 12 corridas, conteniendo cuatro puntos centrales (Tabla 21).

Recordando que los factores fueron seleccionados con base al diseño factorial fraccionado donde la concentración de color y el tiempo de contacto fueron estadísticamente significativas, y mejoradas con la metodología de ascenso más pronunciado donde se alcanzó en la variable respuesta un 90% (DC). Se aplicó el DCC con el fin de caracterizar la superficie de respuesta, que se entiende como determinar si el punto máximo encontrado en la metodología de ascenso más pronunciado es el punto estacionario de respuesta máxima o mínima o punto silla, y la sensibilidad relativa de la respuesta a las variables  $x_1$  y  $x_2$  (Montgomery, 2014).

**Tabla 21. Diseño experimental y resultados del diseño compuesto central**

Corrida No.	Variables naturales		Respuesta	Predichos	Residuales
	Color (mg/L)	Tiempo (min)	DC (%)		
1	400 (-1)	136 (-1)	87.24 ± 0.3	86.81	0.425
2	400 (-1)	150 (1)	85.98 ± 0.79	85.55	0.427
3	500 (1)	136 (-1)	90.74 ± 0.5	90.31	0.434
4	500 (1)	150 (1)	92.47 ± 0.59	92.05	0.416
5	450 (0)	143 (0)	91.267 ± 1.49	89.77	1.499
6	450 (0)	143 (0)	88.99 ± 0.39	89.77	-0.785
7	450 (0)	143 (0)	89.5 ± 0.23	89.77	-0.269
8	450 (0)	143 (0)	89.32 ± 0.07	89.77	-0.445
9	520.7 ( $\alpha$ )	143 (0)	94.06 ± 0.43	94.48	-0.425
10	379.3 ( $-\alpha$ )	143 (0)	89.39 ± 0.48	89.82	-0.426
11	450 (0)	153 ( $\alpha$ )	89.85 ± 0.14	90.27	-0.427
12	450 (0)	133 ( $-\alpha$ )	79.72 ± 0.33	80.15	-0.428

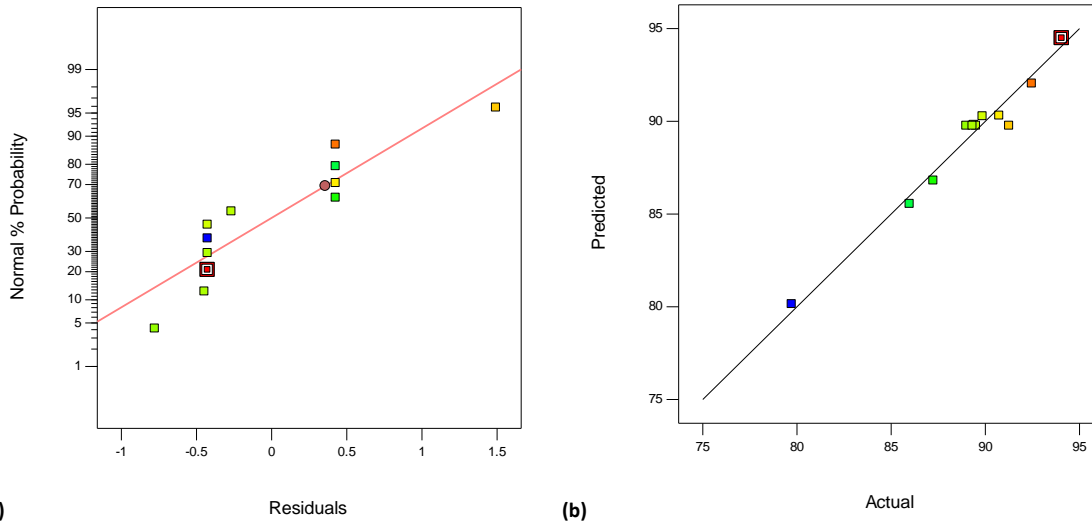
El valor de  $\alpha$ , que le dará al polinomio de respuesta la propiedad de rotabilidad, depende del número de puntos de la porción factorial del diseño lo que significa cuantos factores y la porción factorial están involucrados en el diseño. Por lo que:

$$\alpha = (nf)^{\frac{1}{4}} = (4)^{\frac{1}{4}} = 1.414 \quad (10)$$

Por tanto, en el modelo obtenido el valor de  $\alpha$  para lograr la invariabilidad ante el giro es 1.414, permitiendo la rotabilidad del diseño por puntos axiales, asegurando que la varianza de la predicción del modelo es constante en todos los puntos equidistantes del centro del diseño (Aslan, 2008). Por medio de una regresión lineal múltiple de los datos experimentales se obtuvieron los coeficientes. Donde  $x_1$  es la concentración de color y  $x_2$  es el tiempo de contacto. Bajo este análisis se obtuvo el modelo de respuesta:

$$\%Dc = 89.77 + 1.65 x_1 + 3.58 x_2 + 0.75 x_1 x_2 + 1.19 x_1^2 - 2.28 x_2^2 - 3.46 x_1^2 x_2 + 0.85 x_1 x_2^2 + \varepsilon \quad (11)$$

El cual fue de un orden cuadrático incluyendo interacciones de  $x_1$  y  $x_2$  confiriéndole un mejor ajuste a los datos experimentales. En base a los resultados obtenidos se realizó un análisis de residuales con el objetivo de validar el polinomio de respuesta obtenido y comprobar si el modelo es aplicable para la predicción de DC. Si bien el modelo ajustado tiene un coeficiente correlación de 0.97 es necesario analizar su gráfico de probabilidad normal para residuos, el cual tiene un comportamiento lineal en su probabilidad (figura 24a) indicando que el error de la distribución normal y válida que el polinomio de respuesta ajusta adecuadamente con los datos experimentales (Sahan y Ozturk, 2014). En la figura 24 se observa una tendencia de linealidad a lo largo del comportamiento de los valores predichos y los valores experimentales, ratificando el no sesgo en la medición, que significa que no hay indicación de una correlación apropiada en los residuales con un nivel de significancia de 5%.



**Figura 24. Análisis de residuales DCC.** (a) Probabilidad normal de los residuos (b) Predichos vs experimentales.

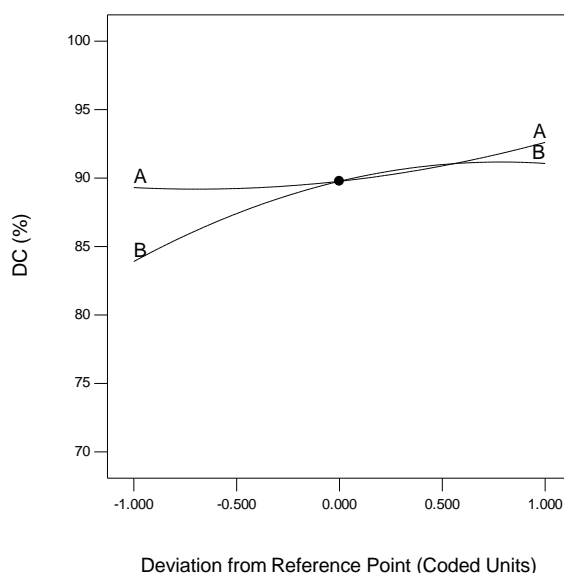
Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y la estimación de parámetros (Tabla 22) para justificar la significación y adecuación de la regresión desarrollada, donde se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.9686 y un coeficiente de variación de 1.2 , donde ambas variables tal como concentración de color, tiempo de contacto y sus interacciones fueron estadísticamente significativas.

**Tabla 22. Estimación de parámetros del diseño compuesto central**

	SS	DF	MS	Value - F	Pr > F	SE
<b>Model</b>	140.76	7	20.11	17.65	0.0073	A
$x_1$	10.90	1	10.90	9.57	0.0364	A
$x_2$	51.31	1	51.31	45.03	0.0026	A
$x_1x_2$	2.24	1	2.24	1.96	0.2339	B
$x_1^2$	9.09	1	9.09	7.98	0.0476	A
$x_2^2$	33.22	1	33.22	29.15	0.0057	A
$x_1^2x_2$	24	1	24	21.06	0.0101	A
$x_1x_2^2$	1.43	1	1.43	1.26	0.3249	B
<b>Residual</b>	4.56	4	1.14			
<b>Lack of fit</b>	1.45	1	1.45	1.40	0.3212	B
<b>Pure Error</b>	3.1	3	1.03			
<b>Cor. Total</b>	145.32	11				

SS Sum of squares, DF Degrees of freedom, MS Mean squares, SE Significance statistical, a signification, b no signification

En el diagrama de perturbaciones obtenido (figura 24) se muestra el efecto de los parámetros sobre la biosorción de azul a la cuba 4 por *A. niger* se muestran al mismo tiempo. Este diagrama representa una vista general del efecto de los parámetros en el resultado (Najib et al., 2017) en el cual la pendiente de la línea B (tiempo de contacto) muestra que este parámetro no fue tan eficaz como la línea A (concentración de color) en la variable respuesta DC.

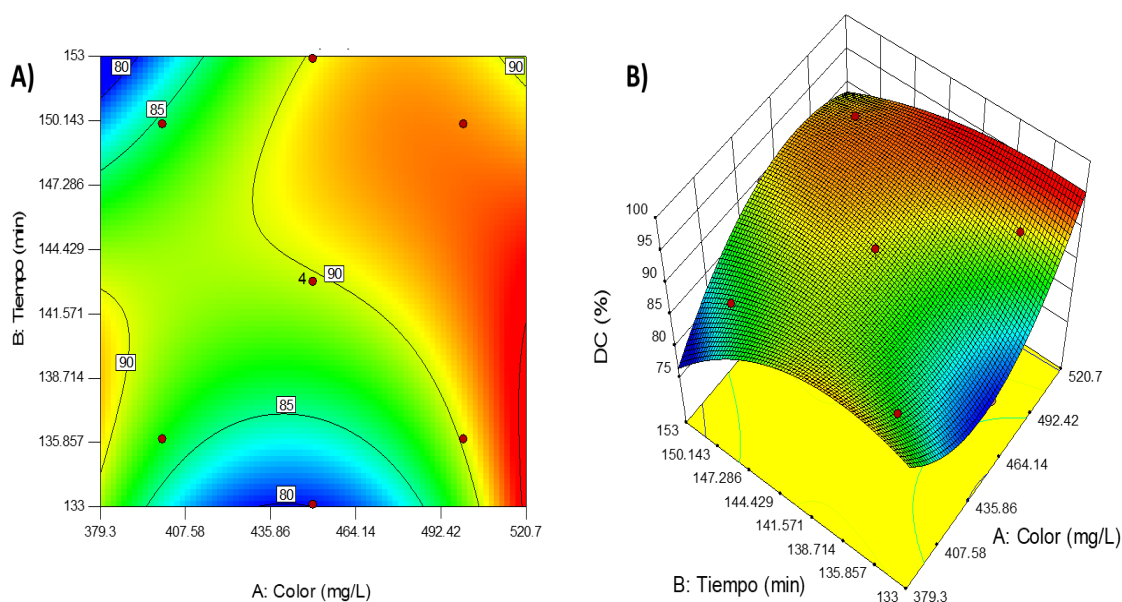


**Figura 24. Diagramas de parámetros significativos de DC en función de valores codificados.**

La variable con más significancia de la biosorción de azul a la cuba 4 por *A. niger* es la concentración de colorante, donde a mayor concentración de colorante mejor porcentaje de decoloración. En la figura 25 a y b se puede visualizar el contorno y la superficie de la variable respuesta (DC) para la concentración de color (mg/L) contra el tiempo de contacto (min) , alcanzando porcentajes de decoloración muy altos, mayores al 90 % aproximadamente con valores altos de colorante (arriba de 450 mg/L) y valores bajos de tiempo de contacto. Sin embargo, valores altos de tiempo de contacto no aumentan el

porcentaje de decoloración, debido a que la concentración del colorante tiene un efecto más significativo.

La biosorción de azul a la cuba 4 por *A. niger* se ajusta a la ecuación 9, la cual es válida para un intervalo de concentración de colorante de 379.3 a 520.7 mg/L y un tiempo de contacto de 133 a 153 min a un pH de 5, 180 rpm y a temperatura ambiente (28° C). El punto de estacionario o valor óptimo para la variable respuesta (DC) fue de 94% con una concentración de color de 520.78 mg/l y 143 min de tiempo de contacto.



**Figura 25. Remoción de azul a la cuba 4 mediante biomasa activa de *A.niger*.** (a) Grafica de contorno de la decoloración de azul a la cuba. (b) Superficie de respuesta de la decoloración de azul a la cuba , en función del tiempo y el colorante.

Los colorantes normalmente son removidos por medio del rompimiento de enlaces electrónicos del grupo cromoforo o auxocromico. Varios tratamientos físicos o químicos han sido utilizados para la remoción de colorantes en aguas residuales pero no han sido utilizados en la industria textil debido a sus altos costos de operación y al manejo de sus residuos (Mahmoud *et al.*, 2017). Los mecanismos de biosorción de colorantes en biomateriales,

como la biomasa fúngica, dependen en gran medida de la estructura química y de los grupos funcionales del tipo de colorante, así como de los grupos funcionales en la pared celular debido al efecto en la biosorción, la cual pueden ser una adsorción física o química o ambas (Fu *et al.*, 2002)(Srinivasan *et al.*,2010). Hay poca información disponible sobre las interacciones entre la biomasa microbiana y los colorantes que puedan explicar los mecanismos de adsorción como la adsorción superficial, el intercambio iónico, complejación (coordinación), complejación-quelación y micro-precipitación.

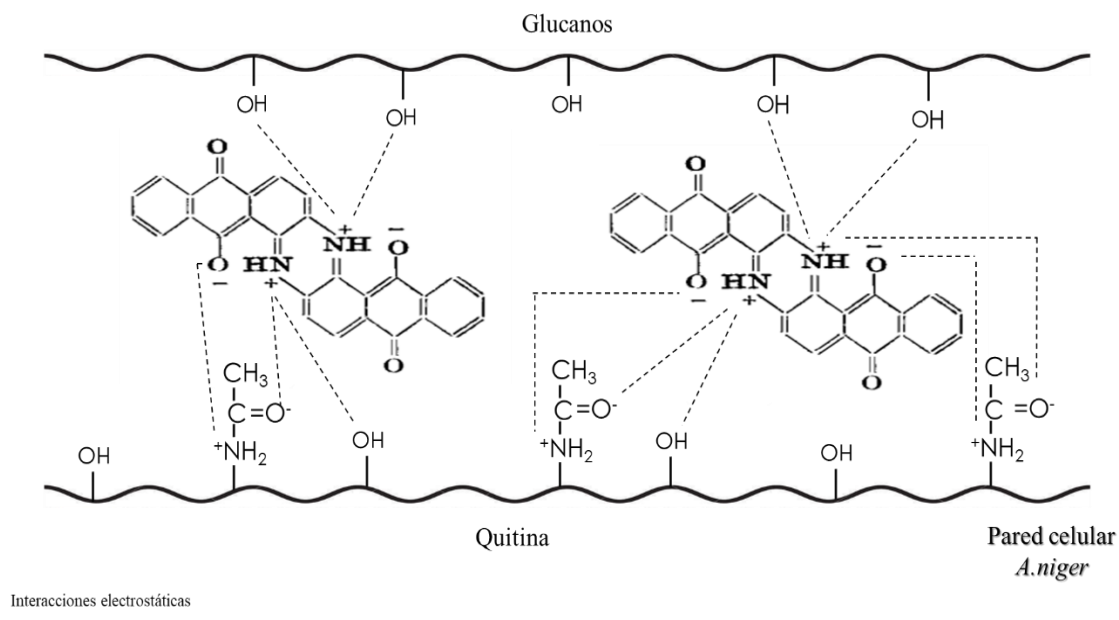
La pared celular de *A. niger* consiste principalmente de quitina, polisacáridos, grupos carboxilo, lípidos y aminoácidos; Grupos funcionales que por medio de una atracción electrostática entre la carga negativa del colorante y la carga positiva de la pared se genera la biosorción de los colorantes (Ali *et al.*, 2008). Fu y Viraraghavan (2002), confirmaron que los grupos amino y carboxilo son los principales sitios de unión, mientras que los grupos fosfatos y las fracciones lipídicas no son los principales sitios de unión. Se ha reportado que en el proceso de biosorción con *A. niger* la adsorción de los colorantes puede ser dentro y sobre las hifas (Mahmoud *et al.*, 2017)(Ali *et al.*, 2008)( Fu, y Viraraghavan, 2001).

Johnston en 1965 realizó un amplio estudio acerca de la composición de la pared celular de *A. niger* donde se detectaron ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, alanina, serina, treonina, leucina, isoleucina, valina, tirosina, fenilalanina, prolina, cisteína, arginina, lisina e histidina; Los principales azúcares encontrados fueron D-glucosa, D-arabinosa, D- manosa, D-glucosamina, D- galactosamina, galactosa y los grupos acetilo constituyen el 3.4% de la pared celular; Obtuvo evidencia de que conforme las células de *A. niger* tiene una mayor edad fisiológica el porcentaje de manosa y galactosa disminuyen, caso contrario de la glucosa el cual aumenta hasta por arriba de 90% de la porción de carbohidratos en pared celular , la

---

M en C. Lira Pérez Juana (2021), Cinvestav

cual podría estar relacionada con los sitios de adsorción de colorantes debido a los grupo carboxilo (Mahmoud *et al.*, 2017)(Ali *et al.*, 2008) (Fu, y Viraraghavan, 2001), en esta investigación las células de *A. niger* tienen una edad fisiológica de 80 horas aproximadamente lo cual no podría indicar que los grupos funcionales a esta edad fisiológica tiene un papel importante en el proceso de biosorción de colorantes como se muestra en la figura 26 donde se propone el mecanismo de sorción del colorante a la pared celular por medio de un proceso de fisorción en la cual están involucradas la cargas de positivas de los componentes de la quitina que interactúan y presentan una posible atracción por las cargas negativas que se encuentran en la estructura del azul a la cuba, de igual manera sucede con las cargas negativas del pared celular de *A. niger*, interacciones que posiblemente están promoviendo el proceso de biosorción a la pared celular aumentando la decoloración del azul a la cuba en la fase líquida.



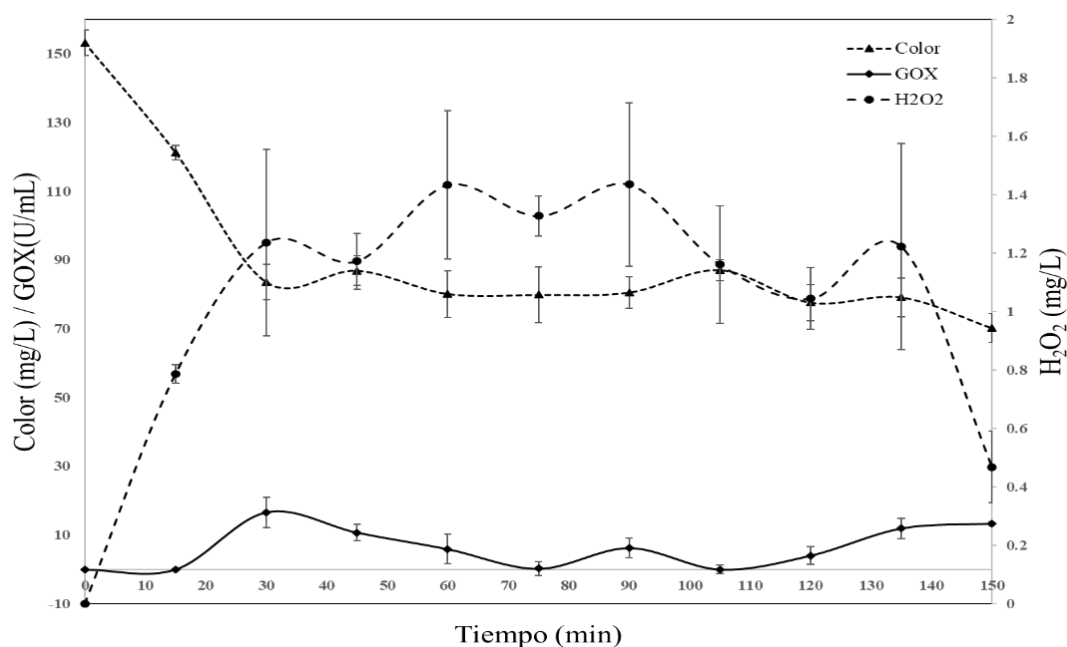
**Figura 26. Mecanismo propuesto de biosorción de azul a la cuba por *A. niger* por fisorción.**

Durante el proceso de oxidación de glucosa es generado  $H_2O_2$  el cual ha sido relacionado con la decoloración de diversos colorantes (Voncina, 2003); Como ha reportado Bankar en el 2009 , El  $H_2O_2$  producido ha sido probado para el blanqueo de fibras de algodón encontrando que el proceso es comparable con los procesos estándares, evitando la utilización de estabilizadores debido a que el ácido glucónico producido actúa como un estabilizador en este proceso. De igual manera se ha empleado la GOX simultáneamente con peroxidasa donde el  $H_2O_2$  recién formado por la GOX es utilizado inmediatamente e in situ por las peroxidasa, generando compuestos oxidantes de color durante los procesos de baños de teñido (Opwis *et al.*, 2008 ). Estas enzimas son utilizadas actualmente en los procesos de decoloración y blanqueo de fibras naturales en industrias textiles.

Durante el proceso de decoloración de azul a la cuba se planteó hacer la medición de la actividad enzimática de la GOX y la generación de peróxido de hidrógeno para poder correlacionar la decoloración con la presencia de peróxido en el sistema. Se llevó a cabo un perfil de decoloración con las condiciones obtenida en el modelo de primer orden del análisis estadístico las cuales fueron 150 mg / l de colorante,  $28\text{ }^\circ\text{C} \pm 1$ , 180 rpm, durante 150 min. En la cual se muestreo cada 15 min, la actividad de GOX se evaluó midiendo la producción de peróxido de hidrógeno a partir de glucosa colocada como sustrato en el ensayo. Para ello se utilizó la modalidad de acoplamiento con peroxidasa de rábano, usando ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazoline-6-sulfónico)(ABTS) como sustrato. Las lecturas de absorbancia se realizaron a 420 nm, cada unidad se definió como la cantidad de  $1\text{ }\mu\text{ mol}$  de peróxido de hidrógeno generado por minuto en condiciones estándar en el ensayo. Para la medición de peróxido de hidrogeno se empleó el método Yoduro-Yodato (Klassen *et al.*, 1994).



En la figura 27 se muestra el perfil de actividad enzimática y la generación de peróxido de hidrógeno durante la decoloración de azul a la cuba en las condiciones del modelo de primer orden. En donde se observa una alta generación de  $H_2O_2$  durante los primeros 30 minutos que coincide con la decoloración de azul a la cuba. Posteriormente a este tiempo la generación de  $H_2O_2$  es estable hasta los 140 min; la actividad de la GOX durante la decoloración fue detectada durante todo el proceso de decoloración alcanzado un máximo de actividad de 1.19U/mL en los primeros 30 min.



**Figura 27. Actividad de GOX y generación de  $H_2O_2$  durante la decoloración de azul a la cuba por biomasa activa de *A. niger*.**

Una vez comprobada la presencia de la actividad de la GOX y la generación de  $H_2O_2$  se aplicó un método estadístico para determinar la correlación de Pearson que es un índice que mide el grado de covariación entre distintas variables relacionadas linealmente. Donde el valor oscila de 0 y 1, el cual puede ser expresado en unidades de porcentaje. Este índice se

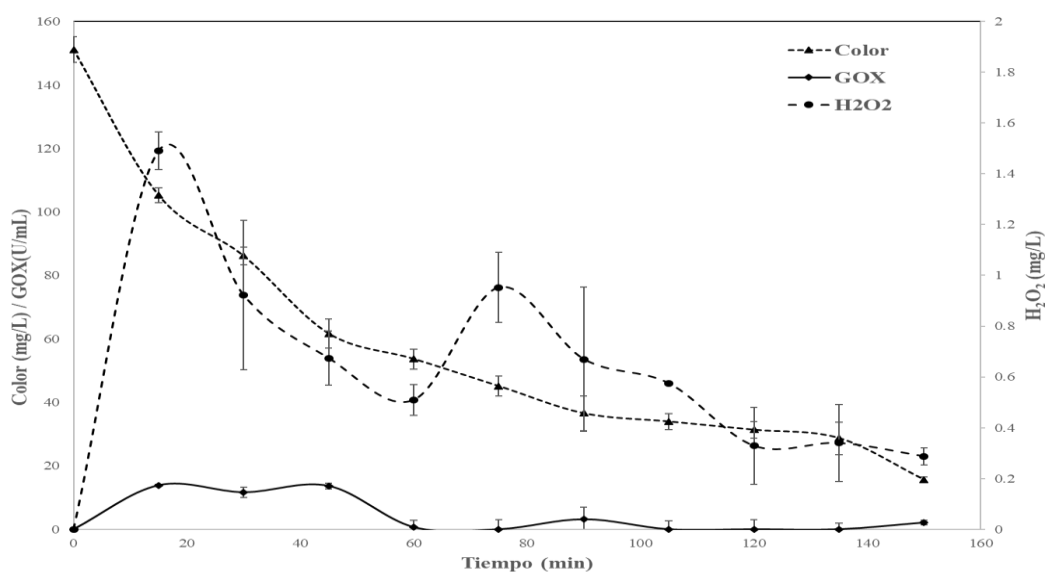
aplica cuando se tiene dos variables X e Y, y definimos el coeficiente de correlación de Pearson entre estas dos variables como  $r_{xy}$  entonces:

$$0 \leq r_{xy} \leq 1 \quad (12)$$

Esta relación entre las dos variables puede ser perfectamente positiva o perfectamente negativa. Decimos que la correlación entre dos variables X e Y es perfecta positiva cuando exactamente en la medida que aumenta una de ellas aumenta la otra. Esto sucede cuando la relación entre ambas variables es funcionalmente exacta. Y se dice que la relación es perfecta negativa cuando exactamente en la medida que aumenta una variable disminuye la otra.

Se generaron las correlaciones de Pearson para la figura 9 en donde a los 90 minutos se correlaciona positivamente en un 80%, la decoloración con la presencia de  $H_2O_2$  y un 29% con la actividad de la GOX con una  $\alpha$  de 0.0014. Una vez generada esta serie de datos nos indicó que posiblemente hay una contribución del  $H_2O_2$  y de la GOX durante la decoloración del azul a la cuba por lo que en la figura 10 se muestra la actividad de la GOX y el  $H_2O_2$  durante el proceso de decoloración, utilizando un inhibidor metabólico como es la azida de sodio ( $NaN_3$ ) a una concentración de 5 mM, en contacto con la biomasa durante 60 min (Kalpana *et al.* 2008), la  $NaN_3$  es un inhibidor de la Cadena de Transporte de Electrones (CTE), es una sustancia que se enlazan a alguno de los componentes de la CTE bloqueando su capacidad para cambiar de forma reversible, desde la forma oxidada a la forma reducida y viceversa. Esta inhibición genera una acumulación de los componentes reducidos, y disminuyen la presencia de las formas oxidadas; Provocando que no se liberé energía y la síntesis de ATP se detenga.

En la figura 28 se observa el decaimiento prolongado del azul a la cuba durante los 150 min alcanzando hasta un 90% de decoloración, así como la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1.49 ±0.07 mg/L) a los 15 min, que coincide con la actividad enzimática de los primeros minutos del proceso, la producción del peróxido de hidrógeno no fue de manera constante, si no que fue disminuyendo, por lo que la presencia del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, está posiblemente relacionada con la decoloración del colorante.



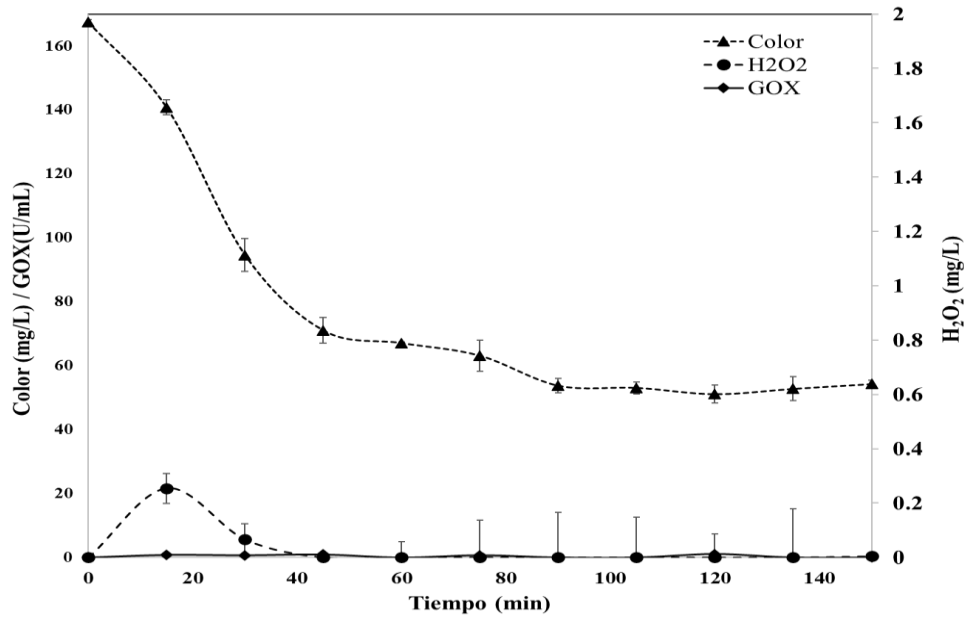
**Figura 28. Actividad de GOX y generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante la decoloración de azul a la cuba por biomasa de *A. niger* inactiva por NaN<sub>3</sub>.**

Se generaron las correlaciones de Pearson, en la figura 28 se muestra que a los 150 minutos se correlaciona negativamente en un 80%, la decoloración con la actividad de la GOX con una  $\alpha$  de 0.0001.

Al emplear el inhibidor metabólico, la azida de sodio se alcanzaron porcentajes de decoloración más altos a los obtenidos con la biomasa activa, esto posiblemente debido al efecto que tiene el inhibidor en la biomasa de *A. niger*, provocando un estrés metabólico, que posiblemente esté causando un impulso sobre la generación de  $H_2O_2$ , observado durante los primeros minutos del tratamiento, posteriormente generando una mínima actividad metabólica, reflejada en la disminución del  $H_2O_2$  y de la baja actividad enzimática. Así como también se hipotetiza que el azida de sodio provoca una modificación en las cargas electrostáticas de la pared celular de *A. niger* generando una mayor interacción del colorante con las cargas de esta, provocando mayores porcentajes de decoloración

Para confirmar la contribución del  $H_2O_2$  en la de coloración de azul a la cuba se procedió a inactivar la actividad metabólica de *A. niger* empleando dos procesos de calentamiento a  $90^\circ C$  durante 15 min cada uno, una vez inactiva la biomasa se emplearon las condiciones del modelo de primer orden para determinar la contribución del peróxido de hidrogeno y el proceso de sorción sobre la biomasa.

En la figura 29 se observa la actividad de la GOX y la generación de peróxido durante empleando biomasa inactivada por calor, en donde se observa una del 65 % de decoloración, el cual es mayor al generado por la biomasa activa. adjudicado al proceso de sorción del colorante a la biomasa fúngica y es posible conocer el porcentaje de la contribución del  $H_2O_2$  comparando con los resultados obtenidos con la biomas activa.



**Figura 29. Actividad de GOX y generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante la decoloración de azul a la cuba por biomasa de *A. niger* inactiva por calor.**

Con fin de conocer de mejor el proceso de sorción del colorante azul a la cuba en la biomasa de *A. niger*, se prepararon las muestras para ser analizadas en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del área biológica de los Laboratorios Nacionales de Servicios Experimentales (LaNSE), para obtener las micrografías de las muestras de los tratamientos aplicados a la biomasa y que causan la decoloración.

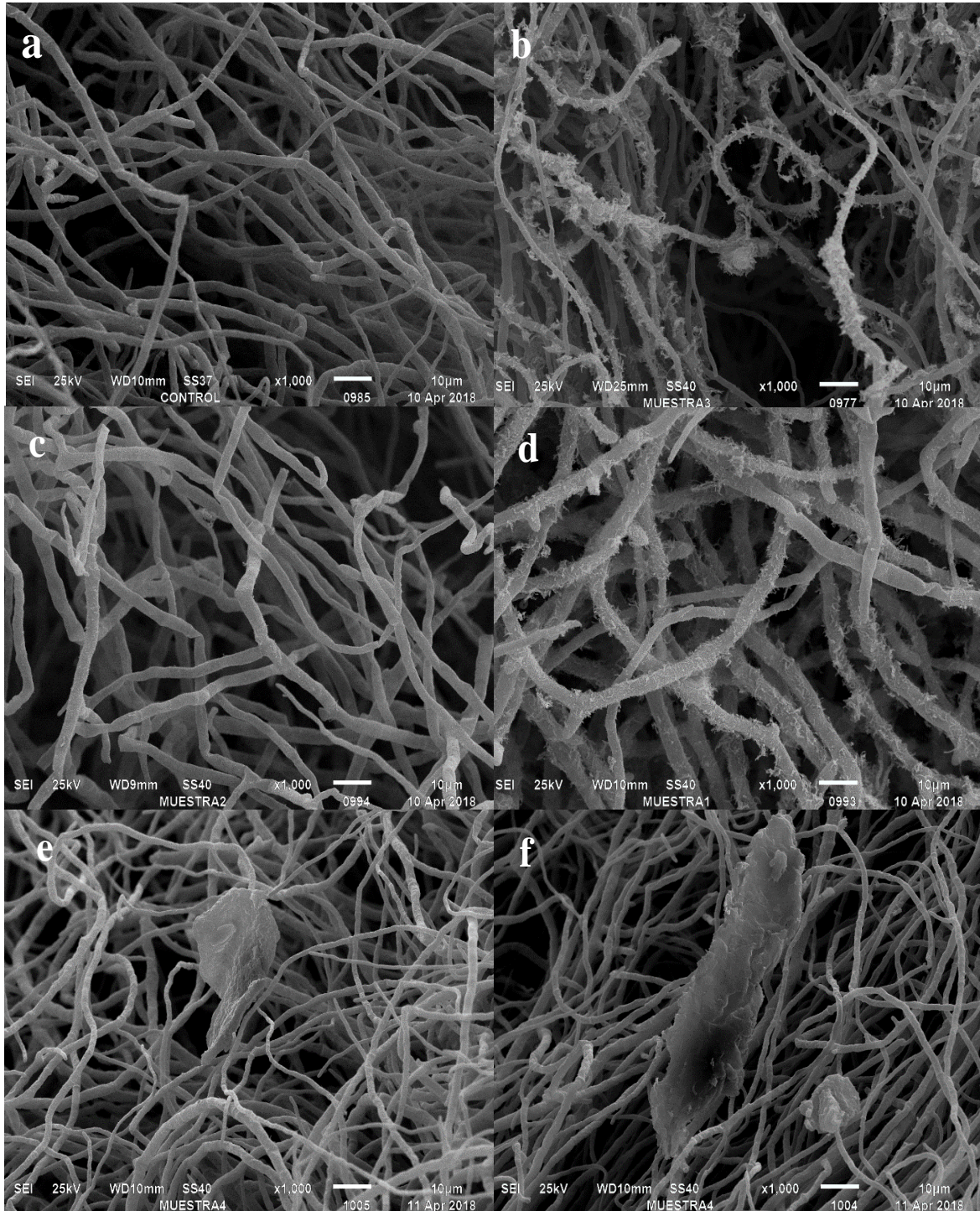
A las muestras enviadas al LaNSE se les aplicaron los procesos de inactivación antes mencionados: con un inhibidor metabólico y por calentamiento, posteriormente se aplicaron las condiciones generadas en el modelo de primer orden (pH 5, 180 rpm, 150 mg/L de colorante, 28°C, durante 150 min de tiempo de contacto).

A todas las muestras se les aplicó un lavado con un regulador de fosfatos 0.1 M con pH 7.2, se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en la solución de fosfatos durante 1 hora, se aplicaron

3 enjuagues de 5 minutos cada, se postfijó con tetróxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) al 1% en el regulador de fosfatos, se aplicaron 3 enjuagues de 5 minutos cada uno con la solución de fosfatos, a temperatura ambiente. La deshidratación se llevó a cabo con alcohol de 50%, 60%, 70%, 80%, 90% durante 10 minutos cada uno y 3 veces con alcohol absoluto al 100%. Posteriormente se secaron las muestras a punto crítico en un equipo Samdri -795 de Tousimis. Finalmente se sombrearon con oro en un equipo Denton Vacuum.

En la figura 30 y 31 se muestran las micrografías electrónicas de barrido de la muestra control, la cual no tiene colorante, de biomasa activa (aplicando 150 mg/L y aplicando 520 mg/L de colorante) y de la biomasa inactiva con los dos procesos. En las fig.30a y 31a se muestra el control, las hifas del micelio se encuentran de manera distribuida de grosor aproximado de 1.96  $\mu\text{m}$ , se observan los filamentos ramificados, los septos y no se encontraron deformaciones en las superficies de las hifas.

En las micrografías 30b y 31b se muestra la biomasa activa en contacto con 150 mg/L de colorante, en la cuales los filamentos ramificados y los ápices se encuentran recubiertos con una gran cantidad de cristales amorfos de diferentes tamaños, posiblemente debido a la adsorción del colorante, siendo mayormente observados en las hifas cenocíticas y septadas. Cabe mencionar que la presencia de los cristales sobre la superficie de las hifas se encontró en una gran parte de la muestras y sólo en zonas aleatorias no se encontraron. Confirmando que durante el proceso de decoloración de azul a la cuba con biomasa de *A. niger* se lleva a cabo el proceso de sorción del colorante a la pared celular, como anteriormente se propuso por fisosorción, así como también al ser activa, se tiene la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  el cual está también involucrado en la decoloración de azul a la cuba en estas condiciones.

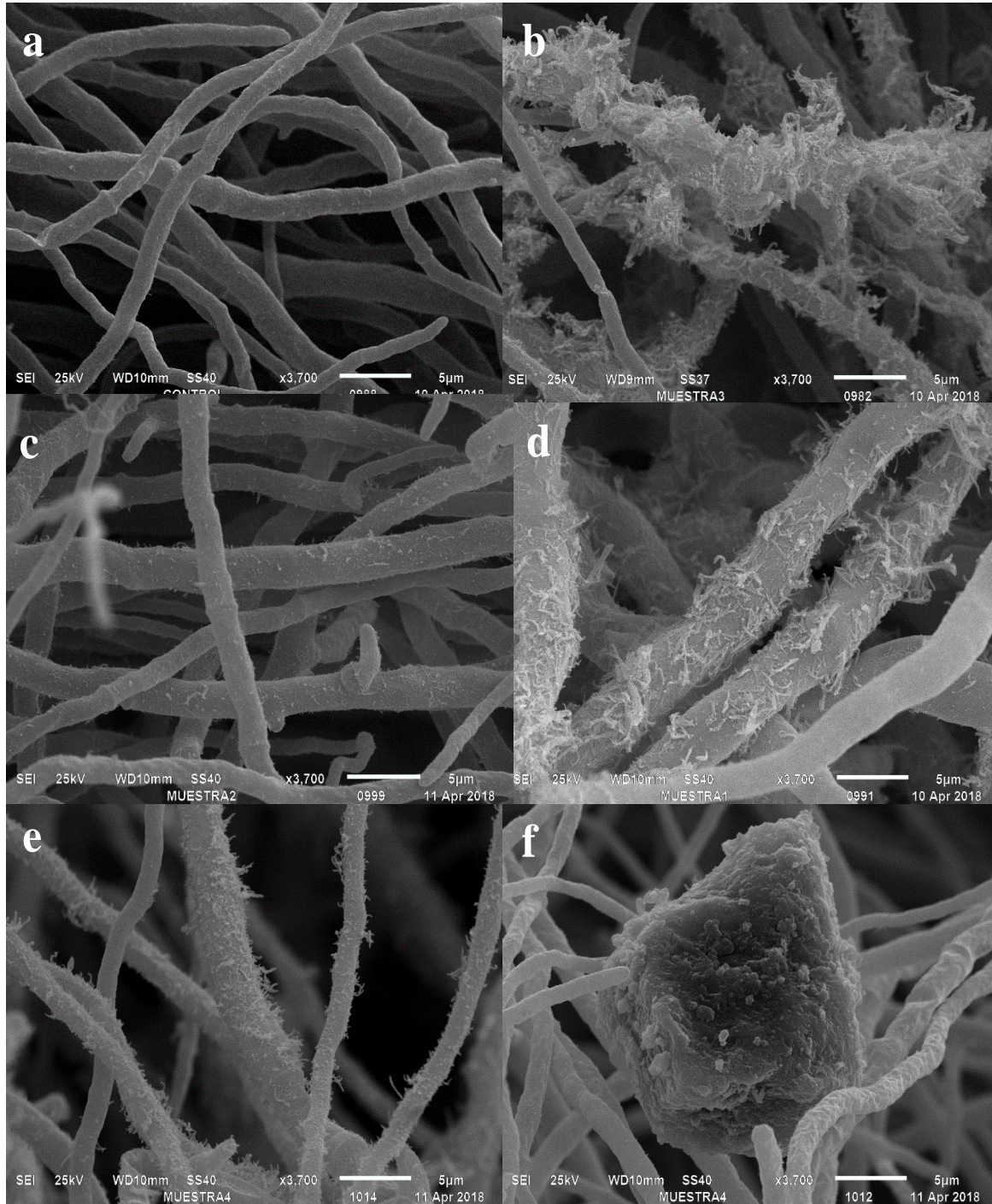


**Figura 30. Microfotografía electrónica de barrido de biomasa de *A. niger* (acercamiento de 1000x).** a) Control (Biomasa activa sin colorante), b) Biomasa activa después del proceso de remoción de 150 mg/L de azul a la cuba, c) biomasa inactiva con calor después del proceso de remoción del colorante, d) Biomasa inactiva con azida de sodio después del proceso de remoción del colorante, e-f) Biomasa activa con un exceso de color 520 mg/L de azul a la cuba.

En las micrografías 30c y 31c se muestra la biomasa con dos procesos de calentamiento una vez del proceso de decoloración, en la cuales los filamentos ramificados y los ápices mostraron una deformación, adelgazamiento, los septos ya no fueron perceptibles y se observaron modificaciones en el área superficial del micelio. Sólo en la fig. 31c con un acercamiento de 3700x se observaron pequeñas áreas aleatorias con cristales sobre la superficie de las hifas, lo que coincide con el bajo porcentaje de decoloración. Puesto que se hipotetiza que al ser inactivada la biomasa se modifican las partes estructurales de la pared celular afectando el proceso de sorción de colorante y debido a que la biomasa es inactivada hay una mínima actividad biológica reflejada en la baja generación de peróxido de hidrogeno.

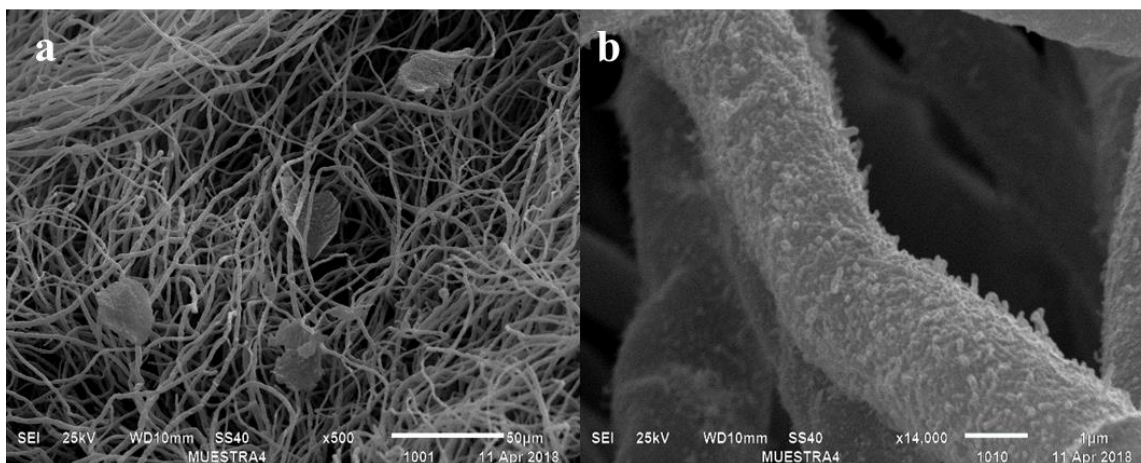
En las micrografías 30d y 31d se muestra la biomasa inactiva con la azida de sodio posterior al proceso de decoloración, en la cuales los filamentos ramificados y los ápices se encuentran recubiertos con cristales amorfos de diferentes tamaños, posiblemente del colorante, siendo mayormente observados en las hifas cenocíticas, cabe mencionar que la presencia de los cristales sobre la superficie de las hifas no se encontró en todas las áreas de las muestras sólo en algunas zonas aleatorias.





**Figura 31. Microfotografía electrónica de barrido de biomasa de *A. niger* (acercamiento de 3700x).** a) Control (Biomasa activa sin colorante), b) Biomasa activa después del proceso de remoción de 150 mg/L de azul a la cuba, c) biomasa inactiva con calor después del proceso de remoción, d) Biomasa inactiva con azida de sodio después del proceso de remoción, e-f) Biomasa activa con un exceso de color 520 mg/L de azul a la cuba.

En las micrografías 30e, f y 31e, f se muestra la biomasa activa en contacto con 520 mg/L de colorante, en la cuales los filamentos ramificados y los ápices mostraron una deformación, engrosamiento, los septos no fueron perceptibles y se observaron modificaciones en el área superficial del micelio. En las micrografías (Fig. 31e) se encontraron algunas zonas aleatorias donde se encuentran hifas recubiertas con una gran cantidad de cristales posiblemente del colorante, confirmando el proceso de sorción a pared celular. Es importante mencionar que en la muestra se encontraron aglomeraciones de cristales sobre las superficies de biomasa a un acercamiento de 500x (Fig.32a). En las Fig. 30f y 31f se observan cristales de gran tamaño, acumulados en algunas zonas de la muestra, estos posiblemente enganchados por algún metabolito excretado de la superficie de las hifas como se muestra en un acercamiento de 14000x (Fig.32b). Condiciones que posiblemente generar una acumulación de colorante en el micelio.



**Figura 32. Anomalías en las Microfotografías electrónicas de barrido de biomasa de *A. niger*.** a) acercamiento de 500x, b) acercamiento de 14000x.

En el proceso de decoloración de azul a cuba en las condiciones optimizadas en el DCC, en las cuales se emplearon 520 mg/L de colorante, en donde el proceso de decoloración se lleva a cabo en C. Lira Pérez Juana (2021), Cinvestav

de manera diferente en comparación con concentraciones más bajas (150 mg/L), en el cual está involucrado el proceso de sorción en la superficie de las hifas, la bioacumulación de cristales de gran tamaño en el micelio y la contribución de la glucosa oxidasa y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generados por la actividad metabólica del *A. niger*.

En las figuras 30-32, se observa la presencia de colorante en todas las muestras las cuales presentaron modificaciones en la superficie micelial y un engrosamiento de las hifas con deposiciones y precipitaciones de cristales de colorante, proceso antes ya reportado por Mathur (2017), quien empleó una cepa de *Aspergillus* para decolorar tres tipos de colorantes, confirmando las modificaciones en la superficie de la pared celular de las células y la bioacumulación. Con esto se muestra la afinidad que tiene *A. niger* por los colorantes, siendo un adsorbente alternativo para el tratamiento de efluentes coloreados.

### **6.8 Efecto de la fuente de carbono y de hierro en la decoloración de naranja G**

Con el objetivo de conocer el efecto de la fuente de carbono en la producción de ácidos orgánicos y su interacción con distintas fuentes de hierro durante la de decoloración de naranja G, se planteó un diseño factorial 2<sup>2</sup>. Puesto que con este tipo de diseño experimental se determinan los efectos principales de las variables (Montgomery, 2003). Las variables independientes fueron las fuentes de carbono, glucosa y lactosa; las fuentes de hierro sulfato ferroso y cloruro férrico, mostrado en la tabla 23. . Las condiciones empleadas fueron: medio de cultivo Wunder, agitación de 125 rpm, pH 6, Temperatura 28°C, 200 mg/L de naranja G y duración de 72 horas.

**Tabla 23. Diseño experimental y resultados de distintas fuentes de carbono/hierro en la decoloración de naranja G.**

Corrida No.	Variables independientes		Respuesta	Predichos	Residuales
	F. de carbono (10 mg/L)	F. de hierro (0.001 mg/L)	DC (%)		
1	Glucosa (1)	FeSO <sub>4</sub> (1)	64.881 ± 2.85	64.876	0.005
2	Glucosa (1)	FeCl <sub>3</sub> (-1)	62.670 ± 2.95	62.664	0.006
3	Lactosa (-1)	FeSO <sub>4</sub> (1)	42.687 ± 4.04	42.684	0.003
4	Lactosa (-1)	FeCl <sub>3</sub> (-1)	23.980 ± 3.31	23.976	0.004

La relación entre las 2 variables independientes y el porcentaje de decoloración pueden ser aproximados mediante el siguiente modelo polinomial de respuesta:

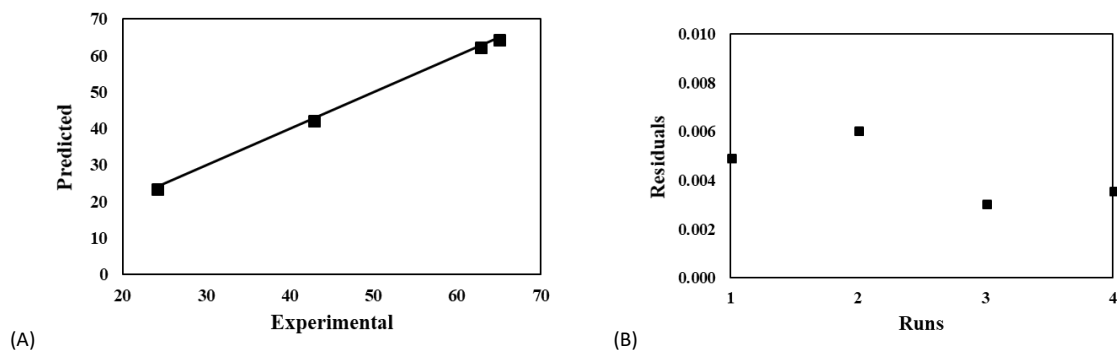
$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_i x_i + \varepsilon \quad (13)$$

Donde  $y$  es la variable respuesta DC(%);  $x_i$ 's son las variables independientes y  $\varepsilon$ , es el término residual que representa el error experimental. El parámetro  $\beta_0$  es la gran media que es una constante del modelo;  $\beta_i$  es un coeficiente lineal. Los datos obtenidos fueron ajustados al modelo lineal general y por medio de una regresión lineal se obtuvieron los coeficientes. Bajo este análisis se obtuvo el polinomio de respuesta:

$$\%DC = 48.55 + 15.22 x_1 + 5.23 x_2 - 4.124 x_1 x_2 + \varepsilon \quad (14)$$

Donde  $x_1$ , representa a la fuente de carbono y  $x_2$ , la fuente de hierro. Con base a los resultados obtenidos se realizó un análisis de residuales con el objetivo de validar el polinomio de respuesta obtenido y comprobar si el modelo es aplicable para la predicción de DC con una mínima cantidad de experimentos. Como se observa en la figura 33 los puntos residuales estimados con el polinomio de respuesta generalmente caen sobre la línea recta que indica el

error de la distribución normal y valida que el polinomio de respuesta ajusta adecuadamente con los datos experimentales (Sahan y Ozturk,2014).



**Figura 33. Análisis de residuales del diseño experimental de distintas fuentes de carbono/hierro en la decoloración de naranja G.** (A) Experimentales vs predichos; (B) Corridas vs residuales.

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y la estimación de parámetros (Tabla 24) para justificar la significación y adecuación de la regresión desarrollada, donde se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.97 y un coeficiente de variación de 6.85.

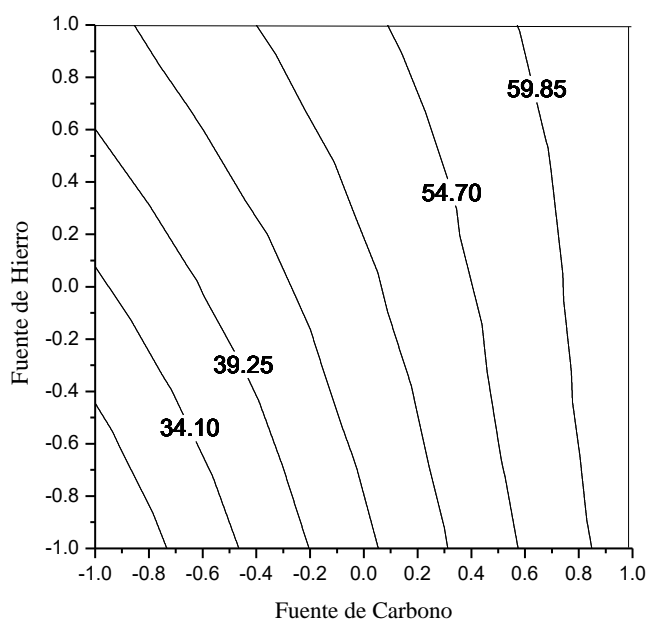
**Tabla 24. Estimación de parámetros del diseño de primer orden de distintas fuentes de carbono/hierro en la decoloración de naranja G.**

	GL	PE	ES	Valor - t	Pr >  t	SE
<b>Intercepción</b>	1	48.554	0.96	50.55	<0.0001	a
$x_1$	1	15.220	0.96	15.85	<0.0001	a
$x_2$	1	5.229	0.96	5.44	0.0006	a
$x_1x_2$	1	-4.124	0.96	-4.29	0.0026	a

GL Grados de libertad, PE Parametric estimate, ES Error standard, SE Significance statistical, a signification, b no signification

El análisis de varianza del polinomio de respuesta determino que las dos variables independientes (fuente de carbono y fuente de hierro) son estadísticamente significativas en la decoloración del colorante naranja G empleando biomasa activa de *A. niger*, cuando  $P < 0.05$  (varianza de 95%).

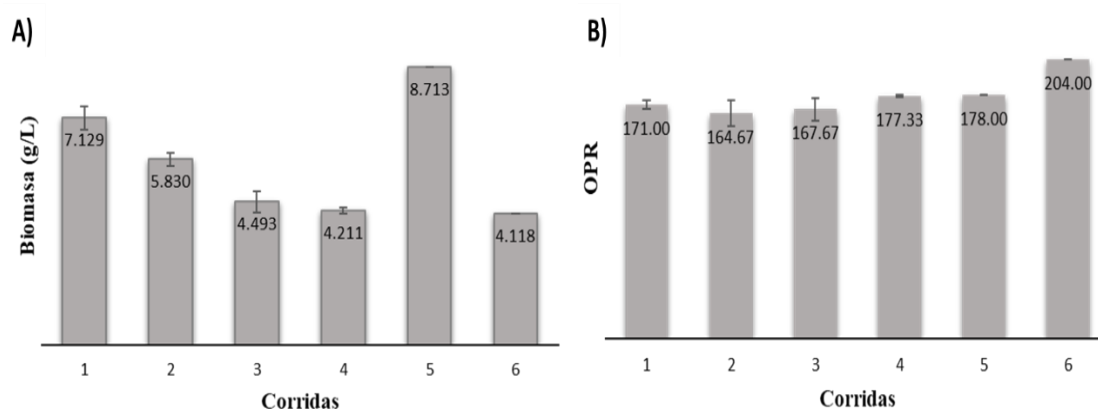
En la gráfica de contorno (Figura 34) los contornos no son líneas rectas paralelas debido a que el modelo de respuesta contiene únicamente los efectos principales de los factores  $x_1$  y  $x_2$ . Indicando que la decoloración de naranja G utilizando biomasa activa de *A. niger* incrementa con los valores altos de las variables  $x_1$  y  $x_2$ , siendo glucosa, como fuente de carbono y  $\text{FeSO}_4$ , como fuente de hierro. Por lo cual en los siguientes experimentos se empleó como fuente de carbono el valor codificado como +1, glucosa, y para la variable fuente de hierro el valor codificado como +1,  $\text{FeSO}_4$ , las cuales fueron estadísticamente las más favorables para el proceso de decoloración de naranja G.



**Figura 34. Grafica de contorno del efecto de las fuentes de carbono y de hierro en la decoloración de naranja G con biomasa activa de *A.niger*.**

Durante la experimentación se plantearon dos controles, sin colorante y utilizando como fuente de carbono glucosa y lactosa, ambos con sulfato de hierro como fuente de hierro, los cuales correspondieron a los tratamientos 5 y 6 respectivamente. En la figura 35 se muestran

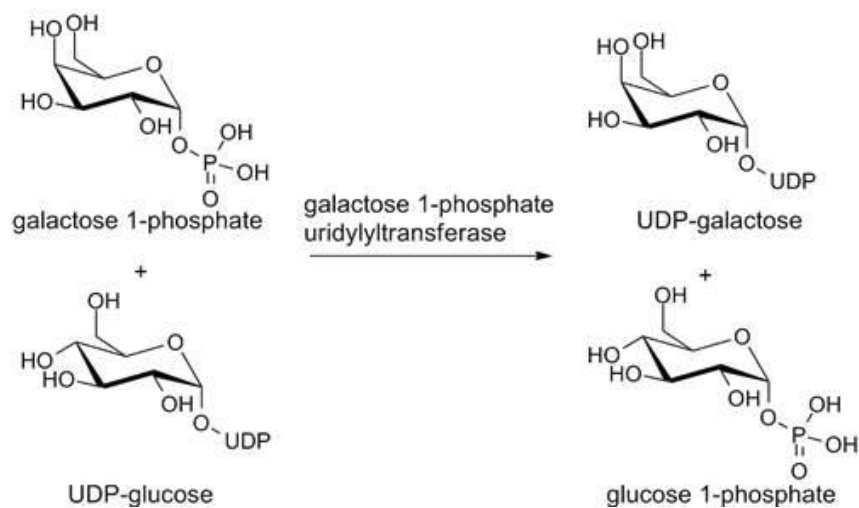
los valores de la biomasa obtenida y los valores OPR (Potencial de oxidación-reducción) los cuales son la medida de la actividad de los electrones comparado con la actividad de un electrodo de referencia, que mantiene siempre el potencial constante (valor 0). Por lo que sistemas en los cuales acepten electrones de un electrodo normal es una medición de potencial redox positiva, siendo un indicativo que se favorecen las reacciones de oxidación. En contraparte, si el sistema dona electrones al electrodo normal es una medición negativa, indicando un ambiente altamente reductor.



**Figura 35. *A. niger* en distintas fuentes de carbono y de hierro durante la decoloración de naranja G.** (a) Biomasa generada. (b) OPR.

En la figura 35(A) se muestra como la presencia del colorante (tratamiento 1-4) que provoca un cambio en el metabolismo teniendo un efecto negativo en la generación de la biomasa, debido a que el control utilizando glucosa (corrida 5) se genera una mayor cantidad de biomasa. Con un caso contrario en el control de lactosa, en la cual se obtiene un valor por debajo de la media, debido a que es un sustrato más complejo y metabólicamente es necesario mayor esfuerzo energético para separar los monosacáridos, en glucosa y galactosa, una vez separadas, glucosa entra directamente a la segunda reacción (fosforilación) de la glicólisis.

La galactosa se convierte en glucosa-1-fosfato en cuatro etapas. La primera reacción es la fosforilación de la galactosa a galactosa-1-fosfato por la galactoquinasa, posteriormente se incorpora un uridilo procedente de la uridina difosfoglucosa (UDP-glucosa) catalizada por la galactosa-1-fosfato uridiltransferasa, generando UDP-galactosa y glucosa-1-fosfato; Después la galactosa se epimeriza hasta glucosa mientras está unida al UDP (fig. 36) y posteriormente se incorpora directamente a la glucólisis.



**Figura 36. Reacciones de transformación de la galactosa a glucosa-1-fosfato.**

En la figura 35(b) se muestran los valores obtenidos del potencial redox (OPR) en los cuales en todas las condiciones son de magnitud positiva de 160-200, indicando que se favorecen las reacciones oxidativas en todas las corridas, incrementado la posibilidad de degradación de la estructura del colorante. No se encontró alguna diferencia estadística en los tratamientos 1-5. Obteniendo el valor más alto en el tratamiento 6 que fue el control con lactosa sin colorante.

Como ya se ha reportado que cuando es utilizada la glucosa como fuente de carbono se favorece la generación de ácido glucónico por las dos vías mencionadas en la sección M en C. Lira Pérez Juana (2021), Cinvestav



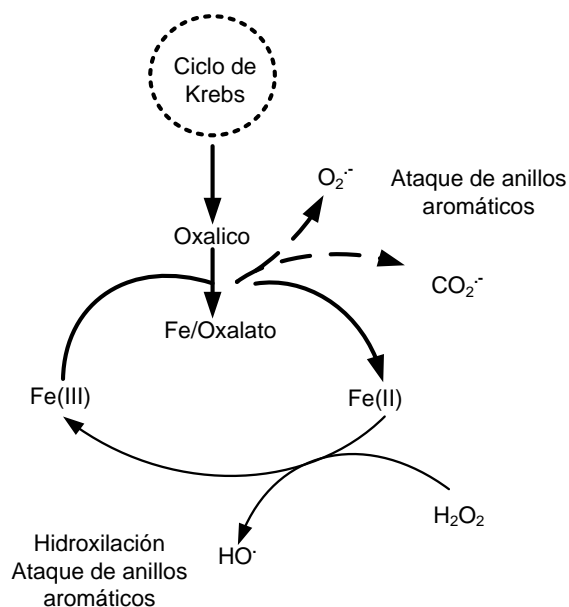
(1.4.1.1.2) y empleando lactosa como fuente de carbono, el ácido oxálico el cual está relacionado como el complejo oxálico/Fe involucrado en la generación de radicales libres que están relacionados en la degradación de estructuras complejas como la del colorante. Después de las 72 h de experimentación se obtuvo  $0.257 \pm 0.007$  mg/ L de  $H_2O_2$  en los cultivos, el cual también se ha relacionado e involucrado con la degradación de estructuras complejas.

### 6.9 Perfiles de Hierro $^{2+}$ y Hierro $^{3+}$ durante la degradación de naranja G.

*Aspergillus niger* ha demostrado producir  $H_2O_2$ , que puede ser empleado en el proceso Fenton (Ec 15-18) provocando la liberación de radicales  $OH\cdot$ , directamente a estructuras complejas como el naranja G, generando el rompimiento de diversos enlaces que facilitan la degradación.



Con base a lo anterior, se propone un mecanismo de degradación de compuestos orgánicos a través de la formación de radicales libres, posiblemente generados por el complejo ferrioxalato a través de la reacción de  $Fe^{+3}$  con ácido oxálico o glucónico y por las reacciones redox de  $Fe^{+3}/Fe^{+2}$  involucradas en la reacción Fenton como se muestra en la figura 37.

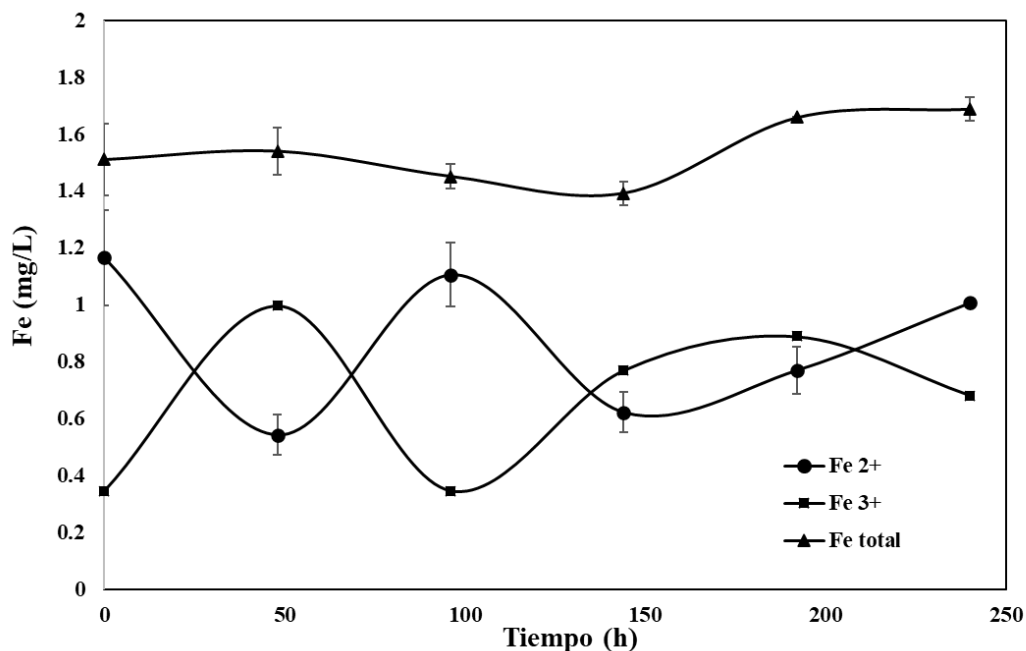


**Figura 37. Mecanismo propuesto de interacción de ácidos orgánicos producidos por *A. niger* y la fuente de hierro.**

Con base a la estequiometría de la ecuación 15, es necesario 1 mol  $Fe^{2+}$  y 1 mol de  $H_2O_2$  para generar 1 mol de  $OH\cdot$ . Siendo la relación de Fe y peróxido de hidrogeno de 1:1.

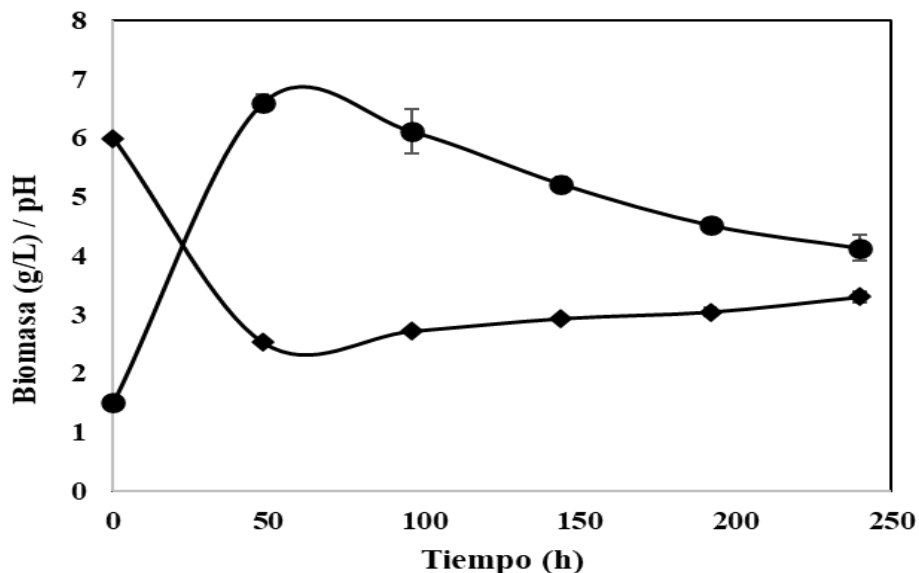
Durante la medición de la actividad de la GOX y de  $H_2O_2$  en la decoloración de azul a la cuba se registró como máximo 1.43 mg/L de  $H_2O_2$ , se decidió que para los perfiles de hierro 2+ y 3+, utilizar una concentración de 1.5 mg/L de fuente de hierro para favorecer la reacción entre el  $H_2O_2$  y el hierro.

En la figura 38 se muestran los perfiles de hierro obtenidos durante la decoloración de naranja G las condiciones fueron: Medio de cultivo Wunder, pH 6, glucosa como fuente de carbono,  $FeSO_4$  como fuente de hierro, agitación de 125 rpm, 28°C, 200 mg/L de naranja G, con muestreo cada 48 horas, duración de 240 h. La cuantificación de hierro fue en base al método de fenantrolina para  $Fe^{2+}$  y  $Fe_{Total}$ , la diferencia entre el  $Fe_{Total}$  y el  $Fe^{2+}$  se consideró como  $Fe^{3+}$  (Eaton et al.,2005)(Kaksonen et al.,2014).



**Figura 38. Perfiles de Hierro  $^{2+}$ , Hierro  $^{3+}$  y Hierro  $^{total}$  durante la decoloración de naranja G utilizando biomasa activa de *A. niger*.**

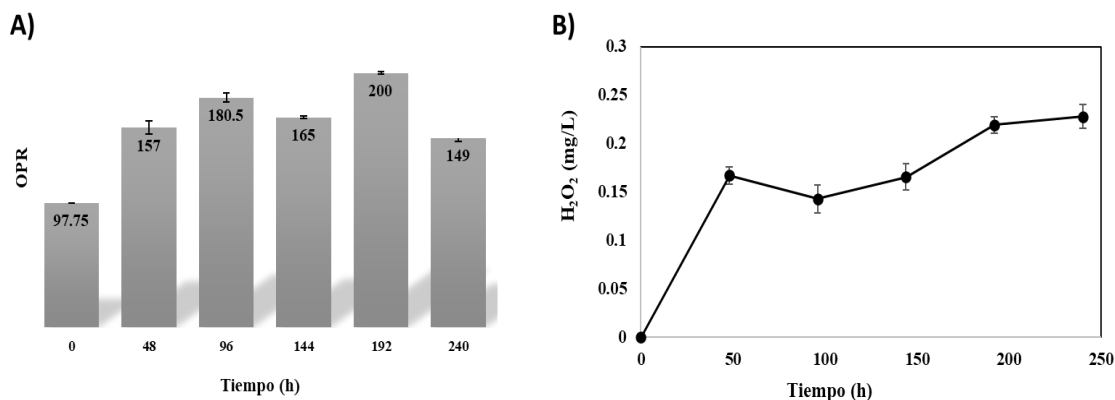
En la cual se observa el hierro total se mantiene las primeras 48 h, posteriormente se observa una disminución posiblemente por la adsorción de hierro a biomasa fúngica, después de las 144 h se observa un incremento por arriba de la medición inicial de hierro, el cual coincide con la fase de muerte del hongo, figura 39. Proceso en el cual está involucrado la lisis celular generando una liberación de hierro del interior de la célula y el adsorbido por la biomasa.



**Figura 39. Biomasa y pH generados durante la decoloración de naranja G en el seguimiento de los perfiles de Hierro  $^{2+}$ , Hierro  $^{3+}$  y Hierro  $^{total}$**

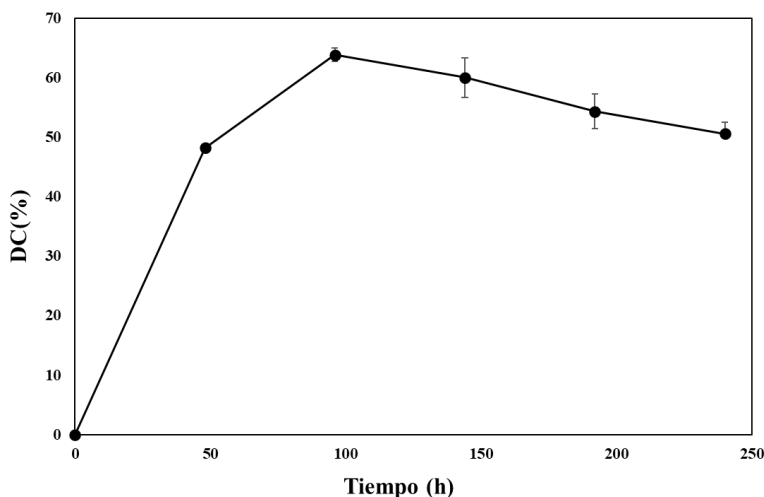
En el caso de los perfiles de  $Fe^{+2}$  y  $Fe^{+3}$ , se observa que no son constantes durante todo el tiempo, debido a las reacciones redox de  $Fe^{+3}/Fe^{+2}$ , en las primeras 96 h se obtuvo el punto más alto de  $Fe^{2+}$ , con un valor de OPR de 180 (figura 40a), indicando que se están favoreciendo las reacciones de oxidación, generando condiciones oxidativas., Posteriormente la concentración de  $Fe^{+2}$  disminuy y fue acercando a un equilibrio con el  $Fe^{+3}$ , coincidiendo con los tiempo de muerte celular', en la cual ya no se tiene actividad biológica que induzca condiciones de oxidación o reducción. Para el caso de  $Fe^{3+}$  el punto más alto se presentó en las primeras 48 h de cultivo con un valor de OPR de 157.

En la figura 40b se muestra la generación de  $H_2O_2$  durante la decoloración de naranja G, aumentando gradualmente hasta las 240 h, manteniéndose a las 190 h en 0.22 mg/L, el cual está involucrado en la remoción de estructuras complejas como son los colorantes como el naranja G.



**Figura 40. Indicadores de condiciones oxidativas en la decoloración de naranja G.** a) OPR y b) Peróxido de hidrógeno.

Como se mencionó previamente, a las 96 h se presentó el punto más alto del  $\text{Fe}^{2+}$ , indicando condiciones oxidativas, en base al diagrama de la figura 35 se propone que posiblemente las reacciones dirigidas a la generación de  $\text{Fe}^{2+}$ , estas condiciones tienen un mayor velocidad, en comparación a las dirigidas a la generación de  $\text{Fe}^{3+}$ . Posiblemente generando una mayor cantidad de radicales libres, reflejados en el porcentaje de decoloración de naranja G, el cual a este tiempo de 96 h, se obtuvo el punto máximo de decoloración (64%) (Fig. 41), en el cual coincide la presencia de peróxido de hidrogeno, y el máximo valor de OPR y el máximo valor de  $\text{Fe}^{2+}$ .



**Figura 41. Decoloración de naranja G en el seguimiento de los perfiles de Hierro <sup>2+</sup>, Hierro <sup>3+</sup> y Hierro total**

### 6.10 Generación de ácidos orgánicos por *A. niger* en medios con diferentes fuentes de carbono y fuentes de hierro.

En el medio libre de células se identificaron los ácidos orgánicos generados por *A. niger* en las diferentes condiciones del diseño 2<sup>2</sup>, responsables de la acidificación de los medios de cultivo. La determinación y cuantificación se hizo por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con un detector UV a una longitud de onda de 210 nm y comparando los tiempos de retención con estándares externos. Cada corrida del diseño 2<sup>2</sup> se llevó a cabo por triplicado y cada determinación en HPLC por duplicado.

En los diferentes medios se detectaron los ácidos; glucónico, oxálico, cítrico, tartárico, málico, succínico, fórmico, y acético (Tabla 25). La generación de ácidos orgánicos en medios líquidos depende en gran medida de la fuente de carbono (FC) que se utiliza, en el caso del tratamiento 1, donde se utilizó como fuente de C (FC) glucosa y de hierro (FH) el FeSO<sub>4</sub>, se generaron los ácidos; glucónico, succínico, fórmico y el acético, en el tratamiento 2 se detectaron los ácidos; glucónico, succínico y acético, los cuales son principalmente productos de la oxidación de la glucosa. En los tratamientos 3 y 4 se utiliza como FC la lactosa en donde la principal generación de ácidos son el; glucónico, oxálico, succínico y en menor medida tartárico. Diferencias obtenidas debido a las distintas fuentes de carbono, puesto que el metabolismo de la cepa es diferente para cada FC (10 g/L) y FH (0.001 g/L).

**Tabla 25. Generación de ácidos orgánicos de *A. niger* con FC Y FH.**

Run	Ácidos orgánicos (mg/L)						
	Glucónico	Oxálico	Cítrico	Tartárico	Succínico	Fórmico	Acético
1	1036.82 ±57.4	0	0	0	68.86 ±3.5	6.87 ±0.6	28 ±1.4
2	954.81 ±68.5	0	0	0	70.95 ±9	0	25.44 ±2.6
3	785.95 ±97.8	605.99 ±28.3	0	3.09 ±1.2	228.23 ±13.5	0	0
4	814.12 ± 73.6	796.93 ±35.2	0	3.15 ±0.1	250.16 ±1.9	0	0

La Lactosa como una fuente de carbono es un sustrato más complejo y metabólicamente es necesario mayor esfuerzo energético para separar los monosacáridos, en glucosa y galactosa, una vez separadas la glucosa entra directamente a la segunda reacción (fosforilación) de la glicolisis. La galactosa se convierte en glucosa-1-fosfato en cuatro etapas. La primera reacción es la fosforilación de la galactosa a galactosa-1-fosfato por la galactoquinasa, posteriormente se incorpora un uridilo procedente de la uridina difosfoglucosa (UDP-glucosa) catalizada por la galactosa-1-fosfato uridiltransferasa, generando UDP-galactosa y glucosa-1-fosfato; Después la galactosa se epimeriza hasta glucosa mientras está unida al UDP (figura 42 ) y posteriormente se incorpora directamente al metabolismo principal de carbohidratos que es la glucolisis.

En los hongos existen diversas estrategias para el catabolismo de la lactosa principalmente por una hidrolisis por la  $\beta$ - galactosidasa extracelular y mediante de permeasa la glucosa y la galactosa son transportadas al interior de la célula; así mismo la lactosa es transportada por la lactosa permeasa al interior de la célula y es hidrolizada por la  $\beta$ - galactosidasa intracelular. Una vez que la lactosa es hidrolizada por diversos mecanismos la glucosa es metabolizada por vía glucolisis o vía hexosas fosfato o vía Entert-Duodoroff (Griffin, 1993) y la galactosa es convertida a glucosa-1- fosfato .

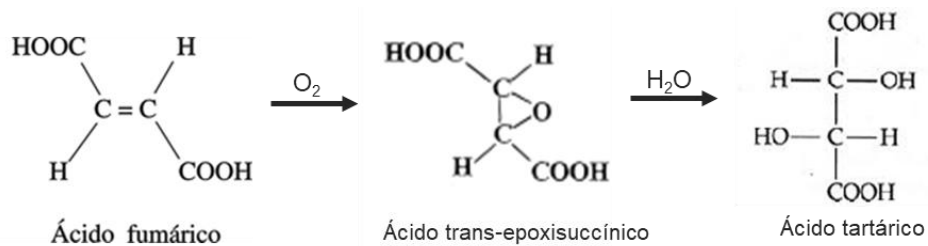
En cepas de genero *Aspergillus* se ha encontrado que el catabolismo de la lactosa ocurre por medio de la lactosa permeasa y la  $\beta$ - galactosidasa intracelular (Seiboth et al., 2007), mecanismo por el cual se evita que la glucosa obtenida de la lactosa se desvíe a la generación de ácido glucónico. Por lo contrario, en esta investigación sugiere que la hidrólisis de la lactosa es vía extracelular debido a que se detectaron los ácidos el Ac. Glucónico y oxálico

en los tratamientos 3 y 4, por lo que se podría suponer que la glucosa obtenida de la lactosa es utilizada como sustrato de la glucosa oxidasa extracelular.

La generación de ácido glucónico se detectó en todas las condiciones aplicadas, debido a que la mayor parte de la glucosa es utilizada como sustrato de la glucosa oxidasa para la formación de este ácido. En el caso de los tratamientos 3 y 4, la disponibilidad de la glucosa es menor, debido a que se obtiene de la lactosa, obteniendo valores del ácido glucónico, al generado en las condiciones 1 y 2. La producción de ácido succínico fue mayor en las condiciones 3 y 4, siendo al menos tres veces mayor a la detectada en las condiciones 1 y 2, por lo que sugiere que al utilizar lactosa como fuente de carbono, se promueve la generación de este ácido por diversos mecanismos, vía ciclo de Krebs y vía ciclo de glioxilato, ambos siendo intracelulares. Se detectó ácido acético solamente en las condiciones 1 y 2, las cuales utilizaron glucosa como fuente de carbono y la producción fue nula utilizando lactosa, lo que sugiere que la formación de citrato durante el ciclo de Krebs no es completamente eficiente y hay una posible acumulación en la formación de ácido acético.

La generación de ácido tartárico en medios con lactosa puede ser explicada por el  $H_2O_2$ , generado por la actividad de las enzimas glucosa oxidasa y glioxal oxidasa, el cual puede reaccionar con el doble enlace del ácido maléico o bien por la adición de un oxígeno molecular en los dobles enlaces del ácido fumárico (generado a través del ciclo de Krebs) formando el ácido trans-1,3-epoxisuccínico, seguido de una hidratación produciendo el ácido tartárico como se muestra en la figura 40.



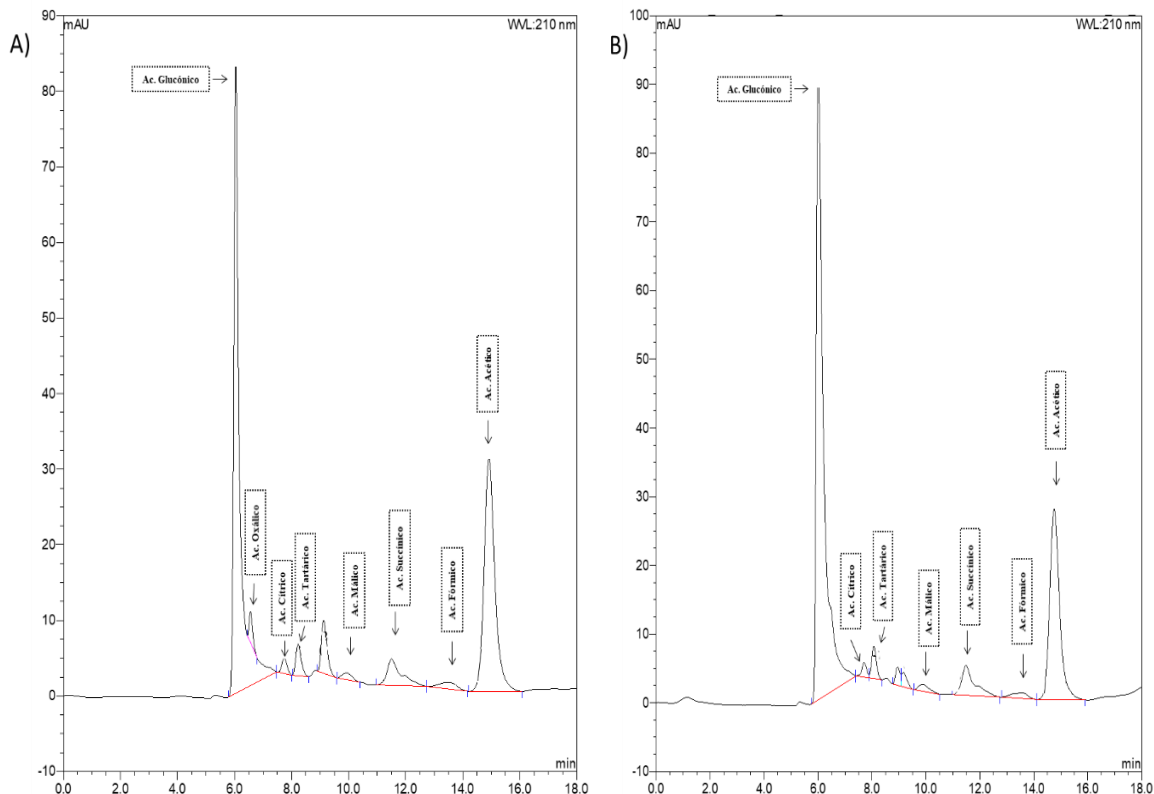


**Figura 42. Mecanismo propuesto de la biosíntesis de ácido tartárico por *A. niger*.**

### 6.11 Generación de ácidos orgánicos por *A. niger* durante la degradación de naranja G

La principal fuente de generación de ácidos orgánicos es por medio del ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ciclo de Krebs la cual es la vía degradativa dentro del metabolismo para la generación del ATP y suministra intermediarios para la biosíntesis de aminoácidos (Stryer, 1990).

Se ha reportado la generación de ácidos orgánicos en una gran variedad de medios de cultivo dirigidos principalmente a la producción de ácido cítrico, oxálico y glucónico para su uso industrial en esta investigación en el medio de cultivo libre de células y de OG se identificaron el ácido glucónico, oxálico, cítrico, tartárico, málico, succínico, fórmico y acético (Figura 43a) y glucónico, oxálico, cítrico, tartárico, málico, succínico, fórmico y acético en medios libres de células, provenientes de la degradación de 200 mg/l de OG (Figura 43b).



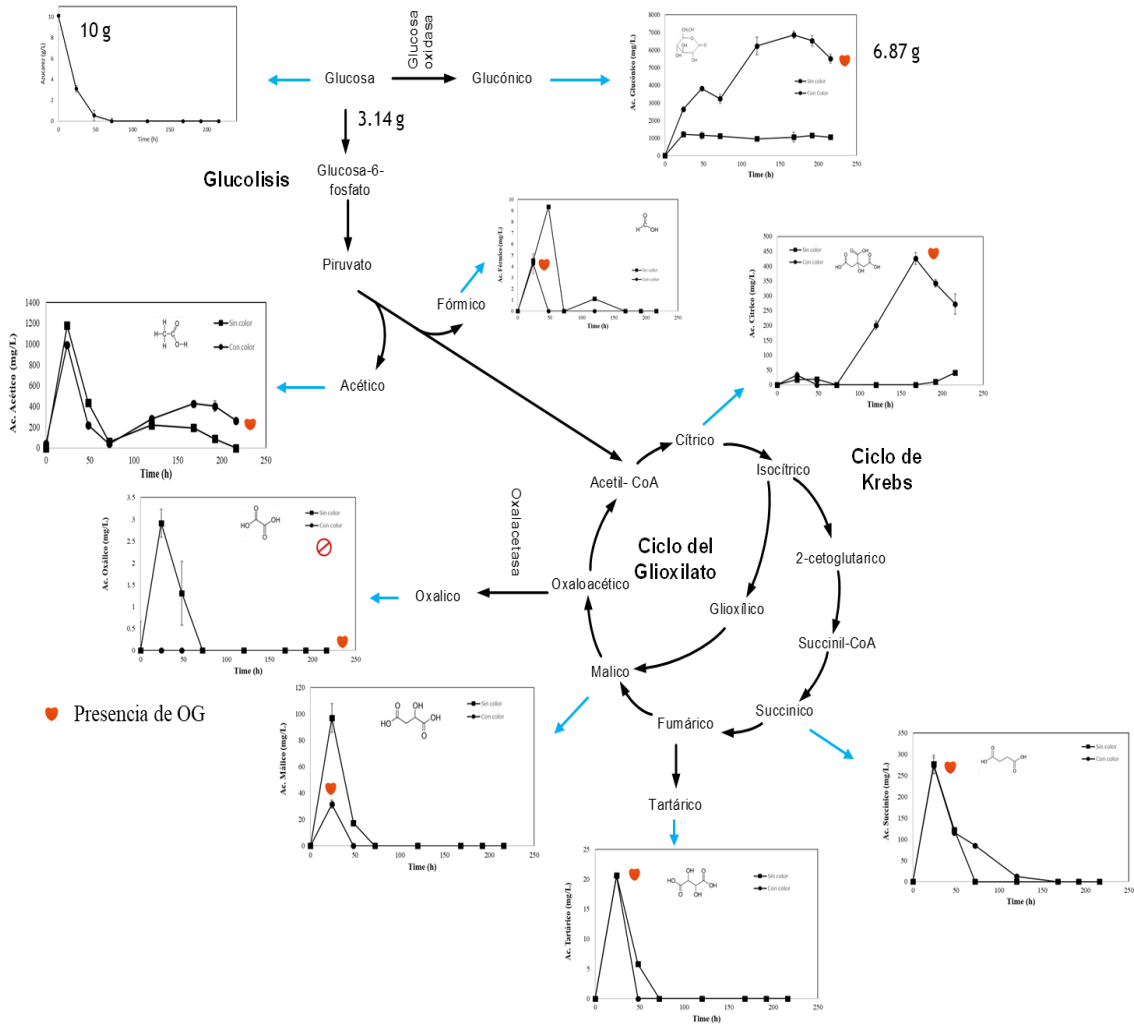
**Figura 43. Identificación de ácidos orgánicos generados por *A. niger*.** A) Ausencia de colorante, B) Presencia de 200 mg/L de OG.

La generación de ácidos orgánicos por la cepa de *A. niger* de forma constitutiva en medio Wunder a 28°C, 125 rpm y durante la degradación de OG (200 mg/L) se observa en la fig. 44. En donde se observa que la presencia del colorante modifica el metabolismo de la cepa por lo que se tienen diferencias en la generación de diversos ácidos orgánicos, algunos no incluidos en el ciclo de Krebs como la alta generación de ácido glucónico y cítrico, la reducción a la mitad de la producción de la forma constitutiva de ácido fórmico, málico, la nula detección de oxálico, en condiciones en presencia del colorante. Aunque no se encontraron diferencias en la producción del ácido succínico y acético.

Los ácidos orgánicos pertenecientes al ciclo de Krebs alcanzaron su máxima generación en medio Wunder con y sin presencia del colorante a las 24 horas de cultivo (figura 44), en el M en C. Lira Pérez Juana (2021), Cinvestav

caso de ácido succínico se alcanzó 273 mg de ácido/ L sin encontrar diferencia estadísticamente significativa en las dos condiciones con y sin colorante, posteriormente se presenta un decaimiento prolongado durante las siguientes horas. En el caso del ácido málico, la máxima producción fue en la condición sin colorante que fue de 97 mg/L, siendo menos de la mitad con OG, 31 mg/L a las 24 h . Se detectaron sólo 2.91 mg/L de ácido oxálico sin OG. La máxima generación de ácido acético fue de 1177 mg/L sin colorante y 991 mg/L con el colorante, en el caso de ácido cítrico, la máxima generación fue a las 168 h, alcanzando 425 mg/L con el colorante, sugiriendo una acumulación de este ácido, provocado por el efecto del colorante en el metabolismo de la cepa, promoviéndose su generación después de las 72 h.

Aun que se ha reportado que cepas de *A. niger* es capaz de generar altas concentraciones de ácido oxálico utilizando glucosa como FC manteniendo el pH superior a 6 en medios ricos de nitrógeno y fósforo (Cameselle et al., 1988; Ruijter et al. 1999). En esta investigación, no se controló el pH durante los experimentos, por lo que la generación de ácido oxálico fue muy baja (2.91 mg/L) en el medio libre de colorante, siendo esta generación de forma constitutiva de la cepa y no fue detectable en los medios que contenían colorante, debido a que la mayor parte de la glucosa fue utilizada como sustrato para la síntesis de ácido glucónico, la cual es catalizada por la enzima glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4). La formación del ácido glucónico ocurre extracelularmente, puesto que la glucosa oxidasa puede encontrarse en la pared celular o ser secretada al medio de cultivo. Se ha reportado que cepas de *A. niger* en condiciones adecuadas puede alcanzar eficiencias de conversión teóricas sobre glucosa de hasta un 95%.

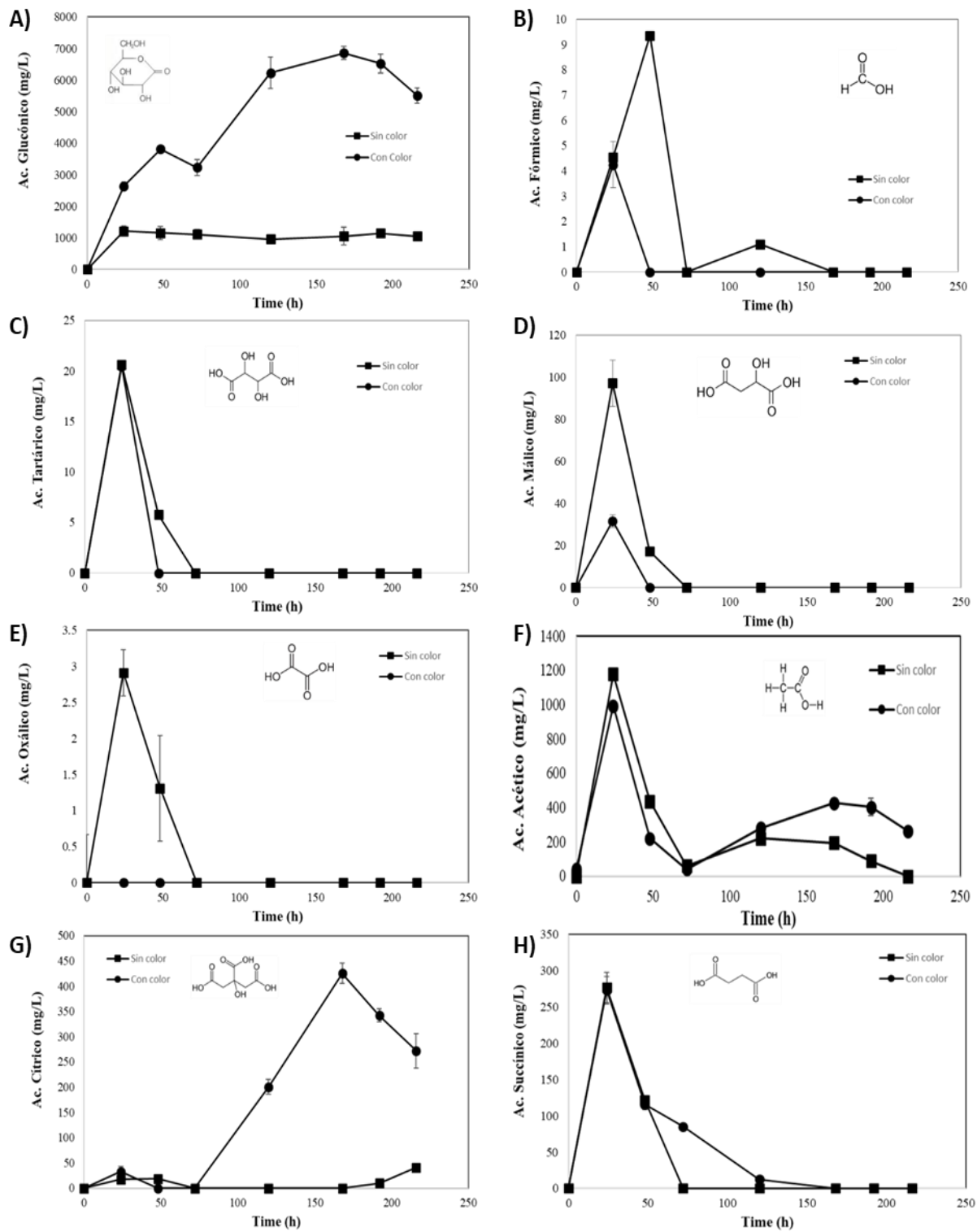


**Figura 44. Detección de ácidos orgánicos pertenecientes al metabolismo de carbohidratos en *A. Níger*.**

La nula detección de ácido oxálico durante la degradación de OG puede ser explicada a que la concentración de oxalato dentro de las células fúngicas y en la cercanía de las hifas es regulada por la oxalato descarboxilasa, que descompone el ácido oxálico en ácido fórmico y dióxido de carbono. Lo que la detección de ácido fórmico y la ausencia de oxálico (Figura 45abc) es posiblemente explicado por la descarboxilación del ácido oxálico (Shimazono,1955)(Mäkelä et al.,2002) o por el consumo de la cepa por los diferentes ácidos

orgánicos ya generados, una vez que la fuente de carbono es limitada o nula, siendo un ácido orgánico de un solo átomo de carbono, y el más simple de los ácidos orgánicos.

Durante la degradación de OG por *A. niger* se generan altas concentraciones ácido acético (1177 mg/L) en las primeras horas de cultivo (24 h) posiblemente producido vía ciclo de Krebs, posteriormente a este punto se tiene un rápido decaimiento en la concentración de ac. Acético lo que se puede suponer que la cepa al estar en condiciones de stress utiliza el acetato como una fuente de carbono por vía ciclo del glioxilato el cual puede utilizar el acetato como precursor del acetyl-CoA y convertir el acetato en succinato para poder producir energía o la biosíntesis de algún precursor necesario. A diferencia del ciclo de Krebs el ciclo del glioxilato evita las dos etapas descarboxilantes del ciclo de Krebs, otra diferencia es que entran dos moléculas de acetyl-CoA por vuelta y en el de Krebs sólo una (Stryer, 1990). Lo cual coincide con los resultados de esta investigación debido a que a las 72 h es nula la fuente de carbono, tiempo en el cual coincide con el incremento exponencial de la concentración de ácido Cítrico el cual puede estar generándose por esta vía alterna (ciclo glioxilato) debido a las condiciones de estrés en las que se encuentra el microorganismo. Una vez que se llega a su generación máxima (168 h) se presenta una disminución en su concentración la cual coincide con el segundo incremento en la generación de ácido acético, lo que confirma el consumo de ácidos orgánicos como una fuente de carbono al ser nula la principal fuente de carbono. Cabe mencionar que la acumulación de ácido cítrico es inhibitoria para el ciclo de Krebs (Alvarez *et al.*, 2000) por lo que después de las 120 h de cultivo ya no se detectó ningún ácido generado por esta vía.



**Figura 45. Generación de ácidos orgánicos durante la degradación de OG por *A. niger*.**  
 A) Ac. Glucónico, B) Ac. Fórmico, C) Ac. Tartárico, D) Ac. Máltico, E) Ac. Oxálico, F) Ac. Acético, G) Ac. Cítrico, H) Ac. Succínico.

En la tabla 26 se muestran las velocidades específicas máximas de generación ( $\mu_{GEN}$ ) calculadas de los diversos ácidos orgánicos producidos por la cepa de *A. niger* en las condiciones empleadas, con colorante y sin colorante en las cuales se observa que en la ausencia del colorante las velocidades de generación no hay diferencia alguna entre ellas y en presencia del colorante la velocidad máxima de generación del ácido glucónico y cítrico son menores en comparación a las obtenidas sin colorante.

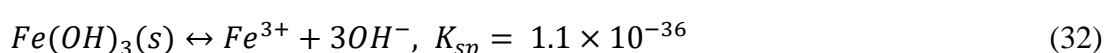
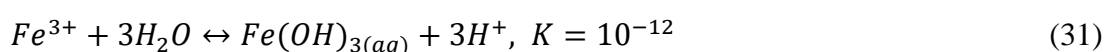
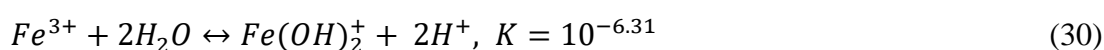
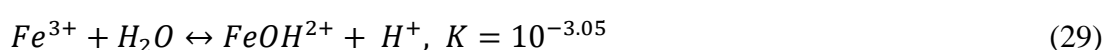
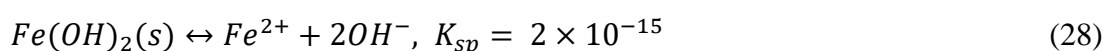
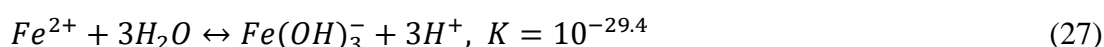
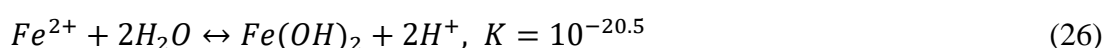
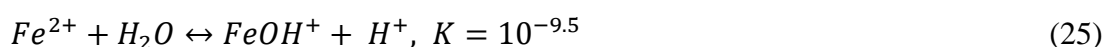
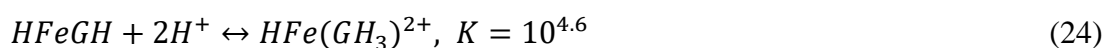
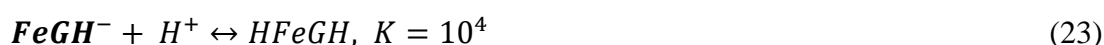
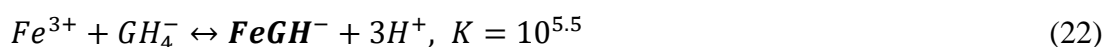
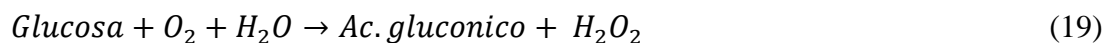
**Tabla 26. Velocidades máximas específicas de generación de ácidos orgánicos por *A. niger*.**

Ácido	$\mu_{GEN}$ ( $h^{-1}$ )	
	Ausencia de naranja G	Durante la degradación de naranja G (200 mg/L)
Glucónico	0.0417	0.0215
Oxálico	0.0417	0.0000
Cítrico	0.0417	0.0159
Tartárico	0.0417	0.0417
Málico	0.0417	0.0417
Succínico	0.0417	0.0417
Fórmico	0.0316	0.0417
Acético	0.0417	0.0400

### 6.12 Generación de radicales libres vía Fenton modificado por el complejo Glucoferro.

Debido a que en el grupo de trabajo se ha detectado la producción de peróxido de hidrógeno, así como la formación de los ácidos orgánicos, en este trabajo se propone un mecanismo de degradación de compuestos orgánicos por *Aspergillus niger* a través de la formación de radicales libres como radicales hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), radicales anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radicales anión dióxido de carbono ( $CO_2^{\cdot-}$ ), posiblemente generados por el complejo **glucoferro** a través de la reacción de  $Fe^{+3}$  con ácido glucónico producido con un alto rendimiento (hasta el 95 % , según Yang *et al.*, 2016) por *A. niger* , y por las reacciones redox de  $Fe^{+3}/Fe^{+2}$  involucradas en la reacción Fenton, siguiendo la siguiente cadena de reacciones

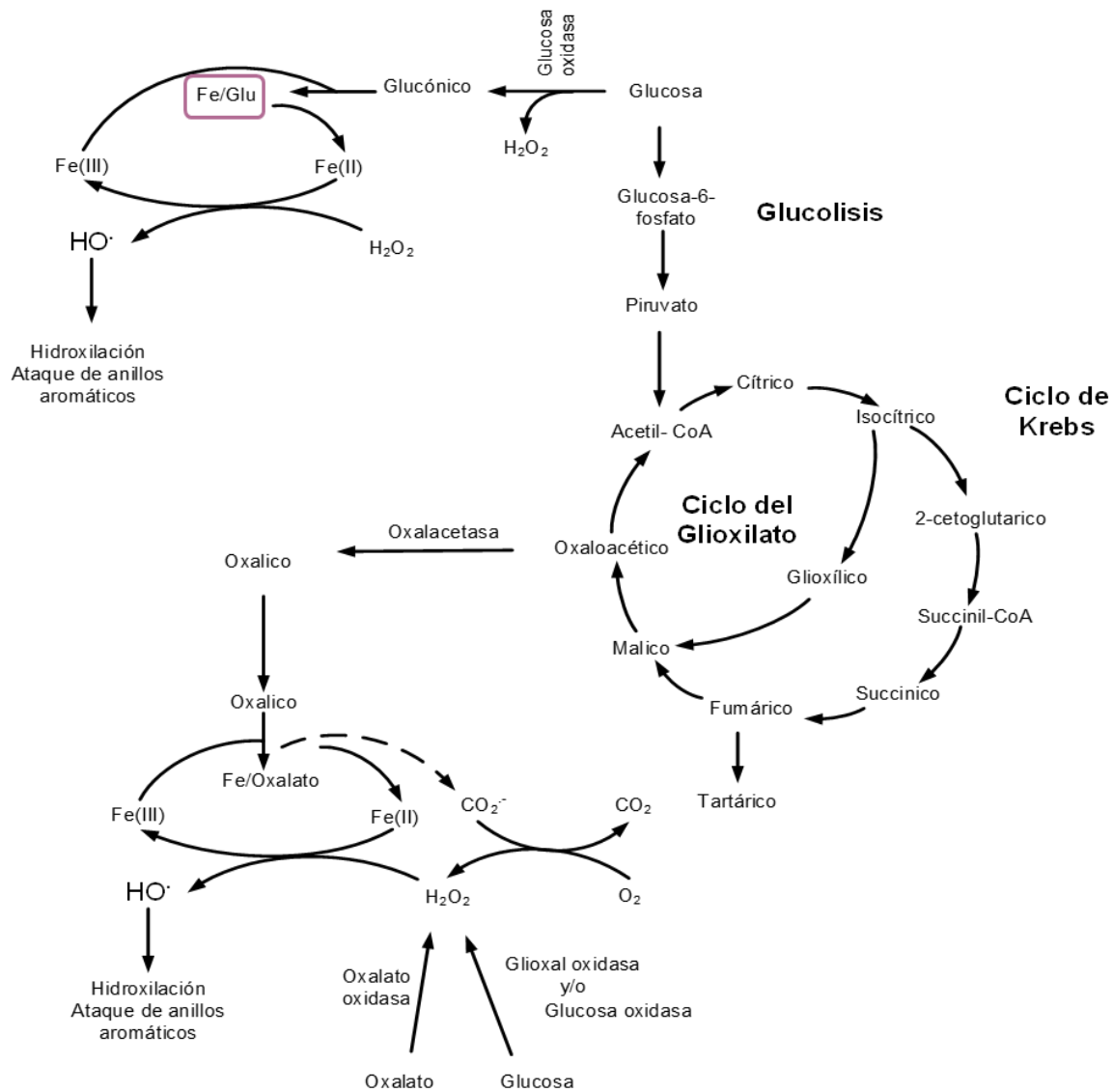
involucradas en la generación de radicales mediante el complejo glucoferro, anteriormente reportadas por Ahuja *et al.*,2007, en la remoción de triclorofenol en condiciones de remoción química.



En la figura 46 se muestra la modificación en el mecanismo anteriormente propuesto por la Dra. Refugio Rodríguez Vázquez (comunicación personal) para la generación de radicales libres mediante la interacción de ácidos orgánicos y fuentes de hierro en sistemas empleando hongos. Debido a la nula detección de ácido oxálico durante la degradación de OG se propone el mecanismo en el cual mediante la acción de la glucosa oxidasa es generado el ácido glucónico en presencia de glucosa como fuente de carbono, generando peróxido de hidrogeno como resultado de la reacción, una vez generado el ac. Glucónico y en presencia de una fuente de hierro se propone la formación del complejo Fe/ácido glucónico, posteriormente M en C. Lira Pérez Juana (2021), Cinvestav



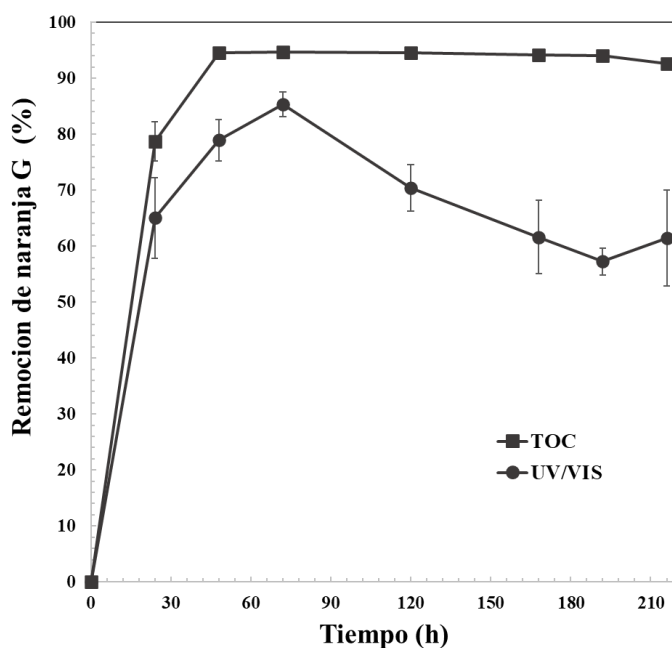
mediante reacciones redox del  $Fe^{3+}$  y  $Fe^{2+}$  y el  $H_2O_2$  presente en el sistema (generado por el metabolismo de *A.niger*), se lograría la síntesis de radicales libres como el  $HO\cdot$ , para la hidroxilación de compuestos aromáticos presentes en diversos compuestos tóxicos, en este estudio en la estructura química de OG.



**Figura 46. Nueva propuesta en el mecanismo de generación de radicales, via Fenton modificado por el complejo glucoferro en *A. niger***

### 6.13 Degradación de naranja G por *A. niger*

Durante la degradación del colorante naranja G se llevó a cabo el seguimiento de la presencia del colorante en el medio líquido por espectrofotometría UV/VIS y por medio de la cuantificación del carbono orgánico total (TOC)(Fig. 47) en la cual la mayor parte de la degradación de colorante se lleva a cabo en las primeras 48 horas de cultivo, en el seguimiento por medio de UV/VIS se observa un alto porcentaje de remoción (85%) y posteriormente un proceso de desorción, coincidiendo con la fase de muerte de la cepa, reapareciendo el colorante en el medio líquido. Indicando que un 57 % de la remoción fue por medio de un proceso de degradación y un 28 % por sorción.

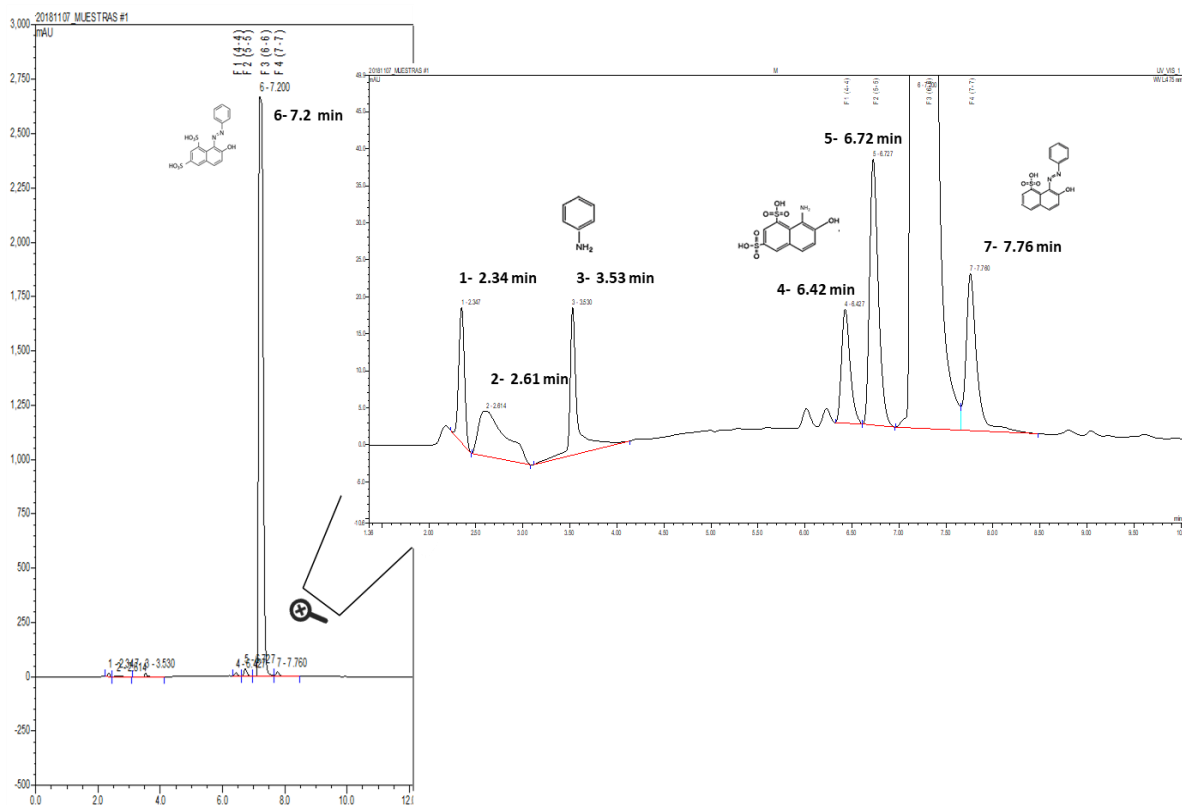


**Figura 47.** Seguimiento de la remoción de OG por método UV/VIS y TOC.

En el proceso de degradación de OG se han reportado una serie de posibles rutas y metabolitos de degradación de OG las cuales ya han sido anteriormente mencionados, por lo que se obtuvieron cromatogramas con el fin de identificar posibles metabolitos de degradación e identificar la posible formación de anilinas durante la remoción de OG, Cai et M en C. Lira Pérez Juana (2021), Cinvestav

al. 2015 empleando polvo de aluminio y ultrasonido identifico la generación de anilina y de algunas estructuras muy similares a la del OG ,tratando de elucidar cual es la ruta de degradación de OG por este método.

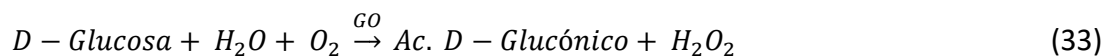
Empleando un ccromatógrafo de líquidos con detector de arreglo de diodos, modelo UltiMate 3000, Thermo Scientific con una columna Spherisorb ODS1 un flujo de 0.8 ml/min, una detección a 475 nm, con barridos de 200-780 nm y un gradiente acetonitrilo/agua de 0 a 40 en 20 min se obtuvo el cromatograma (figura 48) de los posibles productos de degradación de OG empleando biomasa activa de *A. niger*, en el cual se encontraron 7 principales fracciones, en las cuales se identificó el pico característico del propio colorante siendo el pico de mayor tamaño siendo la fracción 6 obtenida a los 7.2 min, a los costados de este pico se detectaron 3 picos de menor tamaño, siendo las fracciones 4 a los 6.42 min, 5 a los 6.72min y 7 a los 7.76 min, identificándolos como los principales posibles productos de degradación; Cai et al. 2015 los identifican con algunas posibles estructuras con apoyo de la estructura inicial de OG , siendo la fracción 7 un producto de una posible desulfonación, y la fracción 4 y 5 productos de una hidroxilación, así como identifica a la fracción 3 como anilina confirmando la posible generación de anilinas durante la degradación de OG, como un metabolito intermediario finalizando como acido húmicos y posteriormente siendo completamente metabolizado.



**Figura 48. Identificación de posibles productos de degradación de OG por *A.niger*.**

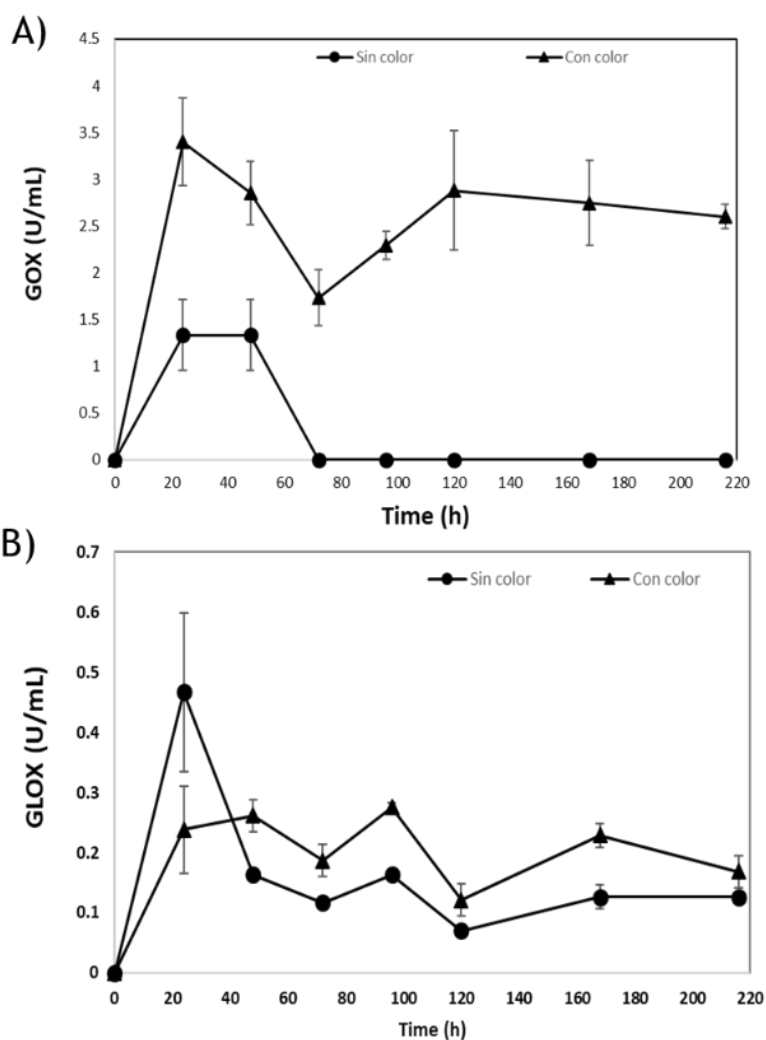
#### 6.14 Actividad enzimática GOX y GLOX durante la degradación de OG por *A. niger*.

Durante la degradación de OG se llevó el seguimiento de la actividad enzimática glucosa oxidasa, GOX y glioxal oxidasa, GLOX de *A. niger* (figura 49). En el caso de la actividad enzimática GOX la cual es una glicoproteína dimerica, su fundamento está directamente con la generación de ac. Glucónico :



Se detecto a las primeras 24h una actividad de 3.4 U/mL en presencia del colorante OG , siendo 2.61 veces mayor que la obtenida de manera constitutiva de la cepa (1.33 U/mL), posteriormente tuvo un decaimiento en la actividad enzimática asta a las 70h el cual coincide

con la reducción del pH en el medio debido a la generación de ácidos orgánicos , una vez que se identifica como la fase de mantenimiento y muerte de la cepa se tuvo un incremento de la actividad manteniéndose en aprox. 2.74 U/mL en el medio, en el caso del control donde se tuvo la ausencia del colorante solo se presentó actividad las primeras 48 h, lo cual nos indicó que se tiene una modificación en el metabolismo y actividad enzimática de GOX con la presencia del colorante teniendo un efecto de promotor o/y inductor.



**Figura 49. Actividad enzimática durante la degradación de OG por *A. niger*.** A) Glucosa oxidasa (GOX) , B) Glioxal Oxidasa (GLOX).

En el caso de la actividad enzimática glioxal oxidasa, GLOX, está involucrada en la oxidación de compuestos hidroxil carbonilos y di carbonilos acoplándolos a la reducción de  $O_2$  a  $H_2O_2$  y su fundamento fue :



Durante la degradación de OG y de manera constitutiva de la cepa se observó un perfil similar de actividad enzimática en los dos medios (con y sin colorante), teniendo un ligero aumento en el sistema con OG , a las 24 h se obtuvo un incremento de 1.96 veces (0.467 U/mL) en presencia de OG en comparación con el control (0.238 U/mL). Posteriormente, se observó un decaimiento en la actividad GLOX , la cual se mantuvo hasta las 220 h. De la misma forma que la GOX se comprobó que la presencia de OG en el metabolismo de *A. niger* , utilizando glucosa como fuente de carbono, genera una modificación en la generación y actividad enzimática , incrementando la actividad de la GLOX.

## 7. CONCLUSIONES

- *Aspergillus niger* tuvo la capacidad de crecer, de esporular en los medios sólidos que contenían naranja G, naranja de metileno, azul turquesa 86 y rosa de bengala, por lo contrario la cepa no presentó una actividad metabólica ni crecimiento en los medios sólidos con verde de malaquita.
- *Trametes versicolor* tuvo la capacidad de crecer, tener generar micelio en los medios sólidos que contenían naranja G, Naranja de metileno y azul turquesa 86.
- La mayor remoción de NG por el hongo fue con 400 mg/L, aunque se sugiere que es posible debido a la sorción del colorante en la biomasa, sin embargo, a 200 mg/L se degradó el NG.
- La eficiencia de la degradación del colorante depende en gran medida de la concentración del colorante, disminuyendo a concentraciones mayores de 400 mg/L
- La MIC de naranja G sobre la cepa de *A. niger* fue de 800 mg/L.
- El hongo *A. niger* decoloró en menor porcentaje (47 % ) una menor concentración de NG (20 mg/L) a 148 rpm, pH 2 por 90 min. Sin embargo, mostró una más alta decoloración (90%) a una alta concentración (450 mg/L) de azul a la cuba a 180 rpm, pH 5 por 142.5 min. Los datos experimentales de la sorción de naranja G en *A. niger* se ajustan a los modelos de Freundlich, Langmuir y Sips.
- *Aspergillus niger* en co-cultivos con hongos basidiomicetos disminuye su producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mientras que *Trametes versicolor* aumenta su actividad enzimática de lacasas en co-cultivos con *Trichoderma*
-

- *A.niger* tiene una mayor afinidad a decolorar los colorantes tipo antraquinonico, la sorción dependen de la estructura química y de los grupos funcionales en los colorantes; Los compuestos estructurales de la pared celular de *A. niger* tienen un rol fundamental en los procesos de sorción de colorantes.



## 8. REFERENCIAS

- Abd El-Rahim, W. and El-Arady, O. (2011). Direct-dyes bioremoval using *Aspergillus niger* in pilot scale bioreactor. *Desalination and Water Treatment*, 25(1-3), 39-46. <https://doi.org/10.5004/dwt.2011.1194>
- Ahuja, D., Bachas, L. and Bhattacharyya, D. (2007). Modified fenton reaction for trichlorophenol dechlorination by enzymatically generated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and gluconic acid chelate. *Chemosphere*, 66, 2193-2200.
- Ali, N., Hameed, A., Ahmed, S., and Khan, A. (2007). Decolorization of structurally different textile dyes by *Aspergillus niger* SA1. *World Journal Of Microbiology And Biotechnology*, 24(7), 1067-1072. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-007-9577-2>
- Al-Qaradawi, S. and Salman, S. (2002). Photocatalytic degradation of methyl orange as a model compound. *Journal Of Photochemistry And Photobiology A: Chemistry*, 148(1-3), 161-168. [http://dx.doi.org/10.1016/s1010-6030\(02\)00086-2](http://dx.doi.org/10.1016/s1010-6030(02)00086-2)
- Alvarez, F., González, C. and Torres, N. (2000). Metabolism of Citric Acid Production by *Aspergillus niger* : Model Definition, Steady-State Analysis and Constrained Optimization of Citric Acid Production Rate. *Biological Industries*, 70(1), 84-108. [https://doi.org/10.1002/1097-0290\(20001005\)70](https://doi.org/10.1002/1097-0290(20001005)70)
- Alves, C., Flores, L., Souza, T., and Betania, M. (2007). Environmental exposure to endocrine disruptors with estrogenic activity and the association with pubertal disorders in children. *Cad. Saúde Pública*, 23(5), 1005-10014. <https://doi.org/10.1590/s0102-311x2007000500003>
- Anastassiadis, S. Y Rehm, H. (2006). Continuous gluconic acid production by the yeast-like *Aureobasidium pullulans* in a cascading operation of two bioreactors. *Appl Microbiol Biotechnol*, 73(3), 541-548. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-006-0499-y>
- Andreozzi, R. (1999). Advanced oxidation processes (AOP) for water purification and recovery. *Catalysis Today*, 53(1), 51-59. [http://dx.doi.org/10.1016/s0920-5861\(99\)00102](http://dx.doi.org/10.1016/s0920-5861(99)00102)
- April, T., Foght, J. and Currah, R. (1999). Hydrocarbon-degrading filamentous fungi isolated from flare pit soils in northern and western Canada. *Can. J. Microbiology*, 46(1), 38-49. <http://dx.doi.org/10.1139/w99-117>
- Aslan, N. (2008). Application of response surface methodology and central composite rotatable design for modeling and optimization of a multi-gravity separator for chromite concentration. *Powder Technology*, 185, 80-86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2007.10.002>

- Attwood, M., van Dijken, J., y Pronk, J. (1991). Glucose metabolism and gluconic acid production by *Acetobacter diazotrophicus*. *Journal Of Fermentation And Bioengineering*, 72(2), 101-105. [http://dx.doi.org/10.1016/0922-338x\(91\)90317-a](http://dx.doi.org/10.1016/0922-338x(91)90317-a)
- Babuponnusami Shin, k., Youn, h., Han, y., Kang, s., y Hah, y. (1993). Purification and characterisation of d-glucose oxidase from white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Eur J Biochem*, 215(3), 747-752. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18088.x>
- Babuponnusami, A. and Muthukumar, K. (2014). A review on Fenton and improvements to the Fenton process for wastewater treatment. *Journal Of Environmental Chemical Engineering*, 2(1), 557-572. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2013.10.011>
- Bagal, M. and Gogate, P. (2014). Wastewater treatment using hybrid treatment schemes based on cavitation and Fenton chemistry: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(1), 1-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.07.009>
- Balabanič, D., Rupnik, M., and Krivograd, A. (2011). Negative impact of endocrine-disrupting compounds on human reproductive health. *Reprod Fertil Dev*, 23(3), 403-16. <http://dx.doi.org/10.1071/RD09300>
- Barrios, L., Gaviria, L., Agudelo, E., y Cardona, S. (2015). Tecnologías para la remoción de colorantes y pigmentos presentes en aguas residuales. *Dyna*, 82(191),118-126. <https://doi.org/10.15446/dyna.v82n191.42924>
- Bianco, B., De Michelis, I., and Vegliò, F. (2011). Fenton treatment of complex industrial wastewater: Optimization of process conditions by surface response method. *Journal Of Hazardous Materials*,186(2-3), 1733-1738. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.12.054>
- Bohlmann, J., Cameselle, C., Nunez, M., and Lema, J. (1998). Oxalic acid production by *Aspergillus niger*. *Bioprocess Engineering*, 19(5), 337-342. doi:10.1007/pl00009022
- Bokare, A. and Choi, W. (2014). Review of iron-free Fenton-like systems for activating in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> advanced oxidation processes. *Journal Of Hazardous Materials*, 275, 121-135. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.04.054>
- Bolong, N., Ismail, A., Salim, M., and Matsuura, T. (2009). A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination*, 239(1-3), 229-246. <http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2008.03.020>
- Cai, M., Su, J., Lian, G., Wei, X., Dong, C., Zhang, H., Jin, M. and Wei, Z. (2016). Sono-advanced Fenton decolorization of azo dye Orange G: Analysis of synergistic effect and mechanisms. *Ultrasonics Sonochemistry*, 31, 193-200. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.12.017>

- Cai, M., Su, J., Zhu, Y., Wei, X., Jin, M., Zhang, H., Dong, C. and Wei, Z. (2016). Decolorization of azo dyes Orange G using hydrodynamic cavitation coupled with heterogeneous Fenton process. *Ultrasonics Sonochemistry*, 28, 302-310. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.08.001>
- Cameselle, C., Bohlmann, J., Núñez, M. and Lema, J. (1998). Oxalic acid production by *Aspergillus niger*. Part I: Influence of sucrose and milk as carbon source. *Bioprocess Engineering*, 19(4), 247-252. <https://doi.org/10.1007/PL00009017>
- Chaari, I., Feki, M., Medhioub, M., bouzid, J., Fakhfakh, E. and Jamoussi, F. (2009). Adsorption of a textile dye “Indanthrene Blue RS (C.I. Vat Blue 4)” from aqueous solutions onto smectite-rich clayey rock. *Journal of Hazardous Materials*, 172(2-3),1623-1628. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.08.035>
- Chang, J., Cañamares, M., Aydin, M., Vetter, W., Schreiner, M., Xu, W. and Lombardi, J. (2009). Surface enhanced Raman spectroscopy of indanthrone and flavanthrone. *Journal Of Raman Spectroscopy*, 40(11), 1557-1563. <http://dx.doi.org/10.1002/jrs.2298>
- Chichizola, C., Scaglia, H., Franconi, C., Ludueña, B. and Ghione, A. (2009). Disruptores endócrinos y el sistema reproductivo. *Revista bioquímica y patología clinica*, 73(3), 9-23. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/651/65121026002.pdf>
- Coelho, A., Castro, A., Dezotti, M. and Sant’Anna, G. (2006). Treatment of petroleum refinery sourwater by advanced oxidation processes. *Journal Of Hazardous Materials*, 137(1), 178-184. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.01.051>
- Cohen, R., Jensen, K., Houtman, C. and Hammel, K. (2002). Significant levels of extracellular reactive oxygen species produced by brown rot basidiomycetes on cellulose. *FEBS Letters*, 531(3), 483-488. [http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)03589-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793(02)03589-5)
- Colak, F., Atar, N. and Olgun, A. (2009). Biosorption of acidic dyes from aqueous solution by *Paenibacillus macerans* kinetic, thermodynamic and equilibrium studies. *Chemical Engineering Journal*, 150, 122-130. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2008.12.010>
- Correia, V., Stephenson, T. and Judd, S. (1994). Characterisation of textile wastewaters - a review. *Environmental Technology*, 15(10), 917-929. <http://dx.doi.org/10.1080/09593339409385500>
- De la Rosa Cruz, N., Sánchez, E. and Ortiz-, Y. (2014). Erratum to: Biosurfactantes y su papel en la biorremediación de suelos contaminados con plaguicidas. *Revista Latinoamericana De Biotecnología Ambiental Y Algal*, 5(2). <http://dx.doi.org/10.7603/s40682-014-0008-4>
- Definitions of a dye and a pigment | Colour Index. (2016). Colour-index.com. Retrieved 5 October 2019, from <http://colour-index.com/definitions-of-a-dye-and-a-pigment>

- Díaz Fonseca, A. (2011). *Identificación de la oxaloacetasa de Talaromyces stipitatus oara la producción de ácido oxálico* (Maestría). Centro de investigaciones y de estudios avanzados del instituto politecnico nacional.
- Dickerson, S. y Gore, A. (2007). Estrogenic environmental endocrine-disrupting chemical effects on reproductive neuroendocrine function and dysfunction across the life cycle. *Rev Endocr Metab Disord*, 8(2), 143-159. <http://dx.doi.org/10.1007/s11154-007-9048-y>
- DOF - Diario Oficial de la Federación. (2016). Dof.gob.mx. Retrieved 11 October 2019, from [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4863829&fecha=06/01/1997](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4863829&fecha=06/01/1997)
- Domenech, X., Wilson, F., and Litter, M. (2004). Procesos avanzados de oxidación para la eliminación de contaminantes. *In eliminación de contaminantes por fotocatalisis heterogénea* (1st ed.). M. A. Blesa y B. Sanchez. Retrieved from [https://www.researchgate.net/profile/Marta\\_Litter/publication/237764122\\_procesos\\_avanzadosde\\_oxidacin\\_para\\_la\\_eliminacin\\_de\\_contaminantes/links/0046352729223ae0fb000000.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Marta_Litter/publication/237764122_procesos_avanzadosde_oxidacin_para_la_eliminacin_de_contaminantes/links/0046352729223ae0fb000000.pdf)
- Durán, A., García, S., Gutiérrez, M., Rigas, F. and Ramírez, R. (2011). Assessment of Fenton's reagent and ozonation as pre-treatments for increasing the biodegradability of aqueous diethanolamine solutions from an oil refinery gas sweetening process. *Journal of Hazardous Materials*, 186(2-3), 1652-1659. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.12.043>
- Dutton, M. and Evans, C. (1996). Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. *Can. J. Microbiol.*, 42(9), 881-895. <http://dx.doi.org/10.1139/m96-114>
- Eaton, A., Clesceri, L., Rice, E., Greenberg, A. and Franson, M. (2005). 3500-Fe. Standard Methods for the examination of water & wastewater 21<sup>st</sup> ed. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Enviroment Federation, Washington DC.
- Ek, M., Gierer, J., Jansbo, K. and Reitberger, T. (1989). Study on the Selectivity of Bleaching with Oxygen- Containing Species. *Holzforchung*, 43(6), 391-396. <http://dx.doi.org/10.1515/hfsg.1989.43.6.391>
- Esplugas, S., Giménez, J., Contreras, S., Pascual, E. and Rodríguez, M. (2002). Comparison of different advanced oxidation processes for phenol degradation. *Water Research*, 36(4), 1034-1042. [http://dx.doi.org/10.1016/s0043-1354\(01\)00301-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0043-1354(01)00301-3)
- Ferreira, A. (2013). Endocrine disruptors in sludge wastewater treatment plants: environmental complications. *Acta Scientiarum. Technology*, 35(2). <http://dx.doi.org/10.4025/actascitechnol.v35i2.10619>

- Fu, Y., and Viraraghavan, T. (2001). Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. *Biosource Technology*, 79(3), 251-262. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00028-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00028-1)
- Fu, Y. and Viraraghavan, T. (2002)a. Dye biosorption sites in *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 82(2), 139-145. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00172-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00172-9)
- Fu, Y. and Viraraghavan, T. (2002)b. Removal of congo red from an aqueous solution by fungus *Aspergillus niger*. *Advances In Enviromental Research*, 7(1), 239-247. [https://doi.org/10.1016/S1093-0191\(01\)00123-X](https://doi.org/10.1016/S1093-0191(01)00123-X)
- Gadea, R., Mundemurra, L., Santos, T., Jiménez, R., and García, A. (2009). Disruptores endocrinos utilizados en la industria textil-confección en España. *Medicina Y Seguridad Del Trabajo*, 55(214). <http://dx.doi.org/10.4321/s0465-546x2009000100010>
- Garzon, R. (2009). Cinética de degradación de colorantes textiles de diferentes clases químicas por hongos y bacterias inmovilizados sobre fibra de Agave tequilana Webber var. Azul (Licenciatura). Pontificia universidad Javeriana.
- Ghosh, P., Samanta, A., and Ray, S. (2010). COD reduction of petrochemical industry wastewater using Fenton's oxidation. *Can. J. Chem. Eng.*, 88(6), 1021-1026. <http://dx.doi.org/10.1002/cjce.20353>
- Gil, M., soto, A., Usma, J. and Gutiérrez, O. (2012). Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción + Limpia*, 7(2), 52-73. . <http://dx.doi.org/10.22507/pml>
- Goel, A. and Lasyal, R. (2015). Degradation of Orange G dye by hexacyanoferrate(III) ions in the presence of Iridium nanoparticles: effect of system parameters and kinetic study. *Desalination and Water Treatment*, 57(37), 17547-17556. <https://doi.org/10.1080/19443994.2015.1086694>
- Goodell, B., Jellison, J., Liu, J., Daniel, G., Paszczynski, A., and Fekete, F. (1997). Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood1This is paper 2084 of the Maine Agricultural and Forest Experiment Station.1. *Journal Of Biotechnology*, 53(2-3), 133-162. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1656\(97\)01681-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1656(97)01681-7)
- Griffin, D. (1996). Fungal physiology. New York: John Wiley And Sons. <https://doi.org/10.1002/jctb.280640118>
- Gusain D., Dubey S., Nath S., Weng C. and Sharma Y. (2016). Studies on optimization of removal of orange G from aqueous by a novel nano adsorbent, nano zirconia. *Journal of industrial and engineering chemistry*, 33(25), 42-50. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2015.08.028>
- Guzman, J. (1996). Decoloración de naranja G por hongos de la pudrición blanca (Maestría). Centro de investigación y de estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

- Hammel, K., Kapich, A., Jensen, K., and Ryan, Z. (2002). Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. *Enzyme And Microbial Technology*, 30(4), 445-453. [http://dx.doi.org/10.1016/s0141-0229\(02\)00011-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0141-0229(02)00011-x)
- Izcapa, C., Loera, O., Tomasini, A., Esparza, F., Salazar, J., Díaz, M., and Rodríguez, R. (2009). Fenton (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe) reaction involved in *Penicillium* sp. culture for DDT [1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane)] degradation. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 44(8), 798-804, <http://dx.doi.org/10.1080/03601230903238368>
- Johnston, I. (1965). The composition of the cell wall of *Aspergillus niger*. *Biochemical Journal*, 96(3), 651-658. <http://dx.doi.org/10.1042/bj0960651>
- Kaksonen, A., Morris, C. Rea, S., Li, J., Wylie, J., Usher, K. Ginige, M., Cheng, K., Hilario, F. and Plessis, C. (2014). Biohydrometallurgical iron oxidation and precipitation: Part1- Effect of pH on process performance. *Hydrometallurgy*, 147-148, 255-263. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2014.04.016>
- Kawai, S., Nakagawa, M., and Ohashi, H. (1999). Aromatic ring cleavage of a non-phenolic β-O-4 lignin model dimer by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. *FEBS Letters*, 446(2-3), 355-358. [http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)00247-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793(99)00247-1)
- Kawai, S., Umezawa, T., Shimada, M., and Higuchi, T. (1988). Aromatic ring cleavage of 4,6-di(tert-butyl)guaiacol, a phenolic lignin model compound, by laccase of *Coriolus versicolor*. *FEBS Letters*, 236(2), 309-311. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(88\)80043-7](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(88)80043-7)
- Kim S., Cho, J., Kim, I., Vanderford, B., & Snyder, S. (2007). Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. *Water Research*, 41(5), 1013-1021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2006.06.034>
- Klassen, N., Marchington, D. and McGowan, H. (1994). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Determination by the I<sup>3</sup>- Method and by KMnO<sub>4</sub> Titration. *Analytical Chemistry*, 66(18), 2921-2925. <http://dx.doi.org/10.1021/ac00090a020>
- Kubicek, C., Schrefler, G., Wohrer, W., and Rohr, M. (1988). Evidence for a Cytoplasmic Pathway of Oxalate Biosynthesis in *Aspergillus niger*. *Applied and environmental microbiology*, 54(3), 633-637.
- Lachheb, H., Puzenat, E., Houas, A., Ksibi, M., Elaloui, E., Guillard, C. and Herrmann, J. (2002). Photocatalytic degradation of various types of dyes (Alizarin S, Crocein Orange G, Methyl Red, Congo Red, Methylene Blue) in water by UV-irradiated titania. *Applied Catalysis B: Environmental*, 39(1), 75-90. [http://dx.doi.org/10.1016/s0926-3373\(02\)00078-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0926-3373(02)00078-4)

- Leitão, A., Duarte, M., and Oliveira, J. (2007). Degradation of phenol by a halotolerant strain of *Penicillium chrysogenum*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 59(3), 220-225. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.09.009>
- Lenz, H., Wunderwald, P. and Eggerer, H. (1976). Partial Purification and Some Properties of Oxalacetase from *Aspergillus niger*. *European Journal of Biochemistry*, 65(1), 225-236. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1976.tb10409.x>
- Life and Work of William Henry Perkin. (1932). *Nature*, 129(3254), 408-408. <http://dx.doi.org/10.1038/129408a0>
- Lu, T., Zhang, Q. and Yao, S. (2016). Efficient decolorization of dye-containing wastewater using mycelial pellets formed of marine-derive *Aspergillus niger*. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 25(3), 330-337. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2016.08.010>
- Mahmoud, M., Mostafa, M., Mohamed, S., Sobhy, N., and Nasr, M. (2017). Bioremediation of red azo dye from aqueous solutions by *Aspergillus niger* strain isolated from textile wastewater. *Journal Of Environmental Chemical Engineering*, 5(1), 547-554. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2016.12.030>
- Mäkelä, M., Galkin, S., Hatakka, A. and Lundell, T. (2002). Production of organic acids and oxalate decarboxylase in lignin-degrading white rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(4), 542-549. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00012-1](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00012-1)
- Mandal, S. and Banerjee, P. (2005). Submerged production of oxalic acid from glucose by immobilized *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, 40(5), 1605-1610. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2004.06.013>
- Mathur, M., Gola, D., Panja, R., Malik, A. and Ahammad, S. (2017). Performance evaluation of two *Aspergillus* spp. for the decolourization of reactive dyes by bioaccumulation and biosorption. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(1), 345-352. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0417-0>
- Merayo, N., Hermosilla, D., Blanco, L., Cortijo, L., and Blanco, Á. (2013). Assessing the application of advanced oxidation processes, and their combination with biological treatment, to effluents from pulp and paper industry. *Journal Of Hazardous Materials*, 262, 420-427. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.09.005>
- Mesquita, A., Guimarães, I., Castro, G., Gonçalves, M., Ramalho, T. and Guerreiro, M. (2016). Boron as a promoter in the goethite ( $\alpha$ -FeOOH) phase: Organic compound degradation by

Fenton reaction. *Applied Catalysis B: Environmental*, 192, 286-295.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.apcatb.2016.03.051>

- Montgomery, D. (2014). *Diseño y análisis de experimentos*. México, D.F.: Limusa.
- Mook, W. (2002). *Isótopos ambientales en el ciclo hidrológico*. Madrid: Publicaciones del instituto geológico y minero de españa.
- Muller, H. (1975). Oxalate accumulation from citrate by *Aspergillus niger*. *Archives Of Microbiology*, 103(1), 185-189. doi:10.1007/bf00436348
- Munir, E., Yoon, J., Tokimatsu, T., Hattori, T. and Shimada, M. (2001). A physiological role for oxalic acid biosynthesis in the wood-rotting basidiomycete *Fomitopsis palustris*. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 98(20), 11126-11130. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.191389598>
- Mustafa, M., Jamal, P., Alkhatib, M., Mahmood, S., Jimat, D. and Ilyas, N. (2017). *Panus tigrinus* as a potential biomass source for Reactive Blue decolorization: Isotherm and kinetic study. *Electronic Journal Of Biotechnology*, 26, 7-11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.12.001>
- Muz, M., Krauss, M., Kutsarova, S., Schulze, T., and Brack, W. (2017). Mutagenicity in Surface Waters: Synergistic Effects of Carboline Alkaloids and Aromatic Amines. *Environmental Science & Technology*, 51(3), 1830-1839. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.6b05468>
- Najib, T., Solgi, M., Farazmand, A., Mohammad, S. and Nasernejad, B. (2017). Optimization of sulfate removal by sulfate reducing bacteria using response surface methodology and heavy metal removal in a sulfidogenic UASB reactor. *Journal Of Environmental Chemical Engineering*, 5, 3256-3265. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2017.06.016>
- Nakagawa, H., Takagi, S. and Maekawa, J. (2016). Fered-Fenton process for the degradation of 1,4-dioxane with an activated carbon electrode: A kinetic model including active radicals. *Chemical Engineering Journal*, 296, 398-405. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2016.03.090>
- Opwis, K., Knittel, D., Schollmeyer, E., Hoferichter, P. and Cordes, A. (2008) Simultaneous application of glucose oxidases and peroxidases in bleaching processes. *Eng Life Sci*, 8(2), 175–178. <https://doi.org/10.1002/elsc.200720237>
- Ordóñez Gálvez, J. (2012). *Cartilla técnica*. Lima: Sociedad Geográfica de Lima.
- Pedersen, H., Hjort, C. and Nielsen, J. (2000). Cloning and characterization of oah , the gene encoding oxaloacetate hydrolase in *Aspergillus niger*. *Molecular And General Genetics MGG*, 263(2), 281-286. <https://doi.org/10.1007/s004380051169>



- Peinado, R., Moreno, J., Maestre, O. and Mauricio, J. (2007). Removing gluconic acid by using different treatments with a *Schizosaccharomyces pombe* mutant: Effect on fermentation byproducts. *Food chemistry*, 104(2),457-465. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.11.070>
- Pel, H., de Winde, J., Archer, D., Dyer, P., Hofmann, G. and Schaap, P. (2007). Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature Biotechnology*, 25(2), 221-231. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1282>
- Pereira, G., El-Ghenymy, A., Thiam, A., Carlesi, C., Eguiluz, K., Salazar-Banda, G. and Brillas, E. (2016). Effective removal of Orange-G azo dye from water by electro-Fenton and photoelectro-Fenton processes using a boron-doped diamond anode. *Separation and Purification Technology*, 160(29), 145-151. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.01.029>
- Pignatello, J., Oliveros, E. and MacKay, A. (2006). Advanced Oxidation Processes for Organic Contaminant Destruction Based on the Fenton Reaction and Related Chemistry. *Critical Reviews In Environmental Science and Technology*, 36(1), 1-84. <http://dx.doi.org/10.1080/10643380500326564>
- Potin, O., Rafin, C. and Veignie, E. (2004). Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54(1), 45-52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2004.01.003>
- Poynton, H. and Vulpe, C. (2009). Ecotoxicogenomics: Emerging Technologies for Emerging Contaminants. *Journal Of The American Water Resources Association*, 45(1), 83-96. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1752-1688.2008.00291.x>
- Pupo, M., Costa, L., Figueiredo, A., Silva, R., Cunha, F., Eguiluz, K. and Salazar-Banda, G. (2013). Photoelectrocatalytic Degradation of Indanthrene Blue Dye using Ti/Ru-Based Electrodes Prepared by a Modified Pechini Method. *Journal Of The Brazilian Chemical Society*. 24(3), 459-472 <http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20130062>
- Qiang M., Qin X., Jun Z. and Cong M. (2015). Decolorization of azo dye orange G by aluminum powder enhanced by ultrasonic irradiation. *Ultrasonic Sonochemistry*, 22,167-173. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.06.023>
- *Quimicos y colorantes*. Retrieved 25 June 2019, from <http://www.quimicosy colorantes.mx>
- Rahim Pouran, S., Abdul Aziz, A. and Wan Daud, W. (2015). Review on the main advances in photo-Fenton oxidation system for recalcitrant wastewaters. *Journal of Industrial And Engineering Chemistry*, 21, 53-69. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiec.2014.05.005>

- Ramachandran, S., Fontanille, P., Pandey, A. and Larroche, C. (2006). Gluconic Acid: Properties, Applications and Microbial Production. *Food Technol. Biotechnol*, 44(2), 185–195.
- Ritschkoff, A., Rättö, M., Buchert, J. and Viikari, L. (1995). Effect of carbon source on the production of oxalic acid and hydrogen peroxide by brown-rot fungus *Poria placenta*. *Journal Of Biotechnology*, 40(3), 179-186. [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1656\(95\)00044-q](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1656(95)00044-q)
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R. and Nigam, P. (2001). Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology*, 77(3), 247-255. [http://dx.doi.org/10.1016/s0960-8524\(00\)00080-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0960-8524(00)00080-8)
- Rodriguez, H., Gonzalez, T., Goire, I. and Bashan, Y. (2004). Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. *Naturwissenschaften*, 91(11), 552-555. <http://dx.doi.org/10.1007/s00114-004-0566-0>
- Rubio-Clemente, A., Torres-Palma, R. and Peñuela, G. (2014). Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous environment by chemical treatments: A review. *Science Of The Total Environment*, 478, 201-225. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.12>
- Ruijter, G., Van de Vondervoort, P. and Visser, J. (1999). Oxalic acid production by *Aspergillus niger*: an oxalate-non-producing mutant produces citric al pH 5 and in the presence of manganese. *Microbiology*, 145(9), 2569-257. <https://doi.org/10.1099/00221287-145-9-2569>
- Sahan, T. and Ozturk, D. (2014). Investigation of Pb (II) adsorption onto pumice samples: application of optimization method based on fractional factorial design and response surface methodology. *Clean Technology Environmental Policy*, 16, 819-831. <http://dx.doi.org/10.1007/s10098-013-0673-8>
- Saini J., Garg V. y Kataria N. (2017). Removal of orange G and Rhodamine B dyes from aqueous system using hydrothermally synthesized zinc oxide loaded activated carbón (ZnO-AC), *Journal of enviromantal chemical engineering*. 5(1), 884-892. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.01.012>
- Seiboth, B., Pakdaman, B., Hartl, L. and Kubicek, C. (2007). Lactose metabolism in filamentous fungi: how to deal with an unknown subtrate. *British Mycological Society*, 21(1), 42-48. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.02.006>
- Shih, L., Ian, L., Chin, T. and Goldstein, A. (1992). Cloning of an *Erwinia herbicola* Gene Necessary for Gluconic Acid Production and Enhanced Mineral Phosphate Solubilization in *Escherichia coli* HB101: Nucleotide Sequence and Probable Involvement in Biosynthesis of the Coenzyme Pyrroloquinoline Quinone. *Journal of bacteriology*, 174(18), 5814-5819. <https://doi.org/10.1128/jb.174.18.5814-5819.1992>

- Shimazono, H. (1955). Oxalic acid decarboxylase, a new enzyme from the mycelium of wood destroying fungi. *The Journal of Biochemistry*, 42(3),321-340.
- Silveira, M., Wisbeck, E., Lemmel, C., Erzinger, G., Lopes da Costa, J., Bertasso, M. and Jonas, R. (1999). Bioconversion of glucose and fructose to sorbitol and gluconic acid by untreated cells of *Zymomonas mobilis*. *Journal Of Biotechnology*, 75(2-3), 99-103. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1656\(99\)00149-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1656(99)00149-2)
- Sirianuntapiboon, S., Chairattawan, K. and Jungphungsukpanich, S. (2006). Some properties of a sequencing batch reactor system for removal of vat dyes. *Bioresource Technology*, 97, 1243-1252. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2005.02.052>
- Srinivasan, A. and Viraraghavan, T. (2010). Decolorization of dye wastewaters by biosorbents: A review. *Journal Of Environmental Management*, 91(10), 1915-1929. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.05.003>
- Teijon, G., Candela, L., Tamoh, K., Molina, A. and Fernández, A. (2010). Occurrence of emerging contaminants, priority substances (2008/105/CE) and heavy metals in treated wastewater and groundwater at Depurbaix facility (Barcelona, Spain). *Science Of The Total Environment*,408(17), 3584-3595. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.04.041>
- Tien, M. and Kirk, T. (1983). Lignin-Degrading Enzyme from the Hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science*, 221(4611), 661-663. <http://dx.doi.org/10.1126/science.221.4611.661>
- Vassilev, N., Fenice, M. and Federici, F. (1996). Rock phosphate solubilization with gluconic acid produced by immobilized *Penicillium variable* P16. *Biotechnol Tech*, 10(8), 585-588. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00157366>
- Vélez Otálvaro, M. (1999). Hidráulica de aguas subterráneas (2nd ed., p. www.bdigital.unal.edu.com). Medellín, Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/4993/#sthash.cM5MTPtP.dpuf>
- Velizarov, S. and Beschkov, V. (1998). Biotransformation of glucose to free gluconic acid by *Gluconobacter oxydans*: substrate and product inhibition situations. *Process Biochemistry*, 33(5), 527-534. [http://dx.doi.org/10.1016/s0032-9592\(98\)00000-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0032-9592(98)00000-4)
- Venkatesha, T. (2012). Kinetics and thermodynamics of reactive and dyes adsorption on MgO nanoparticles. *Chemical Engineering Journal*, 1-10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2012.05.071>

- Vidal, R., Ibañez, G. and Escandar, G. (2016). A green method for the quantification of plastics-derived endocrine disruptors in beverages by chemometrics-assisted liquid chromatography with simultaneous diode array and fluorescent detection. *Talanta*, 159(1), 336-343 <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.06.049>
- Voncina, D. (2003). Reactive dye decolorization using combined ultrasound/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Dyes and Pigments*, 59(2), 173-179. [http://dx.doi.org/10.1016/s0143-7208\(03\)00101-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0143-7208(03)00101-3)
- Vonsonntag, C., Dowideit, P., Fang, X., Mertens, R., Pan, X., Nienschuchmann, M. and Schuchmann, H. (1997). The fate of peroxy radicals in aqueous solution. *Water Science and Technology*, 35(4), 9- 15. [http://dx.doi.org/10.1016/s0273-1223\(97\)00003-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0273-1223(97)00003-6)
- Yang, L., Lübeck, M., Souroullas, K. and Lübeck, P. (2016). Co-consumption of glucose and xylose for organic acid production by *Aspergillus carbonarius* cultivated in wheat straw hydrolysate. *World Journal of Microbiology And Biotechnology*, 32(4). <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-016-2025>
- Yang, P., Shi, W., Wang, H. and Liu, H. (2016). Screening of freshwater fungi for decolorizing multiple synthetic dyes. *Brazilian Journal Of Microbiology*, 47(4), 828-834. doi: 10.1016/j.bjm.2016.06.01
- Zhang R., He Q., Huang Y and Wang X., (2016). Spectroscopic and QM/MM investigations of Chloroperoxidase catalyzed degradation of orange G. *Archives of biochemistry and biophysics*, 596, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.02.026>

## ANEXO 1 Programación en el software SAS (Statistical Analysis System) versión 6.0.

Programación empleada para la comparación de medias LSD, Duncan y Tukey el software SAS (Statistical Analysis System) versión 6.0., fue:

<pre> data qe; input trat qe; cards; 1 36.53 1 40.08 1 42.48 2 93.51 2 87.67 2 81.61 3 106.37 3 104.86 3 111.63 ; proc print; proc anova; class trat; model qe= trat; means trat/Lsd; run; </pre>	<pre> data qe; input trat qe; cards; 1 36.53 1 40.08 1 42.48 2 93.51 2 87.67 2 81.61 3 106.37 3 104.86 3 111.63 ; proc print; proc anova; class trat; model qe= trat; means trat/Duncan; run; </pre>	<pre> data qe; input trat qe; cards; 1 36.53 1 40.08 1 42.48 2 93.51 2 87.67 2 81.61 3 106.37 3 104.86 3 111.63 ; proc print; proc anova; class trat; model qe= trat; means trat/Tukey; run; </pre>	<p>Variables ←</p> <p>Datos experimentales ←</p> <p>Método ←</p>
---	--	---	--

Programación para el Método General Linealizado (GLM) en el software SAS (Statistical Analysis System) versión 6.0.

<pre> data fact; Input trat Color pH rpm Tiempo decol; cards; 1 -1 -1 -1 -1 32.33 1 -1 -1 -1 -1 32.66 1 -1 -1 -1 -1 28.52 2 1 -1 -1 1 28.33 2 1 -1 -1 1 25.31 2 1 -1 -1 1 27.93 3 -1 1 -1 1 18.57 3 -1 1 -1 1 24.44 3 -1 1 -1 1 22.87 ; Proc print; proc glm; class Color pH rpm Tiempo; model decol= Color pH rpm Tiempo; run; </pre>	<p>Variables ←</p> <p>Datos experimentales ←</p> <p>Método ←</p> <p>Variables Independientes ←</p>
--	--

Programación para el Análisis de variancia (ANOVA) / Regresión Lineal en el software SAS  
(Statistical Analysis System) versión 6.0.

<pre> data fact; input trat Color pH rpm Tiempo decol; colph=Color*pH; Colrpm= Color*rpm; colTiem= Color*Tiempo; cards; 1      -1      -1      -1      -1      32.33 1      -1      -1      -1      -1      32.66 1      -1      -1      -1      -1      28.52 2       1      -1      -1      1       28.33 2       1      -1      -1      1       25.31 2       1      -1      -1      1       27.93 3      -1       1      -1      1       18.57 3      -1       1      -1      1       24.44 3      -1       1      -1      1       22.87 ; proc print; proc reg; model decol= Color pH rpm Tiempo Colph Colrpm ColTiem; run; </pre>	<pre> data fact; input trat Color pH rpm Tiempo decol; colph=Color*pH; Colrpm= Color*rpm; colTiem= Color*Tiempo; cards; 1      -1      -1      -1      -1      32.33 1      -1      -1      -1      -1      32.66 1      -1      -1      -1      -1      28.52 2       1      -1      -1      1       28.33 2       1      -1      -1      1       25.31 2       1      -1      -1      1       27.93 3      -1       1      -1      1       18.57 3      -1       1      -1      1       24.44 3      -1       1      -1      1       22.87 ; proc print; proc anova; model decol= Color pH rpm Tiempo Colph Colrpm ColTiem; run; </pre>	<p>Variables ←</p> <p>Interacciones ←</p> <p>Datos experimentales ←</p> <p>Método ←</p>
---	---	---

Programación para determinar la correlación de Pearson y Spearman en el software SAS  
(Statistical Analysis System) versión 6.0.

<pre> data base; input trat deca H2O2 GO; cards; 1      27.44  0.76  0 1      29.17  0.80  0 2      48.97  1.01  0 3      55.22  1.46  12 3      52.20  1.23  8.3 3      45.96  1.10  13 4      60.38  1.25  10 5      51.99  1.61  1.9 4      56.72  1.37  0 ; proc corr Pearson; var deca H2O2 GO; run; </pre>	<pre> data base; input trat deca H2O2 GO; cards; 1      27.44  0.76  0 1      29.17  0.80  0 2      48.97  1.01  0 3      55.22  1.46  12 3      52.20  1.23  8.3 3      45.96  1.10  13 4      60.38  1.25  10 5      51.99  1.61  1.9 4      56.72  1.37  0 ; proc corr Spearman; var deca H2O2 GO; run; </pre>	<p>Variables ←</p> <p>Datos experimentales ←</p> <p>Método ←</p>
--	---	--



THE CONTRIBUTION OF H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> PRODUCED BY *Aspergillus niger* IN VAT BLUE DYE DISCOLORATION: ENHANCEMENT BY A STATISTICAL OPTIMIZATION METHODOLOGY

CONTRIBUCIÓN DEL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> PRODUCIDO POR *Aspergillus niger* EN LA DECOLORACIÓN DE AZUL A LA CUBA: MEJORAMIENTO MEDIANTE UNA METODOLOGÍA DE OPTIMIZACIÓN

J. Lira-Pérez<sup>1</sup>, M.E. Hidalgo-Lara<sup>1</sup>, J. Melendez-Estrada<sup>2</sup>, B.J. González-de Jesus<sup>1</sup> and R. Rodríguez-Vazquez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Depto. Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, A.P. 14-740, Col. Zacatenco, C.P. 07360, Ciudad de México, México.

<sup>2</sup>Escuela Superior de Ingeniería y Arquitectura, Av. Luis Enrique Erro S/N, Unidad Profesional Adolfo López Mateos, Zacatenco, C.P. 07738, Ciudad de México; México.

Received: June 18, 2018; Accepted: July 27, 2018

### Abstract

The dumping of dyes into bodies of water represents an environmental and health problem due to its toxicity. A solution to this problem could be the application of mycorremediation. So, in this work *Aspergillus niger* CDBB-H-175I was investigated in the discoloration (DC) of vat blue dye. A combination of statistical methodologies was applied to optimize DC; initiating with a 2<sup>4-1</sup> fractional factorial design (FFD), to evaluate; dye concentration, exposure time, pH and agitation. Results showed a minimum and maximum DC of 15% and 43%, respectively. By using a first-order model DC increased further to 63%. Additional experiments enhanced DC to 90% in step 7 of a steepest ascent design, and this was improved to 94% at a higher concentration of 521 mg/L with the application of surface response methodology. Of the 63% total DC determined in the first-order model, 28% was attributed to the glucose oxidase activity (1.98 U/mL) and the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced by *A. niger*, and 72% due to physisorption to the cell wall. This is the first report where H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced by *Aspergillus niger* is implicated in dye decoloration.

**Keywords:** *Aspergillus niger*, vat blue, discoloration, hydrogen peroxide, optimization.

### Resumen

El vertimiento de colorantes en cuerpos de agua representa un problema ambiental y de salud, debido a su toxicidad. Una solución a dicho problema podría ser la aplicación de la micorremediación. Por lo que en este trabajo se investigó a *Aspergillus niger* CDBB-H-175 para la decoloración (DC) de azul a la cuba. Para ello, se aplicó una combinación de metodologías estadísticas; iniciando con un diseño factorial fraccionado 2<sup>4-1</sup> (DFF), para evaluar; la concentración del colorante, tiempo de exposición, pH y la agitación. Los resultados mostraron un mínimo y máximo de DC del 15% y 43%, respectivamente. Usando el modelo de primer orden la DC aumentó a 63%. Con la optimización la DC mejoró a 90% en el paso 7 de la metodología de ascenso más pronunciado, un 94% con 521 mg/L de colorante, empleando una metodología de superficie de respuesta. Del 63% DC total, determinado en el modelo de primer orden, el 28% fue atribuido a la actividad de glucosa oxidasa (1.98 U/ml) y al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producidos por *A. niger*, y el 72% fue debido a fisisorción a la pared celular. Este es el primer reporte en el que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido por *Aspergillus niger* está involucrado en la decoloración.

**Palabras clave:** *Aspergillus niger*, azul a la cuba, decoloración, peróxido de hidrógeno, optimización.

## 1 Introduction

Wastewater treatment is currently a priority for reducing environmental pollution. Interest in wastewater treatment from the textile industry has escalated (Hachem *et al.*, 2001; Lopez *et al.*, 2002;

Constapel *et al.*, 2009) because dyes constitute an important class of pollutants due to their toxicities (Pupo *et al.*, 2013; Türgay *et al.*, 2011; Muz *et al.*, 2017). Industrial wastewater becomes colored as an inevitable result of the dyeing processes since approximately 1-20% of the color is discarded (Venkatesha, 2012).

\* Corresponding author. E-mail: rrodrig@cinvestav.mx  
issn-e: 2395-8472



## Effect of fungal co-cultures on ligninolytic enzyme activities, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, and orange G discoloration

Juana Lira-Pérez<sup>a</sup>, Refugio Rodríguez-Vázquez<sup>a</sup>, and Wilberth Chan-Cupul<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, México; <sup>b</sup>Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Colima, Colima, México

### ABSTRACT

In this study, the effects of *Aspergillus niger* in coculture with the basidiomycetes, *Trametes versicolor*, *T. maxima*, and *Ganoderma* spp., were studied to assess H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and laccase (Lac), Lignin Peroxidase (LiP), and manganese peroxidase (MnP) activities. The results indicated that maximum discoloration was of 97%, in the *T. maxima* and *A. niger* coculture, where the concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was 5 mg/L and 6.3 mg/L in cultures without and with dye, respectively. These concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were 1.6- and 1.8-fold higher than monocultures of *T. maxima* (3.37 mg/L) and *A. niger* (3.87 mg/L), respectively. In the same coculture, the LiP and MnP enzyme activities also increased 12-fold, (from 0.08 U/mg to 0.99 U/mg), and 67-fold, (from 0.11 U/mg to 7.4 U/mg), respectively. The Lac activity increased 1.7-fold (from 13.46 U/mg to 24 U/mg). Further, a Box-Behnken experimental design indicated a 1.8-fold increase of MnP activity (from 7.4 U/mg to 13.3 U/mg). In addition, dye discoloration regression model obtained from the Box-Behnken experimental design showed a positively correlation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $R^2 = 0.58$ ) and a negatively correlation with Lac activity ( $R^2 = -0.7$ ).

### KEYWORDS



Dye; hydrogen peroxide; interactions; laccase; manganese peroxidase

### Introduction

White-rot fungi (WRF) have been extensively studied for their ability to produce extracellular secondary metabolites including ligninolytic enzymes (LEs), which are involved in the degradation of lignin and recalcitrant aromatic compounds. LE systems of WRF are mainly comprised of peroxidases such as lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP), laccase (Lac), and versatile peroxidase (VP). In addition, it has been demonstrated that WRF are able to produce hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and other metabolites of low molecular weight.<sup>[1-3]</sup> At present, the application of LE from WRF in biotechnological processes is limited by its low yields and high cost of production using conventional monoculture systems.<sup>[4]</sup>

In recent years, some studies have focused on identifying new biotechnological strategies to improve the production of LE, a promising strategy includes the use of fungal cocultures that can result in an increase in the production of LE, surfactants, and may accelerate the production of secondary metabolites.<sup>[5]</sup> Further, fungal cocultures can be used to generate isoforms of LE with improved biochemical characteristics (active within a broad pH range, increased catalytic activity and enhanced stability). Fungal cocultures produce fungal interactions that are cooperative, synergistic or antagonistic. These interactions have the capacity to facilitate the degradation of substrates and accelerate fungal metabolism.<sup>[2,4-6]</sup>

Cocultures help to identify and develop new molecules of biotechnological value because by taking advantage of synergistic metabolic pathways that are active in strains involved in the coculture system.<sup>[4,6]</sup> Potential strategies employed to use fungal cocultures to enhance the degradation of toxic organic compounds and xenobiotics in the environment include gratuitous degradation via co-metabolism, co-operative catabolism, synergism, multi-phasic kinetics, genetic exchange, biosorption, and bioaccumulation.<sup>[5]</sup> Several cocultures are more efficient with regard to lignocellulolytic biodegradation than others, producing high activity enzymes as a result of synergistic action.<sup>[2]</sup> Similarly, the production of enzymes (MnP and Lac) and the generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> can be used to eliminate toxic organic compounds.<sup>[7-9]</sup> Pan et al.<sup>[10]</sup> reported a 900-fold increase in Lac activity when *Coprinopsis cinerea* and *Gongronella* spp. were cocultured, increase related to active silent Lac genes in the coculture. In addition, 75% of 7 mg/L indigo type dye was removed by the coculture. In work performed by Chan et al.,<sup>[11]</sup> an increase in MnP and Lac activities were demonstrated via the interaction between two WRF, *Pycnoporus sanguineus* and *Trametes versicolor*, and eight different soil-borne micromycetes. It has been verified that the use of fungal cocultures increases the synthesis and enzymatic activity of the ligninolytic system. This greatly enhances the potential of fungi for use in biotechnological applications; therefore, the use of fungal cocultures is both a cost effective and environmentally friendly means to produce

CONTACT Juana Lira Pérez  juanis\_lira@hotmail.com  Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, A.P. 14-740, Col. Zacatenco, CDMX, C.P. 07360, Mexico City, México.

© 2020 Taylor & Francis Group, LLC



## ANEXO 3 Capitulo de libro

**Chapter 4 Bioremediation through redox mechanisms of organic and inorganic toxic pollutants** In Mycoremediation and Environmental Sustainability: Volume 3. IN: MICROBIAL BIOTECHNOLOGY ENVIRONMENTAL REMEDIATION. Editor: Ram Prasad, S. Chandra Nayak, Ravindra Nath Kharwar, Nawal Kishor Dubey. Springer Nature Switzerland AG. Gewerbestrasse 11, 6330 Cham, Switzerland Publisher

Refugio Rodríguez-Vázquez. Department of Biotechnology and Bioengineering. CINVESTAV. Instituto Politécnico Nacional, México. Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508. Col. San Pedro Zacatenco, México D.F. C.P. 07360. México. Email: [rrodrig@cinvestav.mx](mailto:rrodrig@cinvestav.mx).

Edgar Tec-Caamal. Department of Biotechnology and Bioengineering. CINVESTAV. Instituto Politécnico Nacional, México. Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508. Col. San Pedro Zacatenco, México D.F. C.P. 07360. México. Email: [bioetec29@gmail.com](mailto:bioetec29@gmail.com).

Juana Lira-Pérez. Department of Biotechnology and Bioengineering. CINVESTAV. Instituto Politécnico Nacional, México. Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508. Col. San Pedro Zacatenco, México D.F. C.P. 07360. México. [juanis\\_lira@hotmail.com](mailto:juanis_lira@hotmail.com).

Ricardo Aguilar-López. Department of Biotechnology and Bioengineering. CINVESTAV. Instituto Politécnico Nacional, México. Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508. Col. San Pedro Zacatenco, México D.F. C.P. 07360. México. Email: [raguilar@cinvestav.mx](mailto:raguilar@cinvestav.mx).

Adriana de J. Ramírez-Castillo. National Center for Disaster Prevention, Ministry of Interior, México. Email: [Ramirez.castillo1@gmail.com](mailto:Ramirez.castillo1@gmail.com).

\*To whom correspondence should be addressed. E-mail: [rrodrig@cinvestav.mx](mailto:rrodrig@cinvestav.mx).

### ABSTRACT

In this chapter organic and inorganic degradation and transformation through reductive and oxidative (RedOx) mechanisms of basidiomycetes and ascomycetes fungi were investigated. Applications of reductive and oxidative biological reactions are presented for each type of selected pollutant that are representative of toxic organic pollutants; Organochloride pesticides for reductive degradation; benzene and azo dyes for oxidative degradation, and Arsenic (As) as an inorganic compounds model for fungal oxidation transformation. Biodegradation of each type of pollutant by the redox fungal pathway is supported growth and degradation kinetics, by the metabolites and enzymes detected during the bioremediation processes. Lignin Peroxidase (*LiP*) and Manganese peroxidase (*MnP*), as well as Lacasse (*Lac*) enzyme activities were detected only in basidiomycetes cultures of *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, and *Pleurotus ostreatus*, otherwise Glucose Oxidase (*GOx*), an enzyme reported as a hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) producer, that depends on the carbon source, was detected in all fungal cultures. A high correlations (p<0.05) between the enzyme activities, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and organopollutants degradation are reported; as well as their metabolites generated from the respective reductive and oxidative processes, and detected by GS/MS chromatography, and spectroscopy analyses. Among the metabolites are; DDE, DDMU and DDD from the reductive degradation of 2,4'-DDT, and 4,4'-DDT, that degradation (in %) was 68%, 64%, 41% by *Absidia corymbifera*, 74%, 69%, 54% by *Aspergillus niger*, 70%, 76%, 79% by *Penicillium pinophyllum*, and 56%, 67%, 33% by the white rot fungus *T. versicolor*, respectively. In addition to the hydroxylated benzene and azo dyes metabolites, resulted from the oxidative process of degradation. The metabolite, bioscorodite produced under high redox conditions (temperature 90 C and pH 2) from the oxidation of As<sup>+3</sup> and Fe<sup>+2</sup> by *A. niger*, and identified by SEM and X ray diffraction.