



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

DOCTORADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

**Diseño de un consorcio biológico multi-especie para la degradación
de rojo ácido 27**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES

PRESENTA:

JOSÉ ROBERTO GONZÁLEZ REYES

Miembros del Comité:

Dr. César Abelardo González Ramírez (Director)

Dr. Javier Castro Rosas

Dr. Alfredo Madariaga Navarrete

Dr. Roberto Villagómez Ibarra

Mineral de la Reforma, Hidalgo. Noviembre 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

Mineral de la Reforma, Hgo., a 27 de noviembre de 2018

Número de control: ICBI-D/1138/2018
Asunto: Autorización de impresión de tesis.

**M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH**

Por este conducto le comunico que el comité revisor asignado al C. José Roberto González Reyes, alumno del Doctorado en Ciencias Ambientales con número de cuenta 320391, autoriza la impresión del proyecto de tesis titulado "Diseño de un consorcio biológico multi-especie para la degradación de rojo ácido 27" en virtud de que se han efectuado las revisiones y correcciones pertinentes.

A continuación se registran las firmas de conformidad de los integrantes del comité revisor.

PRESIDENTE	Dr. José Roberto Villagómez Ibarra
SECRETARIO	Dr. Alfredo Madariaga Navarrete
VOCAL	Dr. César Abelardo González Ramírez
SUPLENTE	Dr. Javier Castro Rosas

Sin otro particular reitero a Usted la seguridad de mi atenta consideración.

Atentamente
"Amor, Orden y Progreso"

Dr. Oscar Rodolfo Suárez Castillo
Director del ICBI

ORSC/BMM



Oficina del Coordinador
Carretera Panamericana-Tulancingo km 4.5 Ciudad
Delicias, San José de la Matanza, Hidalgo
México C.P. 42154
Teléfono: +52 (771) 71 98 00 ext. 2221
Fax 2319
direccion_icbi@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx

Dedicatoria

A quienes a pesar de las circunstancias se quedan, por quienes después del dilema comprenden y a aquellos que con la mano en el pecho y la mente en el universo decide seguir, aunque la clarividencia llegue tardíamente.

Agradecimiento

- A los profesores investigadores responsables de este trabajo agradezco a sobre manera el tiempo y dedicación.
- Especial agradecimiento a la doctora María de la Luz Hernández Flores y a la Doctora Edith Jiménez Muñoz de quienes aprendí que la amistad y el trabajo en colaboración es elemento fundamental en el trabajo científico.
- A la Dra. Alma Delia Román Gutiérrez, la Dra. Elena María Otazo Sánchez, la Dra. Claudia Romo Gómez y la Dra. Yolanda Marmolejo Santillán de quienes recibí apoyo de tipo académico y administrativo, en forma eficiente y cordial.
- Agradezco profundamente a la Dra. Fabiola Araceli Guzmán Ortiz quien me compartió motivos y razones para dedicar mi tiempo a la ciencia y tecnología, y a quien admiro por su sensibilidad para la labor docente.
- A mi compañera de cubículo la Mtra. Rosario Osti de quien comprendí una visión amplia de la UAEH el rumbo y éxitos de la misma. Por su guía y consejos, muchas gracias.
- Agradezco a la Mtra. Gloria Edith Palacios Almón, directora general del COBAEH, por sus consejos motivadores para concretar las últimas actividades del trabajo de investigación que está plasmado en esta tesis.
- No menos importante es el agradecimiento que hago a mi padre el Sr. Humberto González Benítez y a mi madre la Sra. Juana Reyes Guzmán, por ser mi espacio de paz y equilibrio emocional en todo momento y bajo cualquier circunstancia.
- Mi último agradecimiento es para cada uno de los miembros de Investigación Aplicada para el Bienestar Social y ambiental Asociación Civil, INABISA A.C. por ser una comunidad comprometida con el cuidado del medio ambiente y que apoya esta clase de actividades de investigación.

Tabla de contenido

Resumen.....	10
Abstract.....	11
<i>Capítulo 1</i>	13
<i>Introducción</i>	13
1.1. Introducción	14
1.2. Justificación.....	17
1.3. Objetivo General	19
1.3.1. Objetivos específicos	19
1.4. Hipótesis.....	19
<i>Capítulo 2</i>	20
<i>Antecedentes</i>	20
2.1. Marco teórico	21
2.1.1. Efluentes textiles y su tratamiento	21
2.1.2. Tratamientos fisicoquímicas	25
2.1.3. Tratamientos de base biotecnológica	26
2.1.3.4. Consorcios.....	30
2.1.4. Las lacasas	32
2.1.4.3. Propiedades fisicoquímicas	35
2.1.5. Producción de lacasas fúngicas.....	37
2.1.6. Monocultivos y consorcios en la decoloración/degradación de colorantes	49
2.1.7. Eliminación de colorantes con consorcios	54
2.1.8. Modelos matemáticos	59
2.1.9. Ecuaciones diferenciales y la práctica en la ingeniería.....	64
2.1.10. Métodos numéricos	67
2.1.11. Matlab versión 2017 ^a	74
2.2. Antecedentes	76
<i>Capítulo 3</i>	78

<i>Metodología</i>	78
3.1. Esquema metodológico	79
3.2. Compuestos químicos, reactivos y cepas microbianas.....	80
3.3. Preparación del consorcio	80
3.4. Crecimiento y producción de lacasas en monocultivos y consorcio	80
3.5. Determinación de biomasa	81
3.6. Determinación de glucosa	83
3.6.1. <i>Ricciocarpus natans</i> como fuente de carbono alterna	83
3.7. Determinación de la actividad lacasa	84
3.8. Determinación de AR27.....	84
3.9. Efecto del inóculo bacteriano en la variación de la biomasa fúngica y la actividad lacasa 84	
3.10. Compuestos aromáticos.....	85
3.11. Análisis estadísticos.....	88
3.12. Modelo conceptual	89
3.13. Modelos cinéticos de velocidad de reacción	92
3.14. Modelo matemático del consorcio.....	95
3.15. Parametrización de las ecuaciones de leyes de velocidad	100
3.16. Solución del modelo matemático	101
3.16.1. Empleo de consola de MATLAB.....	101
3.16.2. Empleo de lenguaje Python.....	101
3.16.3. Normalización de ecuaciones.....	103
<i>Capítulo 4</i>	106
<i>Resultados y conclusiones</i>	106
4.1. Preliminares para <i>P. putida</i>	107
4.2. Crecimiento en cultivos puros y consorcio	110
4.3. Consumo de glucosa.....	115
4.3.1. <i>Ricciocarpus natans</i> alternativa como fuente de carbono	118
4.4. Actividad lacasa	123
4.5. Efecto del inóculo bacteriano en la variación de la biomasa fúngica y la actividad lacasa 128	
4.6. Decoloración de AR27	133

4.7. Compuestos aromáticos totales	136
4.8. Modelos matemáticos.....	142
<i>Capítulo 5</i>	153
<i>Conclusiones</i>	153
5.1. Del objetivo particular 1:.....	154
5.2. Del objetivo particular 2:.....	154
5.3. Recomendaciones.....	155
<i>Capítulo 6</i>	156
<i>Referencias y Anexos</i>	156
6.1. Referencias.....	157
6.2. Sumario de ecuaciones.....	172
6.3. Sumario de códigos de programación	173
6.4. Anexos 1: códigos de programación	174
6.5. Anexos 2: publicaciones.....	182
6.5.1. Publicaciones relacionadas con la presente tesis	182

Índice de Figuras

Figura 1. Ejemplos de colorantes azoicos. Tomados de Aspland (1998).	22
Figura 2. Ruta de degradación de AR27 mediante lacasas de <i>T. versicolor</i> , en la que se aprecia como compuestos derivados, naftaleno y benceno. Tomado de Gavril y Hodson (2007).	23
Figura 3. Eliminación por remoción. Se esquematiza el proceso de preparación de una membrana elaborada a base de sulfuro de polifenileno para la remoción de colorantes, tomada de Zhenhuan <i>et al.</i> , (2018).	25
Figura 4. Eliminación por biodegradación. Se muestra el mecanismo de degradación de un colorante azoico sulfonado. La degradación esta mediada por la presencia de la enzima peroxidasa, este ejemplo fue tomado de Goszczynski <i>et al.</i> , (1994).	25
Figura 5. a) Fotografía de la macroalga <i>Chara sp.</i> y b) la planta <i>Aster amellus</i> Linn, la diversidad de los organismos para el tratamiento de colorantes es muy amplia. Tomadas de Ganden World Images.	27
Figura 6. Planta de tratamiento de colorantes a través del uso de bacterias. Tomada de Alibaba.com.	28
Figura 7. Observación vicual de los colorantes Rojo Reactivo 198 (A), Azul Reactivo 21 (B), Azul Reactivo 214 (C) y la mezcla (D) decolorados por <i>P. simplicissimum</i> INCQS 40211 después de 0 días (1), 2 días (2), 5 días (3), 7 días (4) y 14 días (5) de incubación. Tomada de Bergsten-Torralba <i>et al.</i> , (2009).	29
Figura 8. Los consorcios tienen relaciones interespecificas que mejoran un bioproceso. Su acoplamiento enzimático es uno de los mecanismos que usan para lograrlo. Tomada de Baran <i>et al.</i> , (2015).	30
Figura 9. Se muestra la planta y laca del árbol <i>Rhus vernicifera</i> el primer organismo en el que se detectó la presencia de lacasas. Tomada de Aloy (2006).	32
Figura 10. Perfiles cromatograficos de isoformas de lacasas producidas por <i>Pleurotus nebrodensis</i> . La gráfica fue tomada de Yuan <i>et al.</i> , (2016).	33
Figura 11. Estructura molecular de la enzima lacasa de <i>C. máxima</i> a 1.9 de resolución, mostrando tres dominios y la posición de los centros de cobre. Tomada de Lyashenko <i>et al.</i> , (2006).	34
Figura 12. Estructura química de a) ABTS y b) HBT. Tomada de Fciencias y Mindiamart, respectivamente.	35
Figura 13. Sistema se producción de lacasas por fermentación sumergida con agitación magnética. Experimentos en escala laboratorio desarrollados por Thiruchelvam y Ramsay, (2007).	37
Figura 14. Las particularidades del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> le permiten crecer incluso frente a la presencia de selenio (B, C, D, E y F). Tomada de da Silva <i>et al.</i> , (2012).	38

Figura 15. Mecanismo general que muestra en que momento puede participar el mediador. Obsérvese que el mediador es un intermediario para poder oxidar al sustrato, el cual es el compuesto a degradar. Tomado de Cristopher *et al.*, (2014). 43

Figura 16. Hallazgo post muerte de un paciente que cometió suicidio con sulfato de cobre: la imagen muestra la hemorragia y el teñido gris-azul en la mucosa del estómago. Tomado de Meena y Bansal, (2014). 44

Figura 17. Principales mecanismos en la inducción de AEL en consorcios..... 45

Figura 18. Ruta metabólica para la descomposición del colorante RO107 a través de la electro-oxidación (decoloración) y biodegradación (reducción máxima del colorante) (Aravind *et al.*, 2016). 49

Figura 19. Ejemplos de hongos filamentosos inmovilizados en diferentes soportes: a) *T. versicolor* inmovilizado en espuma de poliuretano, b) pellets de *P. chysosporium* inmovilizado en alginato de calcio y c) pallets de *A. niger* inmovilizado en sol-gel. Tomado de Martínez y García, (2012). 51

Figura 20. Dinámica de crecimiento microbiano en la degradación de rojo ácido 27. Tomado de Chan *et al.*, (2012). 56

Figura 21. Un diagrama de interacción. La especie molecular A y B se une reversiblemente para formar una molécula compleja. Esta compleja inhibe la velocidad a la cual la molécula de la especie C es convertida a la especie D. (La flecha incompleta indica inhibición y represión. La línea punteada significa que se trata de interacción regulatoria en la que el complejo no se consume) (Brian, 2012). 59

Figura 22. Relaciones no lineales comunes en los procesos biológicos. A. Saturación hiperbólica. B. Comportamiento sigmoideal. 63

Figura 23. Ilustración gráfica del método de paso. 68

Figura 24. Método de Euler. 68

Figura 25. Representación gráfica del método de Heun. a) predictor y b) corrector. 69

Figura 26. Representación gráfica de las pendientes estimadas empleadas en el método de RK de cuarto orden. 73

Figura 27. Esquema general de la metodología seguida en el presente estudio. 79

Figura 28. Componentes que pertenecen al sistema biológico de un consorcio constituido por dos microorganismos, en el que sus productos metabólicos, promueve la simbiosis del sistema.91

Figura 29. Logotipo comercial de la plataforma Python. 102

Figura 30. Producción de compuestos fluorescentes. 1) Agar *Pseudomonas* P bajo luz blanca: a) *P. aeruginosa*, b) bacteria desconocida amarilla Gram (+) (control negativo), c) cepa crecida en agar *Pseudomonas*, e) cepa a identificar. 2) Agar *Pseudomonas* F, 3) Agar *Pseudomonas* P.... 108

Figura 31. Crecimiento de *P. putida* en caldo de soya tripticaseína. 109

Figura 32. Perfiles de crecimiento a) fúngico y del consorcio con y sin AR27 y b) bacteriano con y sin AR27. 111

Figura 33. Crecimiento de <i>P. putida</i> en el cultivo en consorcio con AR27.	112
Figura 34. Consumo de glucosa para a) los cultivos de <i>T. versicolor</i> con y sin AR27 y b) los cultivos del consorcio con y sin AR27	116
Figura 35. Consumo de glucosa con monocultivos bacterianos en presencia y ausencia de AR27.	116
Figura 36. Glucosa detectada en co-cultivo de <i>R. natans</i> con <i>T. versicolor</i>	120
Figura 37. Producción de actividad lacasa del co-cultivo hongo planta.....	121
Figura 38. a) Evolución de la actividad lacasa en consorcio con y sin AR27.	123
Figura 39. Efecto de la concentración del inóculo fúngico en la actividad lacasa, glucosa residual, contenido de AR27 y decoloración.	126
Figura 40. Masa de <i>T. versicolor</i> , glucosa residual y actividad lacasa medida en sistemas con concentración del inóculo bacteriano desde 0.0345 hasta 0.315 $g\ l^{-1}$. Los valores con asterisco refieren al inóculo bacteriano lavado.	129
Figura 41. Disminución de la concentración de AR27 en monocultivo y consorcio.	133
Figura 42. Línea de calibración para benceno en GC-FID.....	137
Figura 43. Cromatograma que muestra los tiempos de retención de los compuestos aromáticos estudiados como posibles metabolitos en la degradación de AR27	137
Figura 44. Cronogramas para muestras de <i>T. versicolor</i> con AR27 a diferentes tiempos del bioproceso (círculos azules, tiempo en horas).	139
Figura 45. Datos experimentales en comparación con modelos matemáticos para el sistema de <i>Pseudomonas putida</i> sin AR27, con parámetros: a) obtenidos por métodos algebraicos de linealización y b) ajustados en la solución del modelo. MATLAB.	143
Figura 46. Datos experimentales en comparación con modelos matemáticos para el sistema de <i>Pseudomonas putida</i> sin AR27, con parámetros optimizados con Python.....	145
Figura 47. Evolución del error para cada ecuación y para el valor global en el sistema de ecuaciones diferenciales para <i>Pseudomonas putida</i> sin AR27.	146

Índice de Tablas

Tabla 1. Grado de fijación estimado para diferentes colorantes y fibras y su pérdida en el efluente. Tomado de O'Neill <i>et al.</i> , (1999).....	21
Tabla 2. Factores que intervienen en la producción de lacasas.	41
Tabla 3. Estudios de decoloración y biodegradación de colorantes a través de monocultivos y consorcios	52
Tabla 4. Ejemplos de las leyes fundamentales que se describen en términos de la razón de cambio de variables (t=tiempo y x=posición).....	65
Tabla 5. Deducción de los métodos de Runge Kutta de segundo orden.....	71
Tabla 6. Concentración de colorante AR27, pH y tiempo de cultivo.	81
Tabla 7. Método para separación de biomasa del consorcio.	82
Tabla 8. Subproductos en la transformación biológica y fisicoquímica del AR27.	86
Tabla 9. Componentes en el sistema biológico en consorcio durante la decoloración de AR27.	89
Tabla 10. Resumen de leyes de velocidad por componente de sistema <i>T.versicolor/P.putida</i>	93
Tabla 11. Arreglos para la normalización de ecuaciones.	103
Tabla 12. Cultivos para el mantenimiento de <i>P. putida</i>	107
Tabla 13. Caracterización bioquímica para <i>Pseudomonas putida</i> y pruebas de producción de colorantes fluorescentes en medios selectivos para <i>Pseudomonas</i>	108
Tabla 14. Cantidades máximas de biomasa, actividad lacasa y concentración de glucosa residual en monocultivos y consorcios. Las letras superíndices representan la diferencia significativa entre los experimentos.	114
Tabla 15. Aspecto de planta y hongo después de 376 h	119
Tabla 16. Producción de biomasa fúngica y variación de la actividad de lacasa en cultivos fúngicos sembrados con diferente tipo y concentración de inóculo bacteriano.....	128
Tabla 17. Comparación de la producción de actividad lacasa del presente estudio con datos de la literatura	131
Tabla 18. Ecuaciones de las líneas rectas de las curvas de calibración para los CAT.....	136
Tabla 19. Extracción de datos del GC-FID y su respectivo equivalente en gl^{-1} de acuerdo con las gráficas estándar.....	138
Tabla 20. Condiciones iniciales en la solución de los modelos matemáticos.....	142
Tabla 21. Parámetros cinéticos en monocultivos y consorcios de <i>T. versicolor</i> y <i>P. putida</i>	147
Tabla 22. Parámetros cinéticos en monocultivos de <i>P. putida</i>	147
Tabla 23. Parámetros cinéticos en monocultivos y consorcios de <i>T. versicolor</i>	149

Resumen

Las tecnologías biológicas para la eliminación de colorantes que contienen los efluentes textiles están en constante desarrollo, gracias a las ventajas que presentan en relación a la protección del medio ambiente. En este trabajo, se estudió una alternativa para la eliminación del colorante AR27, un compuesto altamente carcinogénico, a través del consorcio conformado por la bacteria *Pseudomonas putida* y el hongo *Trametes versicolor*. Para estudiar el diseño del consorcio se evaluó el crecimiento de ambos organismos, la actividad lacasa que genera el hongo, la concentración de glucosa y la concentración del colorante AR27, estas cinco variables durante el tiempo en que los microorganismos alcanzaron sus máximos de crecimiento en cultivos líquidos bajo condiciones de laboratorio. Para evitar problemas técnicos de muerte celular y para mejorar el desarrollo del consorcio, también se evaluó el efecto de la concentración inicial tanto del hongo como de la bacteria que se utilizaron para inocular los cultivos líquidos del consorcio. Se propusieron dos esquemas de experimentación para reforzar las condiciones de funcionamiento del consorcio, el primero, fue estudiar los productos derivados de la decoloración del AR27 generados mediante el consorcio y el segundo, fue revisar la posibilidad de incorporar una planta acuática en el consorcio como proveedor de una fuente de carbono, con la finalidad de minimizar los costos de operación. Los resultados indicaron que la interacción de *Trametes versicolor* y *Pseudomonas putida* mejoran el desarrollo del crecimiento de ambos organismos, la actividad lacasa aumenta significativamente y se mejoran las condiciones de decoloración del AR27. Fue posible resolver problemas técnicos de muerte celular tanto de bacterias como de hongos al encontrar la mejor relación de biomasa fúngica y bacteriana, misma que aumentaron la actividad lacasa. Se verificó que cinco de los compuestos reportados en literatura como derivados de la degradación de AR27, no estuvieron presentes en la eliminación de AR27 mediante el consorcio aquí estudiado. Respecto a la estrategia de usar una planta como proveedor de sustratos para el crecimiento del consorcio, se encontró que *Ricciocarpus natans* no tuvo una respuesta favorable en su desarrollo, bajo las condiciones estudiadas, mismas que no pueden ser cambiadas debido a que son las que condicionan al consorcio a la eliminación del colorante. Finalmente el consorcio fue descrito a través de un modelo matemático no estructurado y determinista, mediante el cual

se obtuvieron parámetros de velocidades de reacción de acuerdo con los modelos de Monod, Luedeking-Piret y Michaelis-Menten, los parámetros fueron útiles para describir al consorcio en términos de crecimiento y eliminación del AR27. En conclusión se generaron bases técnicas para el uso de un consorcio como alternativa innovadora en el tratamiento de colorantes. Se resalta que el consorcio propuesto aquí no está reportado en la literatura.

Palabras clave: consorcio biológico, decoloración, rojo ácido 27, actividad lacasa

Abstract

The biological technologies for the elimination of dyes containing textile effluents are in constant development, due to the advantages they have in relation to the environment protection. In this work, an alternative for AR27 dye elimination, a highly carcinogenic compound, was studied through the consortium formed by the bacterium *Pseudomonas putida* and the fungus *Trametes versicolor*. To study the consortium design, the growth of both organisms, the laccase activity that generates the fungus, the concentration of glucose and the concentration of the AR27 dye were evaluated, these five variables during the time in which the microorganisms reached their maximum growth. To avoid technical problems of cell death and to improve the development of the consortium, the effect of the initial concentration of fungus and bacteria that were used to inoculate the liquid cultures of the consortium was evaluated. Also, two experimental schemes were proposed to reinforce the operating conditions of the consortium, the first was to study the products derived from the discoloration of the AR27 generated by the consortium and the second was to review the possibility of incorporating a water plant in the consortium as a supplier from a carbon source, in order to minimize operating costs. The results indicated that the interaction of *Trametes versicolor* and *Pseudomonas putida* improves the development of the growth of both organisms, the laccase activity increases significantly and the discoloration conditions of the AR27 are improved. It was possible to solve technical problems of cell death of both bacteria and fungi by finding the best ratio of fungal and bacterial biomass, which increased laccase activity. It was verified that five of the compounds reported in literature as derivatives of the degradation of AR27 were not present in the elimination of AR27 by the consortium studied here. Regarding the strategy of using a plant as a supplier of substrates for

the growth of the consortium, it was found that *Ricciocarpus natans* did not have a favorable response in its development, under the conditions studied, which cannot be changed because they are the ones that condition to the consortium to the elimination of the dye. Finally, the consortium was described through an unstructured and deterministic mathematical model, through which parameters of reaction rates were obtained according to the models of Monod, Luedeking-Piret Palabras clave: consorcio biológico, decoloración, rojo ácido 27, actividad lacasa and Michaelis-Menten, the parameters were useful to describe the consortium in terms of growth and elimination of AR27. In conclusion, technical bases were generated for the use of a consortium as an innovative alternative in the treatment of dyes. It is highlighted that the consortium proposed here is not reported in the literature.

Keywords: biological consortium, discoloration, acid red 27, laccase activity

Capítulo 1

Introducción

1.1. Introducción

Las legislaciones en materia de tratamiento de efluentes textiles que son la referencia para México (Lezama y Graizbord, 2010), tales como las de la Unión Europea y las de Estados Unidos, han motivado investigaciones para el mejoramiento de tratamientos que minimicen el efecto negativo hacia el medio ambiente, tanto de los contaminantes como de los procesos para eliminar los contaminantes (Robinson *et al.*, 2000). A pesar de la amplia disponibilidad de tratamientos fisicoquímicos para remediación agua contaminada con colorantes, los tratamientos biotecnológicos ofrecen una nueva alternativa (Cattoor, 2007; Boyter, 2007), que es considerada como “amigable con el medio ambiente”, evitando el uso de sustancias o procesos que pueden provocar contaminación secundaria (Robinson *et al.*, 2000).

Los tratamientos biotecnológicos se basan en las propiedades de los vegetales (Khandare *et al.*, 2011), líquenes (Kulkarni *et al.*, 2014), algas (Daneshvar *et al.*, 2007), bacterias (Garg *et al.*, 2012), hongos (Gavril y Hodson, 2007), consorcios bacterianos (Lade *et al.*, 2012; Pandey *et al.*, 2007), para producir sustancias que transforman a los colorantes en compuestos inocuos (Garcés y Peñuela, 2006). Entre las sustancias más comunes implicadas en la transformación de colorantes están las enzimas lacasas (Rivera-Hoyos *et al.*, 2013). Resultan en la literatura científica por sus efectos benéficos para el medio ambiente y su aplicación en procesos industriales (Dwivedi *et al.*, 2011).

Para mejorar la producción de lacasas se utilizan compuestos denominados como mediadores e inductores (Manavalan *et al.*, 2013), todos ellos provenientes de la síntesis química (Bourbonnais *et al.*, 1997) o de la transformación de productos naturales (Cañas *et Camarero*, 2010). También existe una opción biológica que consiste en combinar microorganismos para formar consorcios (Mann *et al.*, 2015), los cuales aumentan significativamente la producción de lacasas (Hailei *et al.*, 2009). Los consorcios mejoran sus productividades enzimáticas gracias a que la interacción entre microorganismos causa cambios en: a) los patrones y niveles de expresión enzimática, demostrado a partir de la generación de nuevas isoformas de lacasas (Rivera-Hoyos *et al.*, 2013), la disminución de la susceptibilidad a la contaminación biológica, causada por microorganismos ajenos al consorcio que no participan activamente en la eliminación del colorante (Lu *et al.*,

2009), c) el aumento de la resistencia del consorcio a las condiciones abióticas altamente tóxicas de los efluentes textiles (O'Neill *et al.*, 1999), entre otros.

Los consorcios naturales fueron los primeros sistemas de estudio en la producción de lacasas y en la eliminación de colorantes, porque eran aislados del mismo efluente contaminado, el cual mediante condiciones óptimas en laboratorio se conseguía aumentar su biomasa y su vitalidad (Zhang *et al.*, 2017). Pese a las múltiples ventajas de los consorcios naturales (Zhang *et al.*, 2017), se dificulta el control de su crecimiento y de sus propiedades como degradadores (Nadell *et al.*, 2010). Teniendo como desventaja que algunos miembros del consorcio no participan en la eliminación de los colorantes (Cui *et al.*, 2012). Es por lo anterior, que se ha propuesto diseñar los consorcios a la medida del problema de contaminación de efluentes textiles (Wang *et al.*, 2015).

El diseño de un consorcio implica conocer las condiciones de crecimiento que beneficien a sus miembros, tomando en cuenta que cada uno tiene requerimientos diferentes (Sánchez *et al.*, 2013). El análisis a detalle de las características de los consorcios que cambian al momento de adaptarse a condiciones de crecimiento estándar para todos los miembros, requeriría de la determinación de un número elevado de variables y la elevada inversión de tiempo y dinero (Mazzucotelli *et al.*, 2014).

Ante este escenario, conviene recurrir a los análisis cinéticos que proporcionan información sobre el patrón de crecimiento (Tišma *et al.*, 2010), producción de metabolitos (Casas *et al.*, 2013), consumo de sustratos (Abuhamed *et al.*, 2004), entre otros. Los modelos cinéticos se apoyan de parámetros ampliamente descritos en la literatura (Thiruchelvam *et al.*, 2007), que pueden dar una idea general de la evolución de un proceso bajo diferentes condiciones de estudio (Casas *et al.*, 2013). En este sentido creemos que los parámetros de las ecuaciones cinéticas de Monod (Basu *et al.*, 2006) (para el crecimiento), el consumo de sustrato, Luedeking-Piret (Saat *et al.*, 2013) (para la producción de enzimas) y las reacciones enzimáticas a través del modelo cinético de Michaelis-Menten (Cristóvão *et al.*, 2009) (para la decoloración), pueden proporcionar datos que permitan describir el comportamiento de un consorcio.

El consorcio formado entre *T. versicolor* como productor de enzima que decoloran azo-compuestos colorantes (Gavril y Hodson, 2007) y a *P. putida* como degradador de compuestos

aromáticos (Basu *et al.*, 2006) (Imagen 1) no se ha estudiado para la producción de enzimas decolorantes ni la eliminación de colorantes.

En esta tesis se describe un marco conceptual que apoya la metodología para evaluar un consorcio formado por *T. versicolor* y *P. putida* en relación a su crecimiento, la producción enzimática y la decoloración de un colorante azoico modelo, el rojo ácido 27, proponiendo describir el mecanismo de decoloración y de producción de lacasas mediante parámetros determinados de modelos cinéticos.

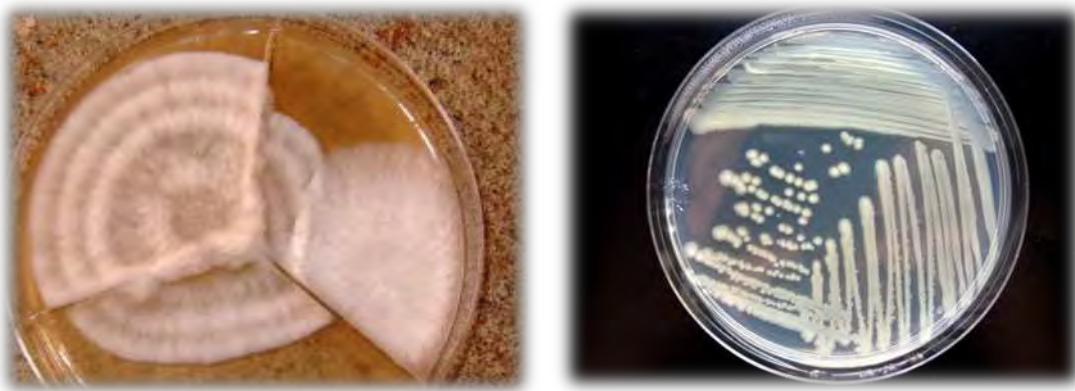


Imagen 1. Fotografías de etapas microscópicas de *Trametes versicolor* y *Pseudomonas putida*. Tomadas de Štítnický, (2008-2017) y Universidad de Salamanca, respectivamente.

1.2. Justificación

Por el tipo de contaminante y su persistencia, los efluentes de la industria textil representan un reto para los desarrolladores de tecnologías en la eliminar compuestos tóxicos. La afectación a la salud pública por la presencia de contaminantes textiles en el agua está documentada, y se debe principalmente a la estabilidad y composición química de los colorantes, pues en principio se sintetizan altamente estables para no ser transformados en los procesos de la industria textil. La composición química altamente estable de los colorantes los hace difíciles de remover, degradar y biodegradar.

Los estudios sobre la eliminación del colorante se basaron en la decoloración es decir en la eliminación del grupo cromóforo del colorante, no obstante más tarde se notificó que la decoloración no garantizaba la disminución de la toxicidad. La disminución tóxica de los efluentes se logra con mayor frecuencia en procesos donde los colorantes son degradados o biodegradados.

A pesar de que degradación microbiana es prometedora para la eliminación de la toxicidad de los efluentes textiles, existe el problema de la falta de adaptación microbiana o de disminución de la estabilidad de los metabolitos microbianos, en los efluentes contaminados. En este punto, vale la pena resaltar que con frecuencia se encuentran en la naturaleza ejemplos de asociaciones entre microorganismos, también conocidas como consorcios, que facilitan la adaptación a las condiciones abióticas del ecosistema y en consecuencia la sobrevivencia es mejor para cada uno de los organismos que forman parte del sistema. En la degradación de compuestos tóxicos se ha notificado la participación de consorcios microbianos conformados por una amplia diversidad de especies, cada una de estas especies tiene participaciones diferentes las cuales en general contribuyen en la degradación completa del compuesto tóxico.

En muchos estudios sobre consorcios biológicos no se conoce la identidad de sus miembros, la naturaleza de sus interacciones, el tipo de mecanismo de transformación del colorante y la naturaleza de los metabolitos generados que promueven la participación colaborativa. El desconocimiento de las variables antes mencionadas dificulta el control de las reacciones del

consorcio y en el sentido de aplicación dificulta su uso en los sistemas de tratamiento de agua residual de escala real.

Se habla sobre los consorcios diseñados como una alternativa para tener el conocimiento sobre la identidad de sus miembros, la naturaleza de sus interacciones y el conocimiento de los mecanismos que emplea para la transformación de ciertos contaminantes, por lo tanto son una opción para resolver los problemas de contaminación de efluentes textiles.

Un caso particular es el consorcio conformado por la bacteria *Pseudomonas putida* y el hongo *Trametes versicolor*, mismos que no se han reportado como un consorcio para la degradación de colorantes. La razón por la que se proponen como un consorcio, está relacionada con sus características particulares, a saber: el *Trametes versicolor* produce la decoloración de ciertos compuestos colorantes, con la consecuente generación de metabolitos que pueden ser tóxicos. Aunque estos derivados de los colorantes podrían ser un sustrato para otra clase de microorganismos. Por otro lado *Pseudomonas putida* consume compuestos aromáticos recalcitrantes. Es probable que los compuestos que genera el hongo sean una fuente de carbono asequible para la bacteria y que la bacteria puede aportar alguna clase de sustancias que mejore el proceso de eliminación de colorantes. El estudio del consorcio biológico multiespecie para la degradación de rojo ácido 27 responde a la necesidad de alternativas de sistemas biológicos para la degradación de colorantes.

1.3. Objetivo General

Diseñar un consorcio biológico multi-especie conformado por *Trametes versicolor* y *Pseudomonas putida*, usando análisis cinéticos, durante la degradación de rojo ácido 27.

1.3.1. Objetivos específicos

- Realizar el análisis cinético y determinar parámetros de crecimiento, consumo, mantenimiento y productividad en sistema por lote con *Pseudomonas putida* y *Trametes versicolor*, usando glucosa y/o rojo ácido 27, en cultivos aislados y mixtos.
- Proponer un modelo matemático que contemple las interacciones metabólicas del consorcio: *Trametes versicolor* y *Pseudomonas putida*, en cuanto al crecimiento, consumo, mantenimiento y productividad durante la decoloración del colorante rojo ácido 27.

1.4. Hipótesis

El consorcio multiespecie conformado por *Trametes versicolor* y *Pseudomonas putida* como sistema para el tratamiento de efluentes textiles, mejora la eliminación del colorante rojo ácido 27 en cultivos líquidos estudiados a nivel laboratorio. El crecimiento de consorcio debe sus mejoras en la eliminación del rojo ácido 27 a las aportaciones de ambos organismos lo cual se refleja en el aumento de la actividad enzimática y en ritmo de crecimiento de los microorganismos. A través de un modelo no estructurado se describe el crecimiento, el consumo de sustratos y la producción de enzimas del consorcio de *Trametes versicolor* y *Pseudomonas putida* durante la decoloración de rojo ácido 27.

Capítulo 2

Antecedentes

2.1. Marco teórico

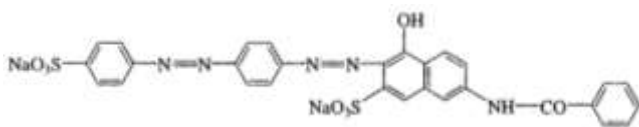
2.1.1. Efluentes textiles y su tratamiento

La industria textil tiene un impacto negativo en el medio ambiente debido al elevado consumo de agua subterránea y al nivel de contaminación implícito en sus efluentes (Robinson *et al.*, 2000). Por un lado, el consumo de agua es de alrededor de 80-100 m³ por tonelada de textiles acabados, y por otro lado el agua residual tiene alrededor de 115-175 kg DQO (Demanda Química de Oxígeno) por tonelada de textil acabado (Savin y Butnaru, 2008), lo que lo convierte en un severo problema a nivel mundial. Como ejemplo se ha reportado que la industria textil ha sido uno de los principales contribuyentes a la contaminación del agua en todo el mundo, causando más del 20% de los niveles registrados de contaminación del agua en países como Turquía, Indonesia y China (entre el grupo de países del G20) y también en Rumania y Bulgaria (en el área de Europa Oriental), con más del 44% en Macedonia (Paraschiv *et al.*, 2015).

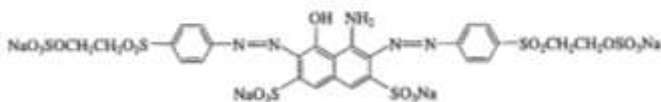
Tabla 1. Grado de fijación estimado para diferentes colorantes y fibras y su pérdida en el efluente. Tomado de O'Neill *et al.*, (1999).

Clase de aplicación del colorante	Fibra	Grado de fijación (%)	Perdida en el efluente (%)
Ácido	Poliamida	89 a 95	5 a 20
Básico	Acrílico	95 a 100	0 a 5
Directo	Celulosa	70 a 95	5 a 30
Disperso	Poliéster	90 a 100	0 a 10
Complejo-metales	Lana	90 a 98	2 a 10
Reactivo	Celulosa	50 a 90	10 a 50
Azufre	Celulosa	60 a 90	10 a 40
Vat	Celulosa	80 a 95	5 a 20

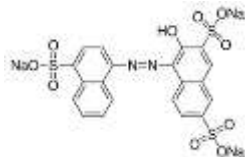
La principal fuente de contaminación de las aguas residuales textiles proviene de los procesos de teñido y acabado; en donde se incorporan compuestos químicos y colorantes (Savin y Butnaru, 2008), que al no adherirse a los materiales textiles se transportan hasta el efluente, generando una intensa coloración, asociada a fluctuaciones del pH inadecuadas para la flora y fauna que entran en contacto con el efluente (Bayramoglu *et al.*, 2004). Dependiendo de la naturaleza de la fibra a teñir y la estructura química del colorante, se puede perder hasta el 40% del colorante en el efluente, tal como sucede para las fibras hechas a base de celulosa (O'Neill *et al.*, 1999) (**Tabla**).



Rojo directo 81: Estructura de un colorante azoico directo. Se conocen como directo debido a la facilidad de su aplicación.



Negro reactivo 5: Estructura de un colorante azoico reactivo. El colorante reacciona con los grupos funcionales hidroxilo presentes en las fibras textiles de celulosa.



Rojo ácido 27: Debido a que la parte coloreada de la molécula de colorante ácido es aniónica, son atraídos a grupos catiónicos, principalmente los grupos amonio, $-NH_3^+$, dentro de las fibras de lana, seda y nylon.

Figura 1. Ejemplos de colorantes azoicos. Tomados de Aspland (1998).

Se ha reportado que más de 80 000 toneladas de colorantes son producidos anualmente a nivel mundial, de los cuales entre 60 y 70% son de tipo azoico (Mansour *et al.*, 2007). Los azo colorantes causan inhibición de la fotosíntesis acuática, la reducción del oxígeno disuelto, toxicidad a la flora, fauna y a los humanos (Slokar y Marechal, 1998). Algunos colorantes azoicos pertenecen a la categoría 3, definida como contaminantes carcinogénicos, de acuerdo con la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (Wang *et al.*, 2010). Las propiedades de los colorantes azoicos que le permiten tener altos grados de estabilidad química, biológica y fotocatalítica (Chung y Cerniglia, 1992), se deben a la presencia de uno o más enlaces azo (-

N=N-), anillos aromáticos y grupos sulfónicos (Almeida y Corso, 2014) (**Figura 1**). La presencia de grupos sulfónicos u otro tipo de grupos aceptores de electrones, deja deficiente de electrones a los enlaces azoicos, lo que les confiere una elevada estabilidad (Solís *et al.*, 2012).

Un problema asociado a los efluentes textiles es que los colorantes pueden ser transformados por los microorganismos autóctonos del sitio contaminado a compuestos de aminas aromáticas sulfonadas, derivados de fenol o del naftaleno (Pandey *et al.*, 2007), los cuales representan un riesgo para la salud pública, incluso superior a los colorantes de los que provienen (Mansour *et al.*, 2007).

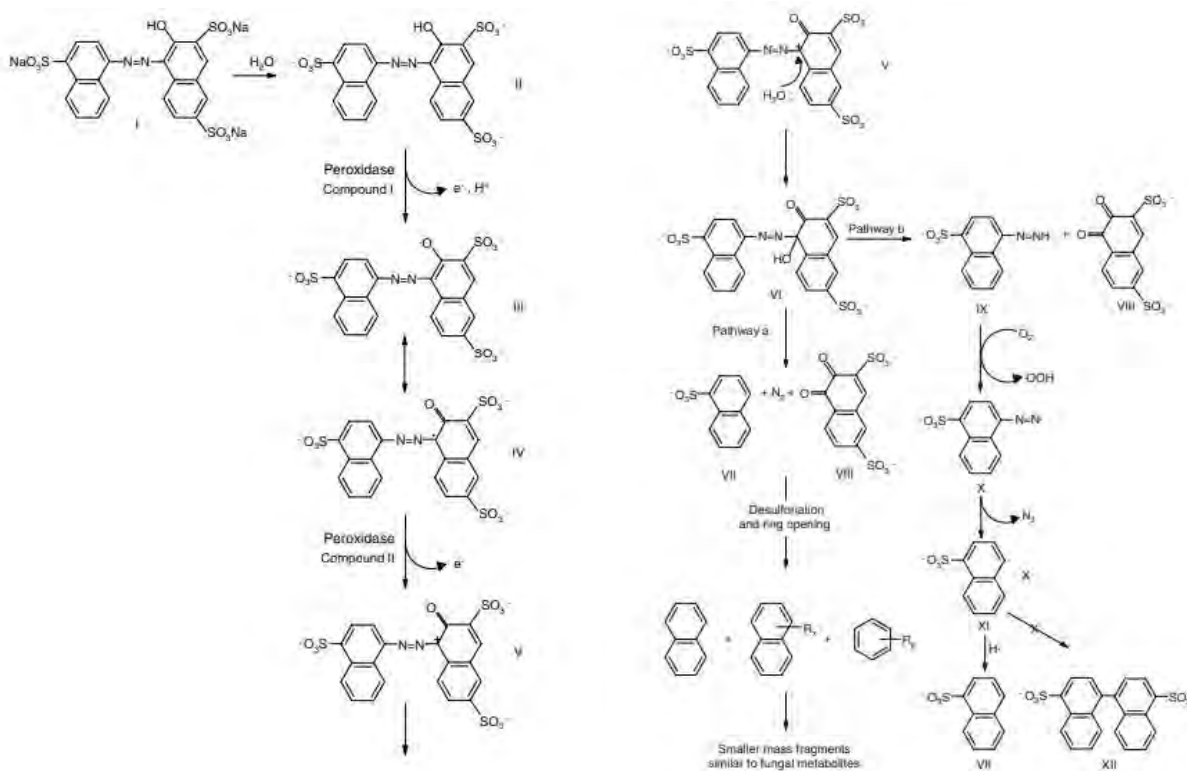


Figura 2. Ruta de degradación de AR27 mediante lacasas de *T. versicolor*, en la que se aprecia como compuestos derivados, naftaleno y benceno. Tomado de Gavril y Hodson (2007).

Otro ejemplo de esta clase de contaminación es la transformación de colorantes a compuestos fenólicos (del orden de 5 a 25 mg l⁻¹), mismos que al entrar en contacto con cloro se transforman en compuestos policlorados de fenoles, que son altamente tóxicos para el humano (Chung *et al.*, 2003). En este sentido, no es de extrañarse que en sistemas controlados de laboratorio este

mismo fenómeno se presente, tal como lo reportaron Gavril y Hodson (2007) para la transformación de rojo ácido 27 a través de *T. versicolor*, en el que se generaron compuestos aromáticos.

Tomando en cuenta lo anterior, es importante que las tecnologías de remediación de efluentes textiles se generen considerando las múltiples variables que se presentan.

De cierto modo las legislaciones Europeas (Cattoor, 2007) y Norteamericanas (Boyter, 2007), que son referencia mundial, en relación al tratamiento de agua, intentan persuadir a la comunidad científica a establecer métodos y procedimientos que prioricen la disminución del riesgo a la salud pública y al medio ambiente.

Vale la pena hacer una revisión concreta sobre la gama de tratamientos para efluentes textiles, para observar porque existe una tendencia por utilizar aquellos de base biotecnológica.

2.1.2. Tratamientos fisicoquímicas

Para eliminar a los colorantes del efluente textil se reportan dos tendencias importantes, la primera consiste en remover el colorante; es decir transportándolo a una matriz diferente a la del efluente sin que necesariamente el colorante tenga modificaciones químicas (Zhenhuan *et al.*, 2018) y la segunda es a través de la degradación del colorante hasta ser reducido su peso molecular o incluso convertido a CO₂ y H₂O (Slokar y Marechal, 1998; Pandey *et al.*, 2007).

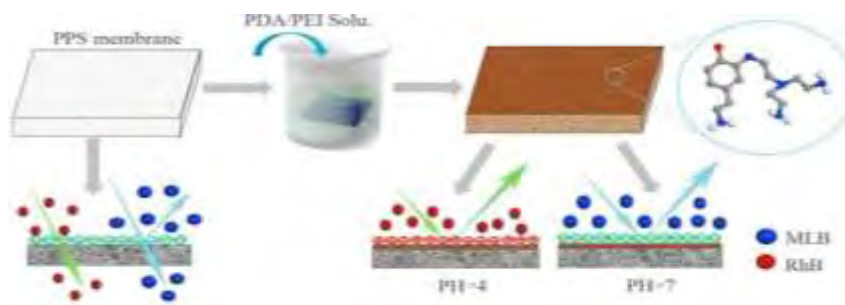


Figura 3. Eliminación por remoción. Se esquematiza el proceso de preparación de una membrana elaborada a base de sulfuro de polifenileno para la remoción de colorantes, tomada de Zhenhuan *et al.*, (2018).

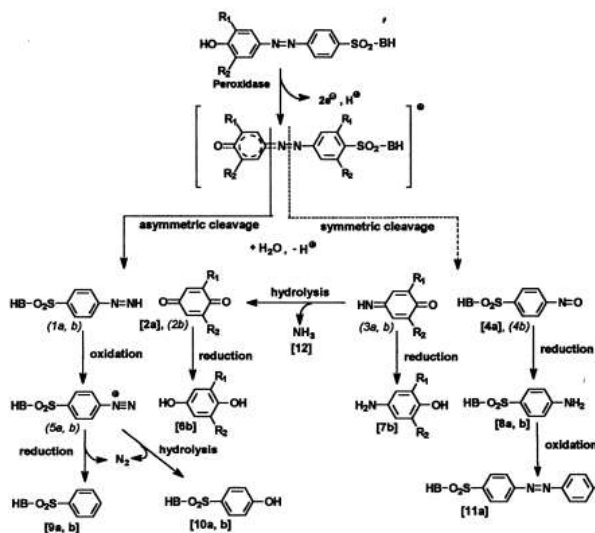


Figura 4. Eliminación por biodegradación. Se muestra el mecanismo de degradación de un colorante azoico sulfonado. La degradación está mediada por la presencia de la enzima peroxidasa, este ejemplo fue tomado de Goszczynski *et al.*, (1994).

Los tratamientos de remoción más usados son; a) la coagulación/floculación que consiste en usar sales inorgánicas para aglutinan partículas suspendidas en el medio acuoso, seguido por la adición de un polímero que captura los coágulos producidos, aumentando el peso de las partículas que sedimentan con facilidad (Bidhendi *et al.*, 2006). Por su parte, b) la electrocoagulación consiste en una serie de reacciones electrolíticas en las superficies de electrodos que forman coágulos en la fase acuosa que adsorben a los contaminantes y después son removidos por sedimentación (Bayramoglu *et al.*, 2004).

Otras tecnologías se basan en la absorción de colorantes a ciertos materiales sintéticos o naturales. Tales como el carboncillo de madera, carbón sulfonado, carbón activado en polvo, cáscara de naranja, sólidos de aguas residuales pasteurizados y macro-hongos pulverizados (Forgacs *et al.*, 2004).

Por otro lado, en el tratamiento a base de degradación de colorantes; destaca el uso de ozono para oxidar contaminantes no susceptibles a biodegradación (Arslan-Alaton y Alaton, 2006). Otra opción es la oxidación por fisión homolítica de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que usa la irradiación de luz ultravioleta para generar radicales OH^* , estos últimos oxidan a los colorantes (Arslan-Alaton y Alaton, 2006). Finalmente se menciona a la oxidación con el reactivo Fenton, que consiste en el uso de H_2O_2 activado con una sal de Fe (II) (Slokar y Marechal, 1998).

A pesar de la amplia gama de opciones en tecnologías fisicoquímicas, éstas presentan la desventaja de producir niveles elevados de lodos residuales, altos costos de operación y problemas de contaminación secundaria, lo que limita su implementación en las plantas de tratamiento de efluentes textiles (Bayramoglu *et al.*, 2004). De manera que el siguiente apartado muestra las bondades de las biotecnologías como alternativa efectiva para eliminar contaminantes de los efluentes textiles.

2.1.3. Tratamientos de base biotecnológica

En primer lugar, es importante tomar en cuenta que las biotecnologías se basan en las propiedades de los vegetales, algas, hongos, bacterias, líquenes, consorcios, entre otros, para transformar a los colorantes. Los microorganismos producen enzimas en condiciones abióticas aeróbicas o anaeróbicas, estas biomoléculas son las responsables de oxidar o reducir a los colorante (Pandey *et al.*, 2007; Baldrian, 2004), aunque también se ha reportado que remueven

colorantes al adherirlos por sorción a los componentes de la membrana o pared celular (Almeida y Corso, 2014). Hay evidencias que indican que en la biosorción son los heteropolisacáridos y lípidos de la pared celular, los responsable de remover colorantes (Solís *et al.*, 2012).

2.1.3.1. Plantas y algas

El uso de plantas para eliminar contaminantes se conoce como fitoremediación; los colorantes pueden sorberse, acumularse, transformarse y volatilizarse al entrar en contacto, principalmente con las raíces de las plantas (Delgadillo-López *et al.*, 2011). Las plantas que tienen raíces largas y un crecimiento rápido, como es el caso de *Aster amellus* Linn, son un buen candidato para eliminar colorantes (Khandare *et al.*, 2011). Por otro lado, se sabe que las algas tienen elevada resistencia a las condiciones abióticas de los efluentes textiles y propiedades de degradación de colorantes. Es por lo anterior que el verde de malaquita se eliminó con la macroalga *Chara sp.* a través de mecanismos de degradación y/o sorción (Khataee *et al.*, 2010). Un inconveniente en el uso de plantas o algas es que en general tardan más que hongos o bacterias en la eliminación de los colorantes (El-Sheekn *et al.*, (2009).



Figura 5. a) Fotografía de la macroalga *Chara sp.* y b) la planta *Aster amellus* Linn, la diversidad de los organismos para el tratamiento de colorantes es muy amplia. Tomadas de Gaden World Images.

2.1.3.2. Bacterias

Un ejemplo de degradación bacteriana lo reportó Pandey *et al.*, (2007) para bacterias metanogénicas y acidogénicas, los estudios en ellas indican la producción de azoreductasas que transforman colorantes azoicos en aminas aromáticas. Es común que la degradación de colorantes con bacterias requiera de condiciones abióticas de anaerobiosis, esto fue constatado en la revisión elaborada por Solís *et al.*, (2012) en donde se indica que bajo dichas condiciones se produce: FMN- reductasa dependientes, FMN- reductasa independientes, NADH-reductasa dependientes, NADPH-reductasa dependientes y NADH-DCIP reductasas). Bajo condiciones aeróbicas las enzimas bacterianas que se producen son las manganeso peroxidasa (MnP), lignina peroxidasa (LiP), lacasas (Lac), tirosinasa (Tyr), N-dimetilasa y celobiosa deshidrogenasa. Para autores como Chan *et al.*, (2012) la identificación de esta clase de enzimas más el seguimiento de los metabolitos de degradación del colorante, fueron suficientes para proponer una ruta metabólica de degradación (Chan *et al.*, 2012).



Figura 6. Planta de tratamiento de colorantes a través del uso de bacterias. Tomada de Alibaba.com.

Mientras que la decoloración bacteriana es frecuente en condiciones anaeróbicas, la mineralización lo es en condiciones aeróbicas (Pandey *et al.*, 2007). Es posible hacer modificaciones de aerobiosis para lograr una degradación que favorezca la eliminación de colorantes, esta idea se reportó por el grupo de trabajo de Garg en el 2012. El proceso desarrollado consistió en reducir enlaces azoicos para formar aminas aromáticas (anaeróbicamente) y después desaminar o deshidrogenar dichas aminas (aeróbicamente).

2.1.3.3. Hongos

Los hongos más extensamente explorados en lo que respecta a la degradación del colorante son los hongos ligninolíticos (Bumpus, 2004). Aparte de esto, se han notificado a *Phanerochaete chrysosporium*, *Coriolus versicolor*, *Trametes versicolor*, *Funalia trogii*, *Penicillium gastrivovus*, *Rhizopus oryzae*, *Pleurotus ostreatus*, *Rigidoporus lignosus* *Pycnoporus sanguineus*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger*, que son capaces de degradar los colorantes azoicos (Fu y Viraraghavan, 2001, Wesenberg *et al.*, 2003). Los hongos de podredumbre blanca producen lignina peroxidasa, peroxidasa de manganeso y lacasa que degradan muchos compuestos aromáticos debido a sus sistemas enzimáticos inespecíficos (Revankar y Lele, 2007), las condiciones abióticas de degradación con hongos con frecuencia son a pH ácido y con aerobiosis (Wesenberg *et al.*, 2003).

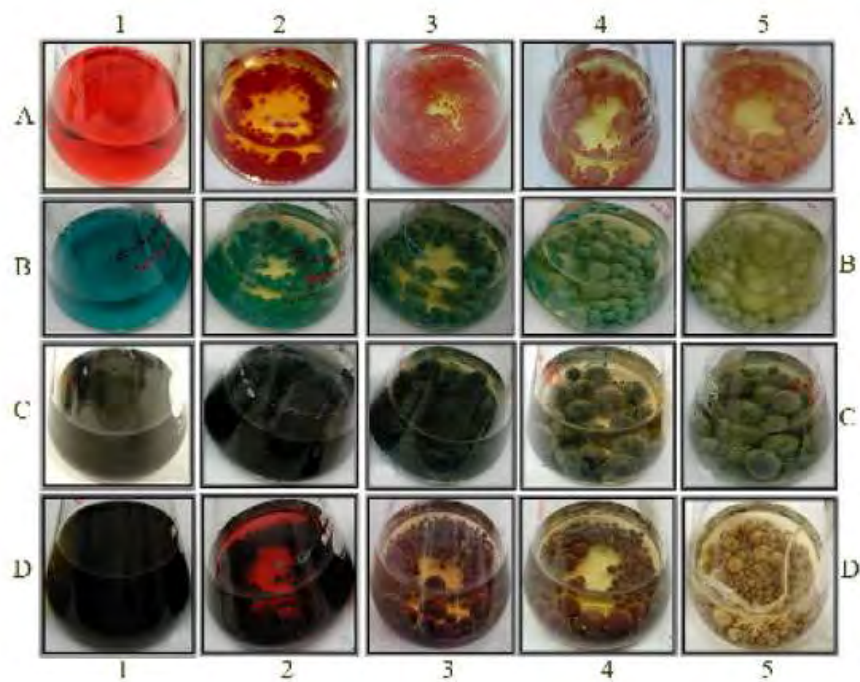


Figura 7. Observación visual de los colorantes Rojo Reactivo 198 (A), Azul Reactivo 21 (B), Azul Reactivo 214 (C) y la mezcla (D) decolorados por *P. simplicissimum* INCQS 40211 después de 0 días (1), 2 días (2), 5 días (3), 7 días (4) y 14 días (5) de incubación. Tomada de Bergsten-Torralba *et al.*, (2009).

2.1.3.4. Consorcios

Se pueden clasificar a las biotecnologías basándose en el número de organismos que participan en el bioproceso; cuando se trata de un solo organismo se denomina tratamiento con monocultivos y los tratamientos con consorcio implican más de un microorganismo (Ghrosh *et al.*, 2016). Los reportes sobre decoloración de azocompuestos con monocultivos de plantas, hongos y bacterias tienen limitaciones que se asocian a la baja producción de enzimas o a la degradación parcial del colorante (Pandey *et al.*, 2007; Baldrian, 2004). Por su parte, los consorcios han demostrado superar las limitantes de los monocultivos (Ghrosh *et al.*, 2016). En el estudio de Lade *et al.*, (2012) se comprobó un fenómeno de sinergismo generado a través de la interacción de *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146 (hongo) con *Pseudomonas sp.* SUK1 (bacteria), que aumentó la degradación y desintoxicación del colorante azoico rubina GFL. De manera similar Kabra *et al.*, (2013) demostraron que la interacción entre *Glandularia pulchella* Tronc. (planta) y *Pseudomonas monteilli* ANK (bacteria) indujo el 100% de degradación del colorante escarlata RR gracias a un acoplamiento enzimático. Lo anterior ilustra que los consorcios son ventajosos con respecto a los monocultivos, las razones de ese hecho están documentadas, sin embargo antes de tocar esos temas, vale la pena hacer una diferenciación entre los tipos de consorcios a los que se hace referencia en la literatura.

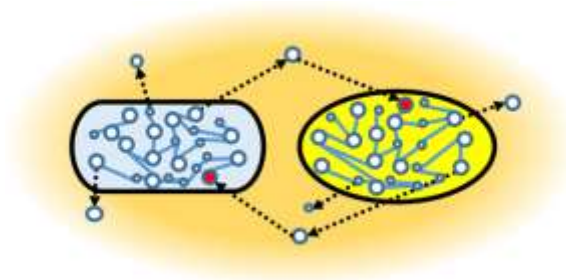


Figura 8. Los consorcios tienen relaciones interespecíficas que mejoran un bioproceso. Su acoplamiento enzimático es uno de los mecanismos que usan para lograrlo. Tomada de Baran *et al.*, (2015)

Se habla de consorcios naturales a aquellos microorganismos extraídos del sitio contaminado con efluentes textiles (Du *et al.*, 2015). Para obtener este tipo de microorganismos basta con muestrear el lugar contaminado con colorantes, implementar en el laboratorio su crecimiento

bajo condiciones menos nocivas y reutilizarlos en los sitios contaminados (Ramasany *et al.*, 2012).

Los consorcios naturales tienen la desventada de ser considerados como sistemas de “caja negra”, porque no se conoce la identidad, la interacción (mutualismo, comensalismo, amensalismo o competencia) (Ghosh *et al.*, 2016), o el tipo de participación de cada miembro (Cui *et al.*, 2012). Lo anterior tuvo lugar en el trabajo de Cui *et al.*, (2012), que consistió en evaluar en funcionamiento de una biopelícula de hongos-bacterias, no estéril, que trabajó en un sistema continuo durante 4 meses en el tratamiento de un efluente textil, los resultados indicaron que solo *C. tropicalis* y *Candida sp.* prevalecieron hasta el final del tratamiento, mientras que el resto de los microorganismos murió o sobrevivió sin mostrar indicios de haber participado en la eliminación del colorante.

Los consorcios diseñados son un sistema “hecho por el hombre” en el que se induce el crecimiento de dos o más organismos en el mismo cultivo, elegidos con base en sus funciones para mejorar un bioproceso (Nadell *et al.*, 2010). Existen pocos reportes en la literatura acerca de consorcios diseñados aplicados en el tratamiento de colorantes (Kuhar *et al.*, 2015; Almeida *et al.*, 2014; Mishra *et al.*, 2014; Kurade *et al.*, 2012; Chan *et al.*, 2012; Jadhav *et al.*, 2008), lo anterior es probable que sea debido a la dificultad que representa combinar microorganismos con requerimientos distintos, en sistemas donde comparten sustratos, crecer bajo condiciones no óptimas y comparten espacio. No obstante, las desventajas del crecimiento en consorcio salen de la atención de la presente tesis doctoral, porque el objetivo es destacar las ventajas inminentes de este tipo de sistemas biológicos.

Un análisis superficial de las biotecnologías para tratar colorantes en función del tipo de microorganismos involucrado, resalta que las lacasas son el tipo de enzima que la mayoría de los organismos produce (Singh *et al.*, 2015). Esto no es una novedad, de hecho son las enzimas de mayor importancia no solo en el tratamiento de contaminantes persistentes sino también por sus aplicaciones a nivel industrial (Dwivedi *et al.*, 2011). Son de interés en este trabajo, porque coincidentemente su expresión está afectada por los consorcios. Un preámbulo más detallado sobre las lacasas nos llevará a comprender porque son tan frecuentes e importantes en el tratamiento de efluentes textiles.

2.1.4. Las lacasas

2.1.4.1. Distribución biológica

La primera aparición de las lacasas en la literatura fue a través del reporte de Yoshida en 1883, en el cual se estudió la identificación de los compuestos presentes en el látex extraído del árbol *Rhus vernicifera*. Desde el reporte de Yoshida a la fecha, el número de referencias aumento considerablemente, mostrando que las lacasas están distribuidas en muchos organismos con funciones diversas (Rivera-Hoyos *et al.*, 2013).

Las lacasas son producidas por insectos (Rivera-Hoyos *et al.*, 2013), plantas, hongos, bacterias (Liu *et al.*, 2013) y cianobacterias (Afreen *et al.*, 2016), entre otros. Pueden estar ubicadas en la parte extracelular (plantas y hongos) e intracelular (bacterias) (Diamantidis *et al.*, 2000) lo cual sugiere que tienen funciones fisiológicas distintas (Asgher *et al.*, 2008). Por ejemplo, en los insectos, su principal función es la de participar en el proceso de esclerotización que consiste en el endurecimiento de tejido, a través de la síntesis de cutícula epidérmica (Font *et al.*, 2006).



Figura 9. Se muestra la planta y laca del árbol *Rhus vernicifera* el primer organismo en el que se detectó la presencia de lacasas. Tomada de Aloy (2006).

En plantas, participa en la síntesis de lignina (Font *et al.*, 2006), mientras que en los hongos, participan en la degradación de lignina (Alcalde, 2015), además de participar en la pigmentación

(Manavalan *et al.*, 2013), esporulación y la formación de cuerpos fructíferos (Rivera-Hoyos *et al.*, 2013). En bacterias, las lacasas están relacionadas con los procesos de morfogénesis, homeostasis de cobre, biosíntesis de pigmentos y la protección de esporas contra la luz ultravioleta y peróxido de hidrógeno (Manavalan *et al.*, 2013).

En hongos la producción de lacasas varía en cantidad y características, un solo organismo puede producir lacasas con características diferentes denominadas isoformas, es decir enzimas con diferente peso molecular que tienen actividad lacasa (Ramírez-Cavazos *et al.*, 2014b). El número de isoformas depende del microorganismo, los niveles de nutrientes, las condiciones de crecimiento, el estado de desarrollo fúngico y la presencia de agentes inductores o mediadores (Hoshida *et al.*, 2001).

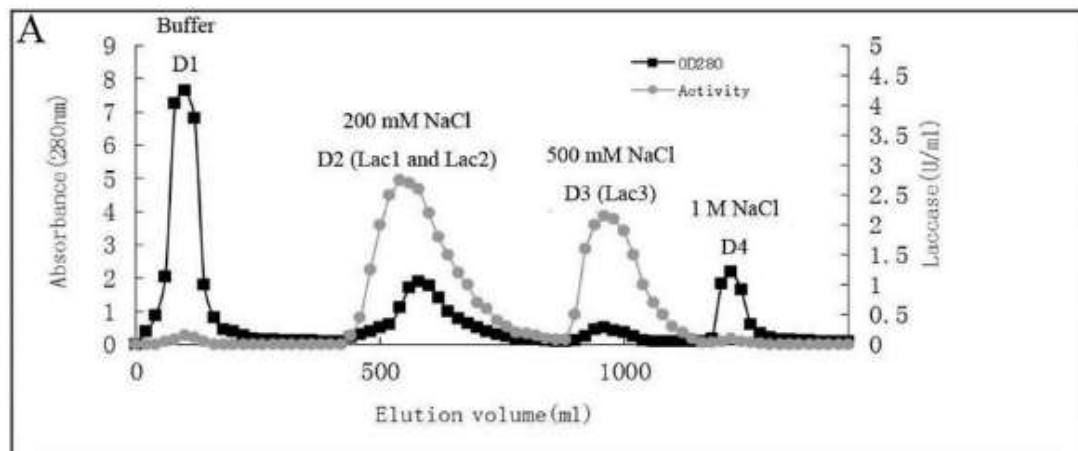


Figura 10. Perfiles cromatograficos de isoformas de lacasas producidas por *Pleurotus nebrodensis*. La gráfica fue tomada de Yuan *et al.*, (2016).

La existencia de numerosos genes que producen isoformas de lacasas, es una consecuencia de la diversidad en las funciones fisiológicas a lo largo del ciclo de vida fúngico o implican flexibilidad y/o adaptación a los constantes cambios ambientales, tal como sucede con los Basidiomicetos y Ascomicetos en los que se conocen alrededor de 100 lacasas distintas (Rivera-Hoyos *et al.*, 2013). Entre los hongos capaces de secretar isoformas de lacasa están: *Fusarium proliferatum* (2 isoformas), *Ganoderma lucidum* (3 isoformas), *Pycnoporus sp.* SYBC-L3 (3 isoformas) (Liu *et al.*, 2013), *Pycnoporus sanguineus* CS43 (3 isoformas) (Ramírez-Cavazos *et*

al., 2014b) *Trametes versicolor* (2 isoformas) (Bertrand *et al.*, 2015). A pesar de que las lacasas son producidas por razones distintas, comparten características en común.

2.1.4.2. Características generales

Las lacasas son glicoproteínas diméricas o tetraméricas (Afreen *et al.*, 2016), N-glicosiladas (Mann *et al.*, 2015) de naturaleza enzimática de tipo oxidasa (bencenodiol: oxígeno reductasa, E.C. 1.10.3.2) con un peso molecular de entre 40 y 100 kDa (Bertrand *et al.*, 2015; Rivera-Hoyos *et al.*, 2013; Asgher *et al.*, 2008) (**Figura 11**). Tanto las lacasas de plantas como las de hongos son glicosiladas, aunque las de plantas presentan mayor grado de glicosilación (22-45%) en comparación con las fúngicas (10-25%) (Dwivedi *et al.*, 2011).

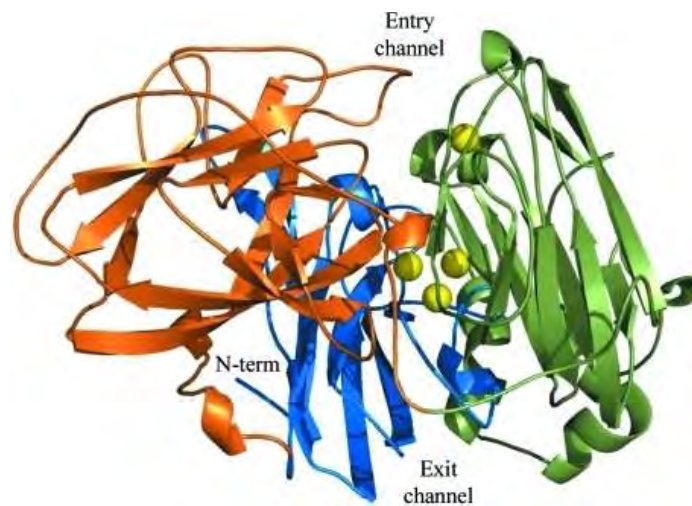


Figura 11. Estructura molecular de la enzima lacasa de *C. máxima* a 1.9 de resolución, mostrando tres dominios y la posición de los centros de cobre. Tomada de Lyashenko *et al.*, (2006)

Se pueden clasificar en 3 tipos de lacasas de acuerdo con los diferentes átomos de cobre dentro de sus centros catalíticos: azules, amarillas y blancas (Liu *et al.*, 2013). Las más abundantes tienen 4 átomos de cobre; uno paramagnético cobre tipo 1 (T1Cu), que es el responsable la oxidación del sustrato reducido (Dwivedi *et al.*, 2011). El cobre tipo 2 (T2Cu) y tipo 3 (T3Cu) que forman el grupo trinuclear, responsable de reducir una molécula de oxígeno a dos moléculas de agua (Ramírez-Montoya *et al.*, 2015). En el centro catalítico de las lacasas se pueden suscitar 4 reducciones de electrones simples de O_2 a H_2O , utilizando para ello una variedad de sustratos

fenólicos como donadores de hidrógeno (Mann *et al.*, 2015). Las lacasas utilizan como único cosustrato para su biocatálisis al oxígeno molecular (Songulashuili *et al.*, 2016).

2.1.4.3. Propiedades fisicoquímicas

Entre las propiedades fisicoquímicas de las lacasas se cuentan las siguientes: tienen valores de pH y temperaturas óptimas de reacción que varían de 2 a 10 y de 40 a 65°C, respectivamente (Liu *et al.*, 2013). Aunque algunas pierden actividad a $\text{pH} \geq 7.0$ (Tonin *et al.*, 2016). Existen evidencias de que la estabilidad en el pH y la temperatura están relacionadas con la N-glicosilación, típico de las lacasas de hongos y plantas (Ramírez-Cavazos *et al.*, 2014), además la N-glicosilación es necesaria para que las lacasas se secreten (Dwivedi *et al.*, 2011). El punto isoeléctrico (pI) típico de lacasas oscila de 2.6 a 6.9, este se utiliza para diferenciar isoformas (Ramírez-Cavazos *et al.*, 2014), aunque no es la única opción.

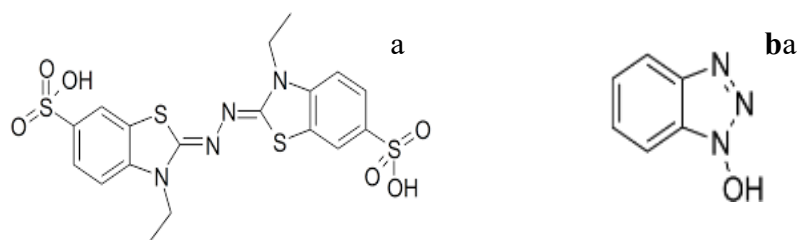


Figura 12. Estructura química de a) ABTS y b) HBT. Tomada de Fciencias y Mindiamart, respectivamente.

El potencial redox (E°) se refiere a la energía que las enzimas requieren para remover un electrón del sustrato (Frasconi *et al.*, 2010), el E° para lacasas fúngicas a menudo es mayor (alrededor de +800 mV) que el de las lacasas de plantas o bacterias (por ejemplo, el E° de lacasas de la planta *R. vernicifera* es de +400 mV) (Rivera-Hoyos *et al.*, 2013), los valores elevados de E° están relacionados con la eficiencia a la que se degradan ciertos colorantes. Además, se sabe que si el valor de E° del sustrato es mayor al de las lacasas, la adición de mediador estimula una mejor degradación (Baldrian, 2005). Se ha reportado que algunos compuestos metálicos inorgánicos/orgánicos del Mn^{2+} y $\text{Fe}(\text{EDTA})^{2-}$, son oxidados por lacasas solo en presencia de

mediadores (Rivera-Hoyos *et al.*, 2013). Desde que Bourbonnais y Paice (1990) demostraron que la inclusión de mediadores expande la actividad catalítica de las lacasas hacia sustratos no fenólicos, más de 100 mediadores diferentes se han estudiado; entre los más usados están el ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico)) y al HBT (1-hidroxibenzotriazol).

2.1.5. Producción de lacasas fúngicas

2.1.5.1. Determinación de la actividad lacasa

La producción de lacasas se mide indirectamente a través de la determinación de la actividad enzimática lacasa (AEL) mediante técnicas espectrofotométricas; una unidad de AEL se define como la cantidad de enzimas que oxidan 1 μmol de sustrato por minuto por unidad de volumen o masa, bajo condiciones estándares. Entre los principales sustratos utilizados en la determinación de la AEL están el ABTS (Zhu *et al.*, 2016), DMP (2,6-dimetoxifenol) (Liu *et al.*, 2013), catecol (Wang *et al.*, 2013), guaiacol (Zhang *et al.*, 2006), 3,3-diaminobencidina (Kurade *et al.*, 2012) y Siringaldazina (Harkin y Obst, 1973).

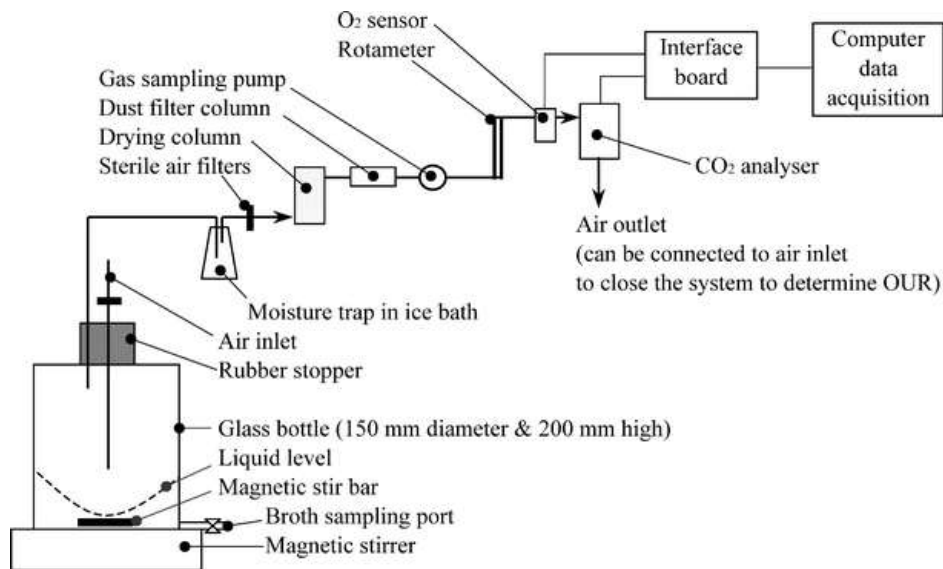


Figura 13. Sistema de producción de lacasas por fermentación sumergida con agitación magnética. Experimentos en escala laboratorio desarrollados por Thiruchelvam y Ramsay, (2007).

En la producción de lacasas las principales variables que la afectan son: el tipo de fuente de carbono (Ramírez-Cavazos *et al.*, 2014) o nitrógeno (Zhu *et al.*, 2016); el uso de mediadores sintetizados químicamente (Manavalan *et al.*, 2013) o mediadores naturales derivados de lignina (Wang *et al.*, 2015); el uso de inductores biológicos bacterianos (Baldrian, 2004) y fúngicos (Mann *et al.*, 2015).

Finalmente, el tipo y la configuración del reactor toman importancia al momento del escalamiento del proceso de producción de lacasas. Dos configuraciones son las que se han reportado con frecuencia, las fermentaciones sumergidas (Songulashuili *et al.*, 2016) y las fermentaciones en estado sólido (Kuhar *et al.*, 2015).

2.1.5.2. *Microorganismos productores*

Históricamente se conoce que los hongos de pudrición blanca son los principales productores de AEL (Senthivelan *et al.*, 2016). Aunque no son los únicos, ya que recientemente se reportó que bacterias (Muthukumarasamy y Murugan, 2014) y cianobacterias (Afreen *et al.*, 2016) tienen rendimientos de producción de AEL semejantes a los de hongos.

La **Tabla 2** concentra datos bibliográficos sobre producción de AEL con monocultivos y consorcios. La producción de lacasas oscila entre 57 hasta 8 533 000 UL^{-1} determinado con el sustrato ABTS y de 1,100 hasta 72 000 UI^{-1} con el sustrato DMP. El tipo de microorganismo afecta significativamente la producción de AEL. Para el hongo *Pleurotus ostreatus* (ACCC52857) se reportó la mayor AEL (8 533000 UI^{-1}) (Zhu *et al.*, 2016). *Pleurotus ostreatus* vive como un saprófito de la madera produciendo enzimas que degradan lignina. Se ha reportado que su genoma codifica para 12 lacasas putativas (Castanera *et al.*, 2012).

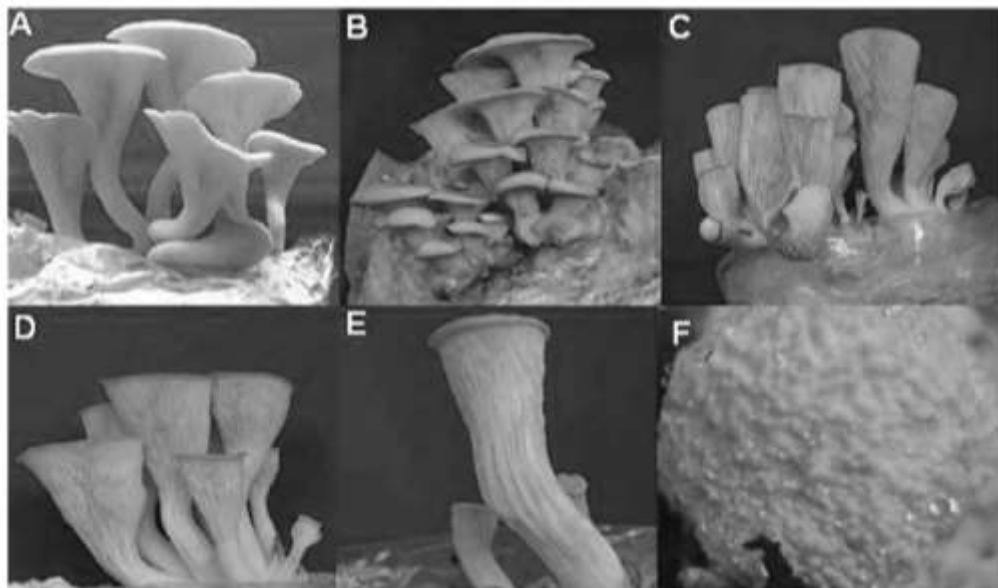


Figura 14. Las particularidades del hongo *Pleurotus ostreatus* le permiten crecer incluso frente a la presencia de selenio (B, C, D, E y F). Tomada de da Silva *et al.*, (2012).

Por otro lado, la levadura *Cryptococcus albidus* FIST3, proveniente de un efluente de la industria de pulpeo y papel, produjo 832 200 UI⁻¹ de AEL (Singhal *et al.*, 2009), mismas que fueron caracterizadas (Singhal *et al.*, 2012). Al respecto, se hace la observación sobre que hay pocos reportes sobre las lacasas con *Cryptococcus albidus*, quizá porque se trata de un organismo patógeno, causante de encefalitis en pacientes con VIH (Liu *et al.*, 2014) y no sea una de las mejores opciones para producción de lacasas. En seguida, *Corioloropsis gallica* 1184 produjo 200 900 UI⁻¹ de AEL (Songulashuili *et al.*, 2016). Este hongo fue aislado de alpechín (efluente generado en la elaboración de aceite de oliva) y se usa en la remoción de compuestos fenólicos (Daâssi *et al.*, 2014). La producción de 143 000 UI⁻¹ fue posible con el *Pycnoporus sanguineus* (CS43) (Ramírez-Cavazos *et al.*, 2014a). El género de *Pycnoporus* incluye hongos basidiomicetos de pudrición blanca listados como organismos grado alimenticio y empleados en la elaboración de cosméticos. Las lacasas producidas por *Pycnoporus* han sido estudiadas en diversas aplicaciones en la última década (Lomascolo *et al.*, 2011); en bioremediación de efluentes con colorantes (Trovaslet *et al.*, 2007), en la biotransformación de micro-contaminantes farmacéuticos (Rodríguez-Delgado *et al.*, 2016) y en la degradación de compuestos denominados químicos disruptores endocrinos, conocidos por perturbar el sistema endocrino de algunos organismos vivos (Ramírez-Cavazos *et al.*, 2014b). Con producciones por abajo de 100 000 UI⁻¹ de AEL se reportaron a *Ganoderma lucidum* (Manavalan *et al.*, 2013), *Pycnoporus sp.* SYBC-L3 (Liu *et al.*, 2013), *Arthrospira máxima* (SAE-25780) (Afreem *et al.*, 2016), *Trametes versicolor* ATCC 42530 (Font *et al.*, 2006), *Trametes versicolor* CICC 14001 (Wang *et al.*, 2013), *Xylaria sp.* (Castaño *et al.*, 2015), *Cerrena consors* (Mann *et al.*, 2015). Los hongos de la especie *Trametes* fueron activamente investigados por su producción de lacasas debido a su distribución cosmopolita y excelentes descomponedores de la madera. De hecho *Trametes versicolor* fue de las primeras especies con los que se logró producir lacasas a nivel escala industrial (Ikehata *et al.*, 2004).

Ahora bien, se mencionan los detalles sobre los reportes con consorcios. El consorcio conformado por *Phlebia radiata* con *Dichomitus squalens* y *Phlebia radiata* con *Ceriporiopsis subvermispora* (todos ellos hongos de pudrición blanca), produjeron un máximo 118 000 UI⁻¹ de AEL. Se observó mayor producción de AEL en comparación con sus monocultivos (Dong *et al.*, 2012). Con producciones por debajo de 100 000 UI⁻¹ de AEL fueron para *Trametes*

versicolor/Candida sp. HSD07A (Hailei *et al.*, 2009), *Rhodotorula mucilaginosa/Pleurotus ferulae* JM301 (Wang *et al.*, 2015). En los cultivos en consorcio se describen mecanismos mediante los cuales al aumento de la producción AEL se asocia a la interacción entre organismos. Considerando los datos de la Tabla 1, los monocultivos de *Pleurotus ostreatus* (ACCC52857), *Cryptococcus albidus* FIST3 y *Corioloropsis gallica* 1184 fueron los 3 mejores productores de AEL incluso en comparación de los cultivos en consorcio mencionados anteriormente. Sin embargo, no se debe perder de vista que en los 3 mejores cultivos se usó vanilina y/o CuSO₄, como inductores, los cuales pueden afectar al medio ambiente. Valdría la pena evaluar estas tres especies de microorganismos en la producción de AEL usando un cultivo en consorcio.

Los consorcios no solo mejoran la producción de AEL sino que afectan positivamente el tiempo de producción (Senthivelan *et al.*, 2016). En general los cultivos requieren de 48 hasta 840 horas para producir AEL (Tabla 1). El mejoramiento de la producción de AEL con consorcios podría competir en cantidad y tiempo, con opciones fisicoquímicas efectivas tales como el uso de ondas de ultrasonido (Wang *et al.*, 2013).

2.1.5.3. Influencia de la fuente de carbono y nitrógeno

La presencia de un carbohidrato simple como la glucosa, xilosa o sacarosa son necesarias para el crecimiento del microorganismo y la consecuente producción de AEL. La glucosa es la principal fuente de carbono en la mayoría de los reportes sobre producción de lacasas (**Tabla 2**). En cuanto a la fuente de nitrógeno la más frecuentes son la peptona de carne, bactopectona, extracto de soya, nitrato de sodio, cloruro de amonio, sulfato de amonio, extracto de malta, triptona, sulfato de amonio. En algunos casos, la producción de lacasas se favorece con altos niveles de nitrógeno. Así sucede con *Cryptococcus albidus* FIST3 (Singhal *et al.*, 2009). Para otros casos la producción de lacasas se favorece restringiendo los niveles de nitrógeno, esto sucedió en cultivos de *Pycnoporus cinnabarinus-Phlebia radiata* (Dwivedi *et al.*, 2011) y *Trametes versicolor* (Singhal *et al.*, 2009). Para *Cryptococcus albidus* FIST3 la fuente de carbono debió ser baja porque el exceso de glucosa y sacarosa produce un fenómeno denominado obstrucción de la iniciación y reduce la producción de AEL (Singhal *et al.*, 2009), este fenómeno se puede evitar al usar sustratos poliméricos como la celulosa de acuerdo a lo que sugiere Shradha *et al.*, (2011).

En la revisión de Senthivelan *et al*, (2016) relacionado a la producción de lacasas, se concluye que la glucosa y el tartrato de amonio son las mejores fuentes de carbono y nitrógeno. Sin embargo cada microorganismo presenta necesidades nutrimentales diferentes, por lo que se hace necesario hacer una puntual acerca de los mejores sustratos.

Tabla 2. Factores que intervienen en la producción de lacasas.

Microorganismo	Mediador/Inductor	AEL (U l ⁻¹)	ABTS (x) y otros (nombre)	Tiempo (días)	Referencia
<i>Pleurotus ostreatus</i> (ACCC52857)	Extracto de levadura (1%) y CuSO ₄ (2 mM)	8 533 000	x	13	(Zhu <i>et al.</i> , 2016)
<i>Cryptococcus albidus</i>	CuSO ₄ (2 mM) y bagazo (1.0%)	832 200	x	11	(Singhal <i>et al.</i> , 2012)
<i>Corioloropsis gallica</i> 1184	Vanilina (200 µM)	200 900	x	7	(Songulashuili <i>et al.</i> , 2016)
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (CS43)	Aceite de soya (1% (v/v)) y CuSO ₄ al 3 mM. Agregados al segundo día del cultivo	143 000	x	15	(Ramírez-Cavazos <i>et al.</i> , 2014)
<i>Phlebia radiata con Dichomitus squalens y Phlebia radiata con Ceriporiopsis subvermispora</i>	Compuesto lignocelulósico y consorcio hongo/hongo	95 000	x	9	(Dong <i>et al.</i> , 2012)
		110000		9	
		88 000		12	
		118000		12	
<i>Ganoderma lucidum</i>	Cascara de tamarino (1%), etanol (3%), CuSO ₄ (0.5 mM), ácido gálico (1.0 mM) (condiciones óptimas)	74 840	x	15	(Manavalan <i>et al.</i> , 2013)
<i>Pycnoporus sp.</i> SYBC-L3	CuSO ₄ (4 g l ⁻¹)	72 000	DMP	6	(Liu <i>et al.</i> , 2013)
<i>Arthrospira máxima</i> (SAE-25780)	2 mM de cobre y guaiacol 100 µM	56 894	x	4	(Afreen <i>et al.</i> , 2016)
<i>Trametes versicolor</i> ATCC 42530	No inducción	50 660 (U l ⁻¹ h ⁻¹)	DMP	100	(Font <i>et al.</i> , 2006)
<i>Trametes versicolor</i> CICC 14001	Ondas de ultrasonido	23 140	Catecol	3	(Wang <i>et al.</i> , 2013)
<i>Xylaria sp.</i>	2,5-xilidina (1 mM)	20 535	x	16	(Castaño <i>et al.</i> , 2015)
<i>Cerrena consors</i>	Compuestos del alpechín	1 350	x	30	(Mann <i>et al.</i> , 2015)
	Cobre (0.75 mM)+compuestos de alpechín	13 055		25	
<i>Cerrena consors/Bionectria ochroleuca</i>	Co cultivo hongo/hongo	2 831	x	25	
<i>Cerrena consors/Lasioidiplodia</i>		2 865		25	

<i>theobromae</i>					
<i>Trametes versicolor/Candida sp. HSD07A</i>	Tween 80, consorcio hongo/hongo	10 500	x	6	(Hailei <i>et al.</i> , 2009)

Continuación de Tabla 2.

Microorganismo	Mediador/Inductor	AEL (UI ⁻¹)	ABTS (x) y otros (nombre)	Tiempo (días)	Referencia
<i>Rhodotorula mucilaginosa/Pleurotus ferulae</i> JM301	Compuestos lignocelulósicos y consorcio hongo/levadura	10 055	x	8	(Wang <i>et al.</i> , 2015)
<i>Trametes sp. AH28-2/Trichoderma sp. ZH1</i>	Consorcio hongo/hongo	6 210	Guaiacol	8	(Zhang <i>et al.</i> , 2006)
<i>Trametes versicolor</i> ATCC 42530	0.15 g de Lanaset G	1 700	DMP	4	(Blánquez <i>et al.</i> , 2004)
	0.15 g de Lanaset G + alimentación de 0.15 gl ⁻¹	2 000		20	
<i>Trametes trogii</i> LK13	Material lignocelulósicos y CuSO ₄ (11 mM)	1 263 Ug ⁻¹	X	7	(Yan <i>et al.</i> , 2015)
<i>Trametes versicolor</i> ATCC 42530	Lanaset G (0.15 gl ⁻¹)	1 100	DMP	6	(Romero <i>et al.</i> , 2006)
<i>Trametes versicolor</i> HEMIM-9	Aserrín (0.5%)	800	X	48 h	(Bertrand <i>et al.</i> , 2015)
<i>Trametes versicolor</i> (CBS100.29)	semillas de uva (5 gl ⁻¹)	250	X	35	(Lorenzo <i>et al.</i> , 2002)
	tallos de uva (2.5 gl ⁻¹)	400			
	salvado de cebada (2.5 gl ⁻¹)	650			
<i>Trametes versicolor</i> CICC 14001	Ondas de ultrasonido	588.9	Catecol	5	(Wang <i>et al.</i> , 2013)
<i>Streptomyces cyaneus</i>	menor cantidad de cobre	57 UI ⁻¹	X	20	(Margot <i>et al.</i> , 2013)
<i>Trametes versicolor</i> BAFC 42FC/ <i>Ganoderma lucidum</i> E47	Compuestos lignocelulósicos y consorcio hongo/hongo	7.93 U g ⁻¹	DMP	14	(Kuhar <i>et al.</i> , 2015)
<i>Trametes versicolor</i> G3 (DMS 11269)	Compuestos lignocelulósicos	0.3 Ug ⁻¹ biomasa	DMP	12	(Schlosser <i>et al.</i> , 1997)
		14 Ug ⁻¹ biomasa		7	
		13.5 Ug ⁻¹ biomasa		6	
<i>Galactomyces geotrichum</i> MTCC 1360/ <i>Brevibacillus laterosporus</i> MTCC 2298	Colorantes en el sistema de decoloración y consorcio hongo/bacteria	0.372 Umg ⁻¹ de proteína	3,3-diaminobencidina (DAB)	18 h	(Kurade <i>et al.</i> , 2012)

Los consorcios para mejorar la producción de AEL, lo hacen a través de mecanismos semejantes a los que se describen en cultivos con inducción química. Repasar los fundamentos sobre las sustancias y/o organismos conocidos como inductores o mediadores en la producción de AEL, dejará más claro porque los consorcios mejoran los procesos que aquí se estudian.

2.1.5.4. *Mediadores o Inductores en la producción de lacasas*

El número de sustratos y el nivel de producción de AEL aumentan con el uso de mediadores o inductores. Los mediadores son moléculas de bajo peso molecular que son fácilmente oxidadas por las lacasas, cuando el mediador está oxidado transporta electrones hasta una molécula más compleja (Mann *et al.*, 2015). Se han descrito tres motivos por lo que las lacasas no pueden oxidar ciertas moléculas: I) este tipo de enzimas es específica para compuestos fenólicos, II) las moléculas deben tener un tamaño adecuado para acceder al sitio activo (Cañas y Camarero, 2010) y III) deben tener un potencial redox inferior al de las lacasas (Baldrian, 2005).

Por otro lado, los inductores son moléculas u organismos que afectan el metabolismo del organismo productor de lacasas, estresándolo (Jaszek *et al.*, 2006; Hailei *et al.*, 2009) o influyendo a nivel genético, permitiendo una sobre expresión de la AEL.

La diversidad de mediadores en la producción de AEL contemplan al CuSO_4 (Zhu *et al.*, 2016), vanilina (Songulashuili *et al.*, 2016), etanol (Manavalan *et al.*, 2013), ácido gálico (Manavalan *et al.*, 2013), tween 80 (Hailei *et al.*, 2009), compuestos aromáticos como: 2,4,6-trinitrotolueno, ácido ferúlico, hidroquinona, (Elisashvili *et al.*, 2010), colorantes como el Lanaset (Romero *et al.*, 2006), scarlet RR (Kurade *et al.*, 2012), verde de malaquita (Kuhar *et al.*, 2015).

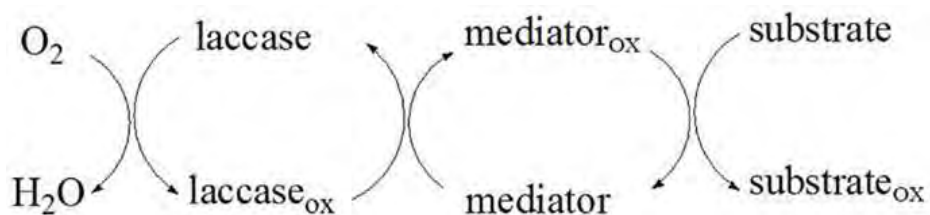


Figura 15. Mecanismo general que muestra en que momento puede participar el mediador. Obsérvese que el mediador es un intermediario para poder oxidar al sustrato, el cual es el compuesto a degradar. Tomado de Christopher *et al.*, (2014).

En esta diversidad también están considerados los mediadores naturales, los materiales lignocelulósicos tales como: tallo de maíz, mazorca de maíz, paja de arroz (Dong *et al.*, 2012),

cáscara de tamarindo (Manavalan *et al.*, 2013), aserrín, semillas de uva, tallos de uva, salvado de cebada (Lorenzo *et al.*, 2002), son opciones interesantes porque se trata de desechos agroindustriales.

Por otro lado, los compuestos presentes en la lignina como el guaiacol (Afreen *et al.*, 2016) y la 2.5-xilidina (Castaño *et al.*, 2015), o compuestos fenólicos del alpechín (Mann *et al.*, 2015) forman parte de esta diversidad de mediadores para la producción de AEL.

Es interesante el reporte de Jaszek *et al.*, (2006) quienes demostraron como el herbicida paraquat aumentó la producción de AEL en *T. versicolor* o *A. biennis* como parte de un sistema de protección contra el estrés oxidativo. En el contexto de mediadores, el paraquat puede considerarse como uno de naturaleza química. En este orden de ideas, la presencia de 100 μM guaiacol como mediador natural mejoró la producción de lacasas en cultivos de *Arthrospira máxima*: disminuyendo 6 días la producción y obteniendo un máximo de 56894 UI^{-1} de AEL.



Figura 16. Hallazgo post muerte de un paciente que cometió suicidio con sulfato de cobre: la imagen muestra la hemorragia y el teñido gris-azul en la mucosa del estómago. Tomado de Meena y Bansal, (2014).

Hay reportes que indican que los mediadores químicos son tóxicos, inclusive autores como Mann *et al.*, (2015) sugieren que el CuSO_4 no debe usarse en altas concentraciones porque podría tener

implicaciones negativas en la remediación de aguas residuales. Como un dato curioso Meena y Bansal, (2014) emitieron reporte de caso en el que se indica que la ingesta de sulfato de cobre es una sustancia popularmente usada en la india para cometer suicidio (Figura 16).

La toxicidad de los mediadores químicos dio argumentos sólidos para proponer a otras sustancias en el mejoramiento de la producción de AEL. Es así que empiezan a usarse los mediadores naturales, tales como los compuestos derivados de la lignina. Dong *et al.*, (2012) reportaron la producción de AEL en un orden de 100 000 UI⁻¹ con monocultivos de *T. versicolor* creciendo con mazorca de maíz y/o paja de arroz con 9-18% de contenido de lignina, en otro reporte el mismo hongo produjo 650 UI⁻¹ de AEL al usar como mediadores a las semillas y tallos de uva con 43% y 23% de lignina, respectivamente (Lorenzo *et al.*, 2002).

Finalmente se indica que los inductores biológicos representan toda clase de consorcios entre hongos/hongos (Kuhar *et al.*, 2015; Mann *et al.*, 2015; Dong *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2006), hongos/levadura (Wang *et al.*, 2015) y hongos/bacterias (Kurade *et al.*, 2012).

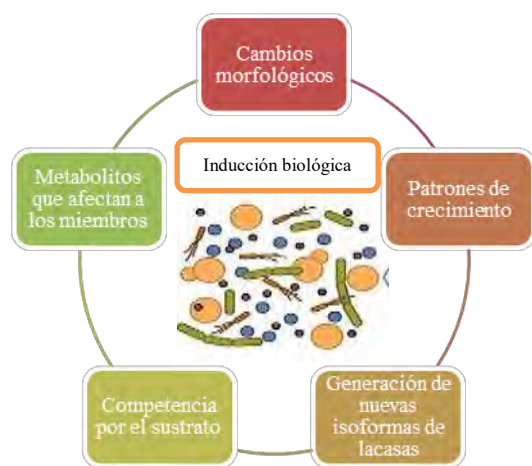


Figura 17. Principales mecanismos en la inducción de AEL en consorcios.

La parte interesante de la inducción biológica de la producción de AEL esta los mecanismos que la describen. Algunos mecanismos están relacionados con cambios morfológicos y los patrones de crecimiento de los miembros del consorcio, otros se asocian a la generación de nuevas isoformas de lacasas y los más comunes tienen que ver con la competencia por el sustrato y la

generación de metabolitos secundarios que estimulan el crecimiento del hongo productor (Figura 17).

Algunos ejemplos sobre el efecto inductivo de los consorcios se mencionan a continuación, debe mencionarse que los consorcios están conformados por un microorganismo productor de lacasas y otro que no forzosamente es productor de lacasas. En primer lugar, el reporte de Wang *et al.*, (2015) muestra que el consorcio entre el organismo productor de lacasas *P. férula* y *R. mucilaginosa* produjeron 3 742 UI⁻¹ AEL y fueron identificadas isoformas de lacasas diferentes. La competencia por el sustrato en la producción de lacasas fue reportada para el consorcio conformado por *T. versicolor* con *Candida sp* HSD07A con el que se produjeron 10 500 UL⁻¹, 1.18 veces más que en el monocultivo. La cepa de *Candida sp* HSD07A consumió 99% de glucosa en 10 h, dejando al *T. versicolor* en estado de inanición por glucosa, estas condiciones provocaron la sobreproducción de AEL (Hailei *et al.*, 2009). Por otro lado, una sustancial inducción de AEL se encontró con *R. solani* gracias a que los metabolitos antifúngicos producidos por la bacteria *Pseudomonas fluorescens* estimularon al hongo (Crowe y Olsson, 2001).

Parece ser, que entre las múltiples funciones, las lacasas tiene la finalidad de conducir a mejores condiciones de sobrevivencia al organismo cuando interactúa con agentes oxidantes u organismos que le causan potencial riesgo. De hecho, las lacasas se producen como un mecanismo de protección microbiana contra ciertos colorantes. Los colorantes a pesar de ser tóxicos, no limitan significativamente el crecimiento del organismo productor de lacasas, es el caso para *T. versicolor*, aunque sus derivados si lo hacen. Este tipo de problemas se pueden resolver usando consorcios para tratar colorantes. En el siguiente apartado se describen los aspectos relacionados con la degradación de colorantes comparando los monocultivos con los consorcios, para destacar la eficiencia de estos últimos.

Hasta ahora se discutió el mejoramiento de un sistema biológico a través de la interacción con otros organismos en la medida en que cada uno aporta reacciones o condiciones que aumentan la eficiencia de degradación o crecimiento. Una alternativa no propuesta hasta el momento es la adaptación de otros organismos para proveer de los insumos que cada miembro requiere. Poco se ha estudiado en laboratorio, pero existen observaciones en la naturaleza que nos sugieren

estrategias óptimas para el crecimiento, tal es el caso de los líquenes en los que un alga transforma energía luminosa en fuentes de carbono que más tarde un hongo usará para crecer y generar el sustrato de soporte para las algas en constante crecimiento (Herrera-Campos *et al.*, 2013). Sin embargo otras opciones parecer ser más prácticas. Tomar en cuenta algas acuáticas como proveedoras de fuente de carbono a otros organismos es una alternativa factible.

Ricciocarpus natans es una planta pequeña que vive flotando libremente en la superficie del agua de regiones templadas y tropicales del mundo, sobre todo en corrientes de agua lentas, estanques, charcos, lagos y lagunas de agua dulce, ricas en nutrientes. El gametofito (orgánulo responsable de la producción de gametos) de *Ricciocarpus natans* es un talo pequeño, que puede llegar a alcanzarlos 2.5 cm de longitud, tiene aspecto esponjoso, es dorsiventralmente aplanado y dicotómicamente lobulado en la parte apical, donde una célula meristemática se divide aumentando el tamaño de la planta, mientras que la parte posterior de ésta se degrada. El incremento de número de individuos se da por fragmentación del gametofito, cuando las ramificaciones se separan o la región basal de una dicotomía se muere o marchita. Se reporta que es utilizada como alimento para aves y como planta ornamental para acuarios. Desde el punto de vista científico ha sido objeto de estudio en trabajos de anatomía, biología celular y ecología (Ruiz, 2008).



Plántula de *Ricciocarpus natans*. Tomada de Rúiz (2008).

Los exudados de las raíces de *Ricciocarpus natans* contienen compuestos como amino ácido, ácidos grasos, esteroides, azúcares, vitaminas y ácidos orgánicos entre otros, que sirven para

estimular la actividad microbiana, un fenómeno conocido como el “efecto rizosfera” (Quisehuatl-Tepexicuapan *et al.*, 2014).

Evaluar los exudados de las plántulas de *Ricciocarpus natans* como proveedor de un sustrato para el crecimiento microbiano resultaría innovador, sin embargo debido a las condiciones de crecimiento particulares de las plantas en relación a los hongos y bacterias, la adaptación en laboratorio de los organismos es un reto biotecnológico.

2.1.6. Monocultivos y consorcios en la decoloración/degradación de colorantes

2.1.6.1. Diferencia entre decoloración y biodegradación

Se entiende por decoloración a la eliminación o transformación del grupo cromóforo del colorante (Almeida y Corso, 2014). Es importante mencionar que la decoloración no garantiza la inocuidad de la sustancia (Couto y Sonromán, 2007). En tanto que, la biodegradación consiste en la descomposición del colorante hasta el nivel en que disminuye su peso molecular y la complejidad de su estructura química (**Figura 18**) (Chan *et al.*, 2012) además de que el colorante podría ser utilizado para la generación de biomasa y energía garantizando la inocuidad de la sustancia. Para confirmar un proceso de biodegradación son necesarias técnicas analíticas como HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), GC-MS (cromatografía de gases acoplada a masas) y/o FTIR (Espectrofotometría Infrarroja) (Kurade *et al.*, 2012).

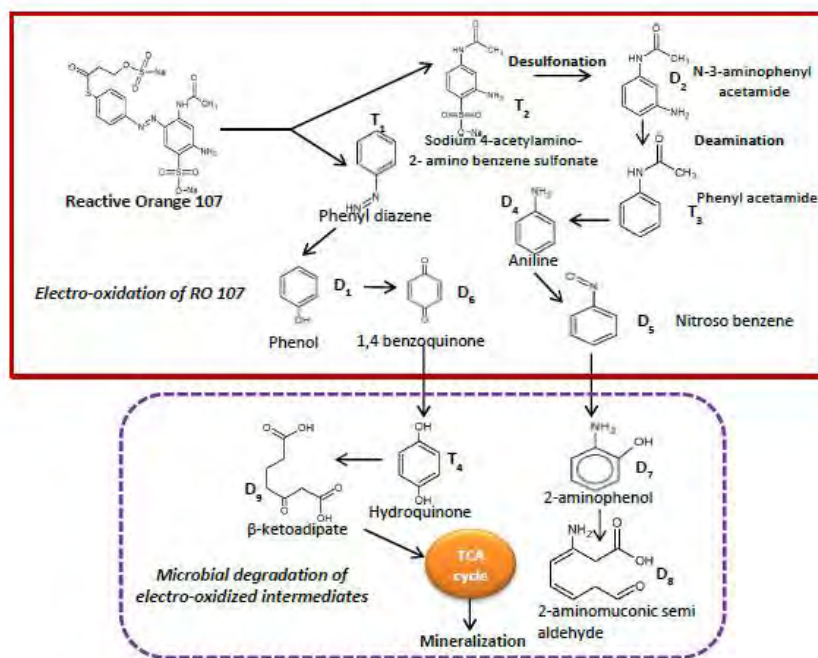


Figura 18. Ruta metabólica para la descomposición del colorante RO107 a través de la electro-oxidación (decoloración) y biodegradación (reducción máxima del colorante) (Aravind *et al.*, 2016).

Ni la decoloración, ni la biodegradación parcial aseguran la disminución de la toxicidad (Almeida y Corso, 2014), por lo que ésta última debe ser medida, a través de las diversas técnicas disponibles: I) bioensayos de la inhibición de la germinación de semillas de plantas como:

Triticum aestivum y *Sorghum bicolor* (Jadhav *et al.*, 2008), *Lactuca sativa* (Almeida y Corso, 2014), *Oryza sativa* y *Vigna radiata* (Manavalan *et al.*, 2013), II) el crecimiento del micelio del hongo *Phanerochaete chrysosporium* (Kuhar *et al.*, 2015), III) el porcentaje de luz emitida por *Photobacterium phosphoreum* (Font *et al.*, 2006; Farré y Barceló, 2003).

2.1.6.2. Extractos enzimáticos o monocultivos

Se han reportado diferentes esquemas para decolorar y/o biodegradar colorantes, tal es el uso de: 1) extractos enzimáticos, 2) enzimas soportadas en matrices poliméricas, 3) sistemas enzimas-mediadores (libres o en soporte) y 4) degradación con organismos especializados en monocultivo o consorcios (**Tabla 3**).

En el estudio de Romero *et al.*, (2006) se comparó la decoloración de 150 mgL⁻¹ de Gris Lanaset G (GLG) utilizando enzimas con y sin células de *Trametes versicolor*. Los resultados mostraron que las enzimas con células fúngicas decoloraron 90%, mientras que con únicamente enzimas fue de 35%. Es claro que para este sistema la presencia de *Trametes versicolor* mejoró la decoloración del GLG lo que sugiere que las células participan en dicho proceso (Romero *et al.*, 2006). La información proporcionada por Romero *et al.*, (2006) no permitió explicar este hecho, sin embargo, existen dos posibles repuestas: i) el colorante pudo absorberse en la biomasa fúngica o ii) se produjeron enzimas de diversa naturaleza mismas que mejoraron la decoloración. El punto anterior esta ejemplificado en el trabajo con *Trametes versicolor* CNPR 8107 quien demostró la producción de manganeso peroxidasas y lacasas las cuales tienen efecto sinérgico en el tratamiento de azul remazol RR, rojo remazol RR y amarillo remazol RR (Toh *et al.*, 2003).

En la biodegradación de colorantes, es importante mantener estables a los microorganismos y las enzimas. Encapsular o inmovilizar microorganismos en ciertos materiales puede aumentar su estabilidad. Estos argumentos fueron parte de la discusión abordada por Font *et al.*, (2006) quienes compararon el tratamiento de agua residual de una planta de celulosa, con células de *Trametes versicolor* inmovilizadas en nylon y libres. El mejor tratamiento fue con células inmovilizadas, los resultados mostraron una reducción del color (36%), de los compuestos aromáticos (54%) y la toxicidad (3.15 veces menos respecto al valor inicial), el nylon le confirió protección a las células del hongo y en consecuencia el rendimiento de tratamiento mejoró. Otro ejemplo al respecto lo reportó Ramírez-Montoya *et al.*, (2012) para las lacasas provenientes de

Trametes versicolor inmovilizadas en carbón mesoposo obtenido de cascara de nuez, este sistema demostró ser útil para colorantes ácidos y reactivos tales como naranja ácido 7, azul ácido, rojo reactivo 2 y negro reactivo 5 (Ramírez-Montoya *et al.*, 2012).

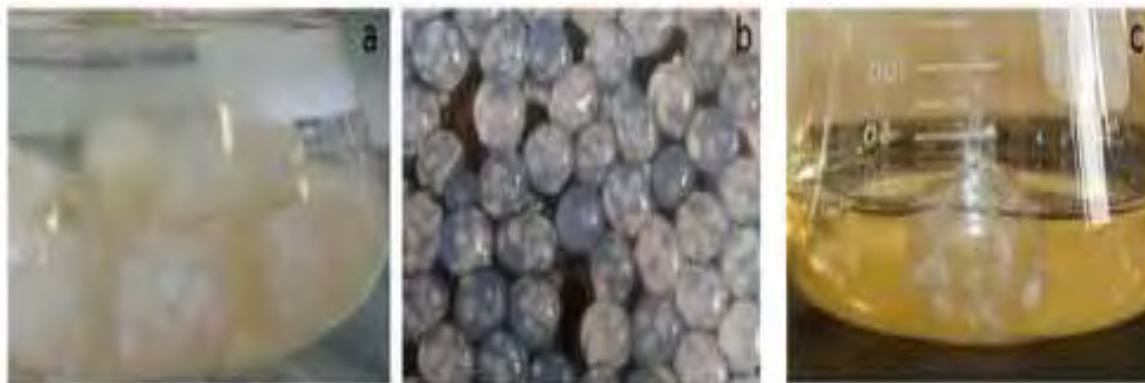


Figura 19. Ejemplos de hongos filamentosos inmovilizados en diferentes soportes: a) *T. versicolor* inmovilizado en espuma de poliuretano, b) pellets de *P. chrysosporium* inmovilizado en alginato de calcio y c) pallets de *A. niger* inmovilizado en sol-gel. Tomado de Martínez y García, (2012).

Los sistemas de lacasas-mediadores son efectivos en la decoloración de azo colorantes. Fue así que con experimentos usando 500 UI^{-1} de actividad lacasa provenientes de *Trametes hirsuta* (BT 2566) más ácido vilurico como mediador, fue posible decolorar 90% de rojo ácido 97 en tres minutos mientras que en ausencia del mediador se decoloró el 30% en 1.5 h (Couto y Sonromán, 2007). El sistema mediador-lacasa ha sido aplicado en la industria de pulpeo y blanqueado de papel (Valls *et al.*, 2010), eliminación de compuestos xenobióticos PHAs, colorantes azoicos (Baldrian, 2005), e incluso en antibióticos sulfamidas (Weng *et al.*, 2012).

A pesar de que existen mediadores de naturaleza química económicos como la N-hidroxiacetanilida (HNA, por sus siglas en inglés) (Valls *et al.*, 2010), se considera que tienen un posible efecto tóxico lo cual ha limitado su uso. Lo anterior dio pie a la propuesta de usar mediadores naturales. Se ha reportado que compuestos involucrados en la degradación de lignina actúan como mediadores naturales, entre estos están el ácido 4-hidroxibenzoico, alcohol 4-hidroxibencílico, veratril alcohol, siringaldehído, acetosiringona, vanilina, ácido-p-cumárico (Rivera-Hoyos *et al.*, 2013), entre otros.

Tabla 3. Estudios de decoloración y biodegradación de colorantes a través de monocultivos y consorcios

Microorganismos	Colorantes o efluente	Resultados del tratamiento	Agente decolorante	Referencia
<i>Cryptococcus albidus</i>	Efluente textil al 1.0% y colorantes al 0.1%: azul de anilina, xilencianol, azul de bromotimol, carmina, cristal violeta, azul brillante R-250 y azul tripan. Compuestos químicos al 0.1% de: tetraclorohidroquinona, ácido 4-clorosalisílico, 3-metil-catecol, 2,4-diclorofenol e hidroquinona.	Remoción de 70% de efluente de pulpeo y papel, 40% de Carmina, cristal violeta, azul de anilina, por abajo de 30% el resto de los compuestos.	Extracto de lacasas.	(Singhal <i>et al.</i> , 2009)
<i>Ganoderma lucidum</i>	Metil de violeta 2B (MV), amarillo Remazol G (RY) y Rojo ácido rápido (AFR) a 50 mM	Remoción de 78% MV, 83% RY y 92% AFR.	Extracto de lacasas.	(Manavalan <i>et al.</i> , 2013)
	Efluente de la industria Ramakrishna de colorantes.	El 97% de decoloración en 21 días, reducción de DBO y DQO en 75 y 70 %, respectivamente.	Microorganismo creciendo en efluente.	
<i>Trametes versicolor</i> (CBS100.29)	Rojo fenol.	Decoloración del 61% en 72 h.	Lacasas en medio de cultivo sin células.	(Lorenzo <i>et al.</i> , 2002)
<i>Trametes versicolor</i> ATCC 42530	Efluente de planta de celulosa Celesa en España.	Reducción de color al 36%, compuestos aromáticos 54% y toxicidad 3.15 veces el valor inicial.	Microorganismo inmovilizado en espuma de poliuretano.	(Font <i>et al.</i> , 2006)
	Gris Lanaset (GLG).	Decoloración de más de 90% en monocultivo y 35% usando extractos enzimáticos.	Lacasas del cultivo de <i>T. versicolor</i> ATCC 42530 y lacasas de la empresa Fluka.	(Romero <i>et al.</i> , 2006)
	Agua residual sintética con GLG.	Decoloración del 90% en monocultivos, sin correlación con las lacasas. Con extractos de enzimas no se decoloró GLG.	Hongo y lacasas.	(Blánquez <i>et al.</i> , 2004)
<i>Trametes versicolor</i>	Naranja ácido 7 (AO7), Azul ácido 74 (AB74), rojo reactivo 2 (RR2) y reactivo negro 5 (RB5).	La decoloración fue mayor del 90% para los colorantes ácidos: AO7 y AB74, en contraste con RB5 el cual permaneció inalterado.	Lacasa libre.	(Ramírez-Montoya <i>et al.</i> , 2015)
		Degradaron AO7 en concentraciones de 600 mg l ⁻¹ .	Lacasa inmovilizada en carbón mesoporoso.	
<i>Trametes versicolor</i> CNPR 8107	Azul de remazol RR, Rojo de remazol RR y Amarillo remazol RR.	La decoloración fue más extensiva para azul de remazol RR y rojo remazol RR (arriba de 96% al sexto día).	Sinergismo entre lacasas y manganeso peroxidadas.	(Toh <i>et al.</i> , 2003)
<i>Trametes versicolor</i> ATCC 20869	Rojo ácido 27.	100% del color desaparece al 4 día.	Lacasas, manganeso peroxidadas y <i>Trametes versicolor</i> .	(Gavril y Hodson, 2007)

(Continuación de Tabla 3)

Microorganismos	Colorantes o efluente	Resultados del tratamiento	Agente decolorante	Referencia
<i>Trametes hirsuta</i> (BT 2566)	Rojo ácido 97 (AR 97), verde ácido 26 (AG 26) y ftalocianina de cobre. Solución stock al 9.2% almacenada en la oscuridad a temperatura ambiente.	Decoloración del 90% para AR 97 a los 3 min con 2 mM de ácido vilurico, mientras que AG 26 presenta lenta decoloración, 6.2% a las 24 h.	Lacasas en solución.	(Couto y Sonromán, 2007)
<i>Aspergillus niger</i>	Colorante rojo proción MX-5B	Se confirma la biosorción, la eliminación de grupos cromóforos y la disminución de toxicidad.	Biomasa fúngica.	(Almeida y Corso, 2014)
<i>Aspergillus terreus</i>		Se confirma la biodegradación del 98% del colorante a las 336h y la fitotoxicidad aumento 50% en los metabolitos biodegradados.		
<i>Aspergillus lentulus</i> , <i>Aspergillus terreus</i> y <i>Rhizopus oryzae</i> (hongo/hongo/hongo)	Cu ²⁺ , Cr ⁶⁺ , dos colorantes azul ácido 161 (AB) y pigmento naranja 34 (PO).	El consorcio remueve 100% Cr ⁶⁺ y 81.6% de Cu ²⁺ . Además más de 98% de AB y 100% de PO es removido después de 48 h.	Microorganismos en consorcio.	(Mishra y Malik, 2014)
<i>Trametes versicolor</i> BAFC42FC/ <i>Ganoderma lucidum</i> (hongo/hongo)	Verde de malaquita	Remoción de 80% en 3 h	Cultivo en estado sólido con microorganismos y lacasas	(Kuhar <i>et al.</i> , 2015)
<i>Galactomyces geotrichum</i> MTCC 1360/ <i>Brevibacillus laterosporus</i> MTCC 2298	Efluente textil con colorantes sulfónicos, azoicos, reactivos y dispersos.	Reducción de BOD y DQO en 68 y 74% respectivamente en 48 h.	Consortio levadura bacteria.	(Kurade <i>et al.</i> , 2012)
	Colorante scarlet RR	Reducción del color en 98% en 16 h.	Cultivo del hongo con la presencia de veratril alcohol oxidasa, tirosinasa, lacasas y NADH-DCIP	
<i>Citrobacter freundii</i> A1, <i>Enterococcus casseliflavus</i> C1 y <i>Enterobacter cloacae</i> L17 (bacteria/bacteria/bacteria)	Rojo ácido 27	100% de la remoción atribuida a decoloración/degradación: 20 min/48h	Microorganismos del consorcio. No se determinó la actividad enzimática	(Chan <i>et al.</i> , 2012)
<i>Galactomyces geotrichum</i> MTCC 1360/ <i>Bacillus sp.</i> VUS	Café 3REL, Azul brillante G, Azul navy, Amarillo café y Remazol rojo a 50 mg l ⁻¹ de cada uno	100% de decoloración en 24, 9 y 8 h para Azul brillante G, Azul Navy y Amarillo café, con un pH óptimo de 7 a 50 °C	Acción enzimática	(Jadhav <i>et al.</i> , 2008)
	Café 3REL	100% de decoloración en 2 d con un pH óptimo de 7 a 50 °C para café 3REL.	Acción enzimática de lignino peroxidasa, tirosinasa y rivo flavino reductasa	

2.1.7. Eliminación de colorantes con consorcios

Hay pocas aplicaciones prácticas basadas en monocultivos de hongos o bacterias para el tratamiento de colorantes azoicos, de hecho la mayoría de estudios sobre monocultivos se enfocan en esquemas a nivel laboratorio. Utilizar monocultivos en la eliminación de colorantes en plantas de tratamiento podría implicar una susceptibilidad a contaminación biológica (Lu *et al.*, 2009), baja producción de enzimas decolorantes (Jadhav *et al.*, 2008; Kuhar *et al.*, 2015), complejas condiciones abióticas (O'Neill *et al.*, 1999) y desactivación de enzimática (Ayed *et al.*, 2010). También hay que considerar que pocos microorganismos usan al colorante como fuente de carbono y energía, requiriendo forzosamente agregar algún compuesto que se asimile como fuente de carbono y energía, esto en consecuencia puede elevar los costos de producción (Gahlout *et al.*, 2013).

Más en específico, para la degradación de colorantes con monocultivos bacterianos en condiciones aeróbicas, la eficiencia es baja porque el oxígeno es mejor aceptor de electrones que el colorante (Ayed *et al.*, 2010).

Es característico de los consorcios microbianos que al colorante se le transforme en etapas y en distintas posiciones de la molécula a través de la combinación de múltiples reacciones en las que los metabolitos generados por un microorganismo son el sustrato de otro microorganismo (Jadhav *et al.*, 2008; Kurade *et al.*, 2012).

Con el reporte de Jadhav *et al.*, (2008) basado en el estudio de la decoloración del compuesto azoico café 3REL a través del consorcio formado por *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360 y *Bacillus sp.* VUS, se observó 100% de decoloración en 2 h, mientras que con los monocultivos hubo menor decoloración en mayor tiempo: *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360 con 39% en 24 h y *Bacillus sp.* VUS con 100% en 5 h. El autor observó que las enzimas lignina peroxidasa, tirosinasa y rivo flavina reductasa tuvieron un sinergismo que se tradujo en una mejor decoloración (Jadhav *et al.*, 2008). De forma semejante Kuhar *et al.*, (2015) reportaron como la eficiencia en la decoloración de verde de malaquita aumentó 3 veces, en comparación con los monocultivos, durante su tratamiento con el consorcio formado por *Ganoderma lucidum* y

Trametes versicolor. Las nuevas isoformas de la lacasa producidas por el consorcio podrían ser las responsables del aumento en la eficiencia.

Hay que destacar que los consorcios de hongos y bacterias para la eliminación de colorantes son poco comunes, sin embargo, representan un potencial para mejorar los procesos de degradación de colorantes, los siguientes trabajos muestran este hecho. En el trabajo de Kurade *et al.*, (2012) fue el consorcio de *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360 y *Brevibacillus laterosporus* MTCC 2298 el responsable de decolorar Scarlet RR al 98% en 18 h, bajo condiciones estáticas. El crecimiento en consorcio modificó la producción de veratril alcohol oxidasa, lacasas, tirosinasa y NADH-DCIP reductasa. Es decir que las reacciones implicadas en la transformación del colorante fueron diferentes a las del monocultivo de *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360, a juzgar por los perfiles de enzimas producidas y por los análisis de GC-MS. Se debe enfatizar que *Brevibacillus laterosporus* MTCC 2298 es una bacteria empleada principalmente para el control biológico de insectos, nematodos, moluscos y plantas patógenas (Ruiu, 2013) y no precisamente para la degradación de colorantes, aunque con el trabajo de Kurade *et al.*, (2012) se demuestra que interacciones benéficas se pueden encontrar con este microorganismo.

La perspectiva del diseño de consorcios necesariamente requiere de conocer la manera en que cada miembro transforma al colorante, en este sentido Chan *et al.*, (2012) propusieron al consorcio bacteriano NAR-2 conformado por *Citrobacter freundii* A1, *Enterococcus casseliflavus* C1 y *Enterobacter cloacae* L17 el cual degradó al rojo ácido 27 (0.1 g l^{-1}). Se exploró el destino de los metabolitos generados, encontrando que el rojo ácido 27 pasa por un proceso de aminación, en segundo lugar una desulfonación durante una etapa de biodegradación microaerofílica, seguido de una azo reducción (etapa de decoloración que duro 2 h). Posteriormente bajo condiciones aerobias ocurre la mineralización (etapa que duro 48 h). Los autores propusieron una ruta metabólica, basados en la detección de los compuestos benzoil-CoA, protocatecate, silicilato, gentisato, catecol, ácido cinámico y 2 oxopentenoato. Al explorar el crecimiento de cada miembro del consorcio se encontró que en las etapas antes descritas el crecimiento difiere en medida en que el colorante es degradado (Chan *et al.*, 2012).

En general las bacterias anaeróbicas funcionan mejor para el tratamiento de colorantes, aunque se ha visto que en consorcio las bacterias anaeróbicas participan activamente en la eliminación

de colorantes aun en condiciones aeróbicas (Chen *et al.*, 2006). Es así como el consorcio conformado por *Sphingomonas paucimobilis*, *Bacillus cereus* ATCC14579 y *Bacillus cereus* ATCC11778, decoloró 92% de naranja de metilo, en cultivos agitados a 150 rpm durante 48 h, algunas de esas bacterias se han reportado como agentes decolorantes en condiciones anaeróbicas. Las interacciones entre los miembros del consorcio aumentaron la producción de la actividad azoreductasa, lignino peroxidasa y lacasa (Ayed *et al.*, 2010).

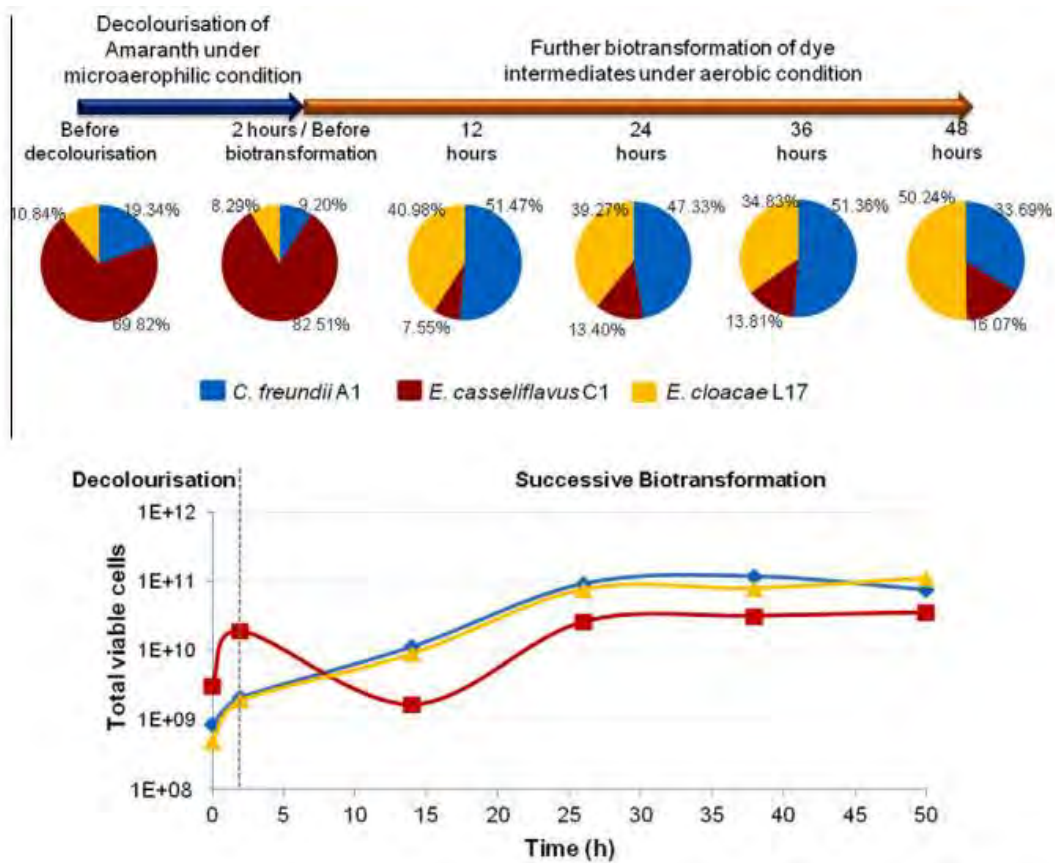


Figura 20. Dinámica de crecimiento microbiano en la degradación de rojo ácido 27. Tomado de Chan *et al.*, (2012).

En este mismo orden de ideas, la bacteria *Pseudomonas sp.* SUK1 decoloró 98% del compuesto rojo BLI en 1 h, bajo condiciones anaeróbicas (Kalyani *et al.*, 2008). También en otro estudio se demuestra como *Pseudomonas sp.* SUK1 al crecer junto con *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146, decoloran al compuesto RNB HE2R en un sistema de fermentación en estado sólido (Kadam *et al.*, 2011). En apariencia *Pseudomonas sp.* SUK1 requiere de anaerobiosis para decolorar,

aunque el trabajo de Lade *et al.*, (2012) demostró que *Pseudomonas sp.* SUK1 en consorcio con *A. ochraceus* NCIM-1146 pudo degradar Rubine GFL, en un sistema líquido con agitación bajo condiciones aeróbicas. La comparación de los trabajos anteriores nos sugiere que el crecimiento en consorcio aumenta la flexibilidad de adaptación de sus miembros frente condiciones abióticas no aptas para los monocultivos en decoloración.

En otras palabras, se puede decir que un organismo puede readaptar su metabolismo para cumplir con el objetivo clave del consorcio. El trabajo de Chen *et al.*, (2006) da evidencia de esto, en este estudio el consorcio formado por *Echerichia coli* DH5 α con *Pseudomonas luteola* decoloró al rojo 22 reactivo, a través de enzimas que produce *Pseudomonas luteola* en tanto que *Echerichia coli* DH5 α produce y libera metabolitos extracelulares que funcionan como agentes mediadores. Se asume que los organismos están “bajo ataque” ante la presencia de los contaminantes, por lo que ambos producen los metabolitos secundarios necesarios para desintoxicar su ambiente y propiciar su sobrevivencia.

Los compuestos derivados de la degradación de colorantes son tóxicos y requieren ser eliminados de los efluentes hasta un nivel de inocuidad (Phugare *et al.*, 2011). Es común encontrar reportes que indican una decoloración o degradación parcial, en la que se constata la presencia de compuestos derivados con posible toxicidad. Un ejemplo es el trabajo de Gavril y Hodson, (2007) quienes reportaron la decoloración del rojo ácido 27 con *Trametes versicolor*, sus análisis de FTIR mostraron la desaparición de las señales para los grupos azo mientras que aparecieron señales de compuestos aromáticos tales como naftaleno y benceno sustituidos. Las aminas aromáticas formadas durante la reducción de colorantes azoicos sulfonados, son en algunos casos bencenos sulfonados o derivados de naftaleno, los cuales presentan mayor dificultad para ser degradados. Esta baja degradabilidad se debe a la naturaleza hidrofílica de los grupos sulfonados, los cuales obstruyen su transporte a través de la membrana celular (Barsing *et al.*, 2011).

Los reportes sobre consorcios que eliminan tanto al colorante como a sus derivados son escasos. Existen microorganismos que en monocultivos demuestran la eliminación de compuestos aromáticos. Basta con mencionar a las eubacterias anaerobias halofílicas de *Haloanaerobium pravalens* DMS 2228 y *Sporohalobacter marismortui* ATCC 35420, quienes degradan

compuestos aromáticos nitro-sustituídos a sus correspondientes aminas. Los compuestos degradados incluyen nitrobenzeno, *o*-nitrofenol, *m*-nitrofenol, *p*-nitrofenol, nitroanilinas, 2,4-dinitrofenol y 2,4-dinitroanilina, en concentraciones de 50 a 100 mg^l⁻¹ (Oren *et al.*, 1991). Análogamente *Pseudomonas putida* B2 degrada *o*-nitrofenol y *m*-nitrofenol, con la subsecuente liberación de nitrito y amonio, respectivamente. La cepa de *P. putida* B2 emplea una ruta oxidativa para degradar al *o*-nitrofenol y una ruta reductiva para el *m*-nitrofenol (Zeyer *et al.*, 1986).

A causa de las limitaciones que presentan los mediadores químicos y naturales en la producción de lacasas, hay una tendencia por reemplazarlos por los cultivos en consorcio, como inductores biológicos, puesto que esta clase de sistemas proporcionan mejoras en la productividad y la formación de nuevas isoformas de lacasas, que podrían tener nuevas aplicaciones. El aumento del rendimiento de lacasas en cultivos con consorcios está relacionado con cambios morfológicos y alteraciones en los patrones de crecimiento de sus miembros, una competencia por el sustrato y la generación de metabolitos secundarios que estimulan el crecimiento de los hongos productores. Además, los consorcios mejoran la eliminación de colorantes de las aguas residuales mediante la producción de enzimas que actúan sinérgicamente. El crecimiento en consorcios permite una adaptación metabólica que cambia los patrones de producción enzimática, promoviendo diferentes formas de degradación del colorante. La mayoría de reportes considerados en esta revisión, discute el uso de consorcios sin un análisis previo para la formación del mismo, de tal manera que las evidencias mostraron que hubo consorcios que no mejoraron el bioproceso aquí discutido. Es necesario un enfoque en el diseño de consorcios para el tratamiento de aguas residuales que considere las propiedades degradativas de los microorganismos en monocultivo, la adaptación de sus rutas metabólicas, la reutilización de los metabolitos producidos durante la degradación de un colorante y la factibilidad para crecer compartiendo espacio y recursos nutrimentales. Una posibilidad en el diseño debería tomar en cuenta a los hongos como productores de enzimas decolorantes y a las bacterias como degradadores de los compuestos derivados de decoloración. Por lo tanto, el diseño del consorcio podría mejorar las tecnologías disponibles para el tratamiento de efluentes textiles.

2.1.8. Modelos matemáticos

2.1.8.1. El primer paso: los modelos conceptuales

Los modelos se diseñan considerando solo algunos aspectos de objeto de estudio; mientras que otros aspectos son abstraídos. Por ejemplo, el modelo muy conocido es el de barras y esferas que describen a las estructuras químicas, el modelo considera unicamente los enlaces de las moléculas pero no considera el resultado de la polaridad entre sus átomos (Brian, 2012). Los biólogos regularmente hacen uso de modelos tangibles con el “mundo real”. Estos pueden ser tan simples como el barras y esferas, o complejos, tales como los modelos de organismos, o enfermedades de animales, entre otros. La base de cualquier modelo matemático es el modelo conceptual, que se conciben como la descripción verbal del sistema y son descritos a través de diagramas que ilustran el conjunto de componentes y los caminos en los cuales interactúan (Ver **Figura 21**).

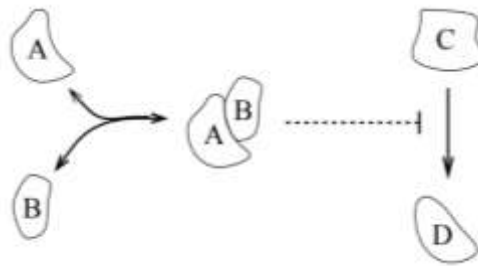


Figura 21. Un diagrama de interacción. La especie molecular A y B se une reversiblemente para formar una molécula compleja. Esta compleja inhibe la velocidad a la cual la molécula de la especie C es convertida a la especie D. (La flecha incompleta indica inhibición y represión. La línea punteada significa que se trata de interacción regulatoria en la que el complejo no se consume) (Brian, 2012).

Una desventaja de los modelos conceptuales es que pueden dejar una gran ambigüedad con respecto al comportamiento del sistema, especialmente cuando la red de interacción implica retroalimentación. Al utilizar una descripción matemática del sistema, podemos eliminar la incertidumbre en el comportamiento del modelo, a costa de exigir una representación cuantitativa de cada una de las interacciones en el modelo conceptual (Brian, 2012).

Como ejemplo, supongamos que, como en la **Figura 21**, las especies moleculares A y B se unen para formar un complejo. Para cuantificar esa interacción, se debe proporcionar una descripción numérica del proceso. En algunos casos, puede ser suficiente proporcionar la constante de equilibrio para la reacción. En otros casos, se necesitan tasas separadas de unión (asociación) y desvinculación (disociación). Para una gran cantidad de procesos celulares, nuestro nivel actual de conocimiento no admite una descripción cuantitativa: solo tenemos una comprensión cualitativa de las interacciones moleculares relevantes. Sin embargo, para un número creciente de mecanismos bien estudiados, se han recopilado datos suficientes para permitir este tipo de caracterización cuantitativa (Brian, 2012).

Cuando se conocen los datos cuantitativos relevantes, el modelo conceptual se puede usar para formular un modelo matemático dinámico. El modelo resultante consiste de un conjunto de ecuaciones que describen el funcionamiento del sistema.

2.1.8.2. Modelos matemáticos dinámicos

Las descripciones cuantitativas de las interacciones entre microorganismos suelen invocar las leyes de la física y la química. Los modelos resultantes son, por lo tanto, mecanicistas: describen los mecanismos que impulsan el comportamiento observado. Cada componente de un modelo mecanístico representa algún aspecto del sistema que se estudia; las modificaciones en los componentes del modelo imitan las modificaciones al sistema real (Brian, 2012).

La investigación de modelos mecanísticos sigue dos caminos complementarios. El enfoque más directo es la simulación del modelo, en la que el modelo se utiliza para predecir el comportamiento del sistema (en determinadas condiciones). Las simulaciones a veces se denominan experimentos *in silico*, porque usan computadoras para imitar el comportamiento de los sistemas biológicos. Las simulaciones se llevan a cabo mediante paquetes de software numéricos (Brian, 2012).

Los modelos matemáticos dinámicos sirven de ayuda para la investigación biológica de varias maneras. El acto de construir un modelo exige una consideración crítica de los mecanismos que subyacen a un proceso biológico. Este proceso riguroso y reflexivo puede revelar inconsistencias en un modelo conceptual y resaltar las lagunas de conocimiento previamente inadvertidas. Una

vez que se ha construido un modelo, sirve como una descripción transparente del sistema y se puede comunicar inequívocamente (Brian, 2012).

Tanto un modelo conceptual como un modelo matemático son manifestaciones de una hipótesis: corresponden a las descripciones putativas de un sistema y su comportamiento. La ventaja de un modelo matemático es que es una "hipótesis de trabajo", en el sentido de que su comportamiento dinámico puede ser inequívocamente investigado. Aunque las simulaciones de modelos nunca reemplazarán los experimentos de laboratorio, un modelo permite probar el comportamiento del sistema de formas que no serían posibles en el laboratorio. Las simulaciones pueden llevarse a cabo rápidamente (a menudo en segundos) y no implican un costo real. El comportamiento del modelo se puede explorar en condiciones que nunca se podrían lograr en un laboratorio. Todos los aspectos del comportamiento del modelo se pueden observar en todos los puntos temporales. Además, el análisis de modelos arroja información sobre por qué un sistema se comporta de la manera en que lo hace, proporcionando así enlaces entre la estructura de la red y el comportamiento (Brian, 2012).

Como un modelo es una hipótesis, los resultados de la investigación modelo son en sí mismos hipótesis. Las simulaciones no pueden predecir definitivamente el comportamiento celular, pero pueden servir como guías valiosas para el diseño experimental, indicando vías prometedoras para la investigación, o revelando inconsistencias entre nuestra comprensión de un sistema (incorporado en el modelo) y las observaciones de laboratorio. De hecho, la identificación de tales inconsistencias es un beneficio clave del modelado. Debido a que un modelo puede ser exhaustivamente investigado, se deduce que un resultado negativo -la incapacidad de un modelo para replicar observaciones experimentales- puede tomarse como una falsificación de las hipótesis sobre las que se construyó el modelo. Esto puede llevar a un refinamiento de las hipótesis biológicas y, posteriormente, a un modelo refinado, que luego puede probarse contra experimentos adicionales. Este proceso iterativo conduce a una comprensión continuamente mejorada del sistema en lo que se ha llamado un "ciclo virtuoso" (Brian, 2012).

2.1.8.3. Características básicas en los modelos matemáticos dinámicos.

Los componentes principales de un modelo matemático dinámico corresponden a las especies moleculares, microorganismos u otros, involucrados en el sistema (que se representan en el

diagrama de interacción correspondiente). La abundancia de cada especie se asigna a una variable de estado dentro del modelo. La colección de todas estas variables de estado se llama estado del sistema. Proporciona una descripción completa de la condición del sistema en un momento dado. El comportamiento dinámico del modelo es el curso de tiempo para la recopilación de variables de estado (Brian, 2012).

Además de las variables de estado, los modelos también incluyen parámetros, cuyos valores son fijos. Los parámetros del modelo caracterizan las interacciones entre los componentes del sistema y con el entorno. Los ejemplos de parámetros del modelo son: constantes de asociación, velocidades de expresión máxima, tasas de degradación y concentraciones moleculares tamponadas. Un cambio en el valor de un parámetro de modelo corresponde a un cambio en las condiciones ambientales o en el sistema mismo. En consecuencia, los parámetros del modelo se mantienen típicamente a valores constantes durante la simulación; estos valores se pueden variar para explorar el comportamiento del sistema bajo perturbaciones o en entornos alterados (por ejemplo, bajo diferentes condiciones experimentales) (Brian, 2012).

2.1.8.4. Comportamiento de estado estable y comportamiento transitorio.

Las simulaciones de modelos dinámicos representan un comportamiento del sistema variable en el tiempo. Los modelos de procesos biológicos casi siempre llegan, a largo plazo, a comportamientos constantes. Más comúnmente, los modelos exhiben un estado de funcionamiento persistente, llamado estado estacionario; algunos sistemas muestran oscilaciones sostenidas. El curso de tiempo que conduce desde el estado inicial hasta el comportamiento a largo plazo (o asintótico) se denomina transitorio. En algunos casos, nos enfocaremos en el comportamiento transitorio, ya que refleja la respuesta inmediata de un sistema a la perturbación. En otros casos, nuestro análisis se referirá solo al comportamiento de estado estacionario, ya que refleja la condición prevaleciente del sistema durante períodos de tiempo significativos (Brian, 2012).

2.1.8.5. Linealidad y no linealidad

Una relación se llama lineal si es una proporcionalidad directa. Por ejemplo, las variables x e y están linealmente relacionadas por la ecuación $x = ky$, donde k es una constante fija. La linealidad permite la extrapolación sin esfuerzo: una duplicación de x conduce a una duplicación

de y , independientemente de sus valores. Las relaciones lineales que implican más de dos variables son igualmente transparentes, $x = k_1y + k_2z$. Un modelo matemático dinámico se denomina lineal si todas las interacciones entre sus componentes son relaciones lineales. Esta es una condición altamente restrictiva y, por consiguiente, los modelos lineales muestran solo un rango limitado de comportamientos (Brian, 2012).

Cualquier relación que no sea lineal se denomina (como era de esperar) no lineal. Las relaciones no lineales no necesitan seguir un patrón específico, por lo que son difíciles de abordar con cualquier generalidad. Las no linealidades que aparecen con mayor frecuencia en las interacciones bioquímicas y genéticas son saturaciones, en las que una variable aumenta con otra a una tasa decreciente, de modo que la variable dependiente tiende a un valor limitante o asintótico. Dos tipos de relaciones saturantes que se reportan frecuentemente en los sistemas biológicos, se muestran en la Figura 2. El panel A muestra una saturación hiperbólica, en la que la tasa de aumento de y disminuye continuamente a medida que aumenta el valor de x . El panel B muestra una saturación sigmoidea, en la que y inicialmente crece muy lentamente con x , luego pasa a través de una fase de rápido crecimiento antes de saturarse a medida que disminuye la tasa de crecimiento (Brian, 2012).

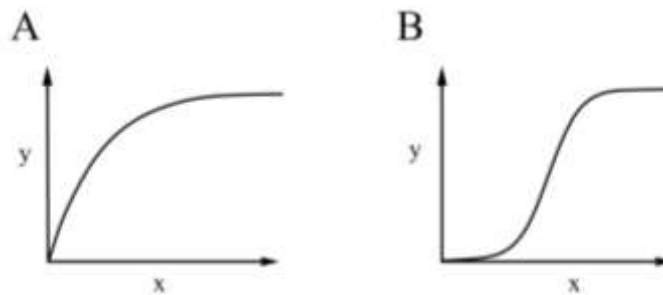


Figura 22. Relaciones no lineales comunes en los procesos biológicos. A. Saturación hiperbólica. B. Comportamiento sigmoideal.

2.1.8.6. *Comportamiento global y local*

Los modelos dinámicos no lineales exhiben una amplia gama de comportamientos. En la mayoría de los casos, un análisis detallado del comportamiento total, global, de tales modelos sería abrumador. En cambio, la atención se puede enfocar en aspectos específicos del comportamiento del sistema. En particular, al limitar nuestra atención al comportamiento cerca

de puntos operativos particulares, podemos aprovechar el hecho de que, en dominios pequeños, las no linealidades siempre se pueden aproximar mediante relaciones lineales (por ejemplo, una aproximación de línea tangente a una curva). Esta aproximación local permite aplicar herramientas de análisis lineal en este ámbito limitado (Brian, 2012).

La intuición podría sugerir que este enfoque es demasiado limitado como para ser de mucha utilidad. Sin embargo, el comportamiento global de los sistemas a menudo está estrechamente restringido por su comportamiento en torno a un puñado de puntos operativos nominales; el análisis local en estos puntos puede proporcionar una visión integral del comportamiento global. Las aproximaciones locales son de particular uso en el modelado biológico porque los sistemas autorreguladores (por ejemplo, homeostáticos) pasan gran parte de su tiempo operando en condiciones nominales específicas (Brian, 2012).

2.1.8.7. Modelos deterministas y modelos estocásticos

La noción determinista, es decir la reproducibilidad del comportamiento, es la base de gran parte de la investigación científica. Un modelo matemático se llama determinista si su comportamiento es exactamente reproducible (Brian, 2012).

Aunque el comportamiento de un modelo determinista depende de un conjunto específico de condiciones, ninguna otra fuerza tiene ninguna influencia, por lo que las simulaciones repetidas bajo las mismas condiciones siempre están en perfecto acuerdo. (Para hacer una analogía experimental, son réplicas perfectas) (Brian, 2012).

En contraste, los modelos estocásticos permiten la aleatoriedad en su comportamiento. El comportamiento de un modelo estocástico está influenciado tanto por condiciones específicas como por fuerzas impredecibles. Las repetidas simulaciones estocásticas producen muestras distintas del comportamiento del sistema (Brian, 2012).

2.1.9. Ecuaciones diferenciales y la práctica en la ingeniería

Las ecuaciones en derivadas parciales (EDP) surgen en relación con varios problemas físicos y geométricos cuando las funciones que intervienen dependen de dos o más variables independientes. Es justo señalar que sólo los sistemas físicos más sencillos pueden modelarse por ecuaciones diferenciales ordinarias (EDO), mientras que la mayoría de los problemas de

mecánica (dinámica, elasticidad) de fluidos y sólidos, transferencia de calor, teoría electromagnética, mecánica cuántica y el comportamiento de microorganismos llevan a EDP. De hecho, el rango de aplicación de estas últimas es enorme en comparación con el de las EDO (Brian, 2012).

Las leyes fundamentales de la física: la mecánica, la electricidad y la termodinámica con frecuencia se basan en observaciones empíricas que explican las variaciones de las propiedades físicas y los estados de los sistemas. Más que en describir directamente el estado de los sistemas físicos, las leyes a menudo se expresan en términos de los cambios del espacio y del tiempo (Chapra y Canale, 2011).

Tabla 4. Ejemplos de las leyes fundamentales que se describen en términos de la razón de cambio de variables (t=tiempo y x=posición).

Ley	Expresión matemática	VARIABLES Y PARÁMETROS
Segunda ley de Newton del movimiento	$\frac{dv}{dt} = \frac{F}{m}$	Velocidad (v), la fuerza (F) y masa (m)
Ley de calor de Fourier	$q = -k' \frac{dT}{dx}$	Flujo de calor (q), conductividad térmica (k') y temperatura (T).
Ley de la difusión de Fick	$J = -D \frac{dc}{dx}$	Flujo másico (J), coeficiente de difusión (D) y concentración (c).
Ley de Faraday (caída de voltaje a través de un inductor)	$\Delta v_L = L \frac{di}{dt}$	Caída de voltaje (Δv_L), inductancia (L) y corriente (i).

En la **Tabla 4** se muestran algunos ejemplos. Estas leyes definen mecanismos de cambio. Cuando se combinan con las leyes de conservación de energía, masa o *momentum*, resultan ecuaciones diferenciales. La integración subsecuente de estas ecuaciones diferenciales origina

funciones matemáticas que describen el estado espacial y temporal de un sistema en términos de variaciones de energía, masa o velocidad (Chapra y Canale, 2011).

De hecho, tales relaciones matemáticas son la base para la solución de un gran número de problemas de ingeniería. Sin embargo, muchas de las ecuaciones diferenciales de importancia práctica no se pueden resolver utilizando los métodos analíticos de cálculo. Así los métodos numéricos toman la importancia en este ámbito (Chapra y Canale, 2011).

2.1.10. Métodos numéricos

Son técnicas mediante las cuales es posible formular problemas matemáticos, de tal forma que puedan resolverse utilizando operaciones aritméticas. Aunque existen muchos tipos de métodos numéricos, éstos comparten una característica en común: invariablemente requieren un buen número de tediosos cálculos aritméticos. Con el desarrollo de computadoras digitales, los métodos numéricos en la solución de problemas en ingeniería aumentaron en forma considerable en los últimos años. A continuación, se hará una breve descripción sobre métodos numéricos para sistemas de ecuaciones diferenciales de acuerdo con Chapra y Canale, (2011).

2.1.10.1. Métodos numéricos para sistemas de ecuaciones diferenciales

Para resolver una ecuación diferencial de la forma

$$\frac{dy}{dx} = f(x,y) \text{ Ecuación 1}$$

Se utiliza un método numérico que considera el cálculo de un nuevo valor tomando en cuenta el valor anterior, la pendiente y un tamaño de paso. La forma general del argumento anterior es la siguiente:

$$\text{nuevo valor} = \text{valor anterior} + \text{pendiente} \times \text{tamaño de paso}$$

n, en términos matemáticos,

$$y(i+1) = y(i) + \Phi h \text{ Ecuación 2}$$

de acuerdo con la ecuación, la pendiente Φ se usa para extrapolar desde un valor anterior $y(i)$ a un nuevo valor $y(i+1)$ en una distancia h (**Figura 23**). Esta fórmula se aplica paso a paso para calcular un valor posterior y , por lo tanto, trazar la trayectoria de la solución.

Todos los métodos de paso que se expresen de esta forma general, tan sólo van a diferir en la manera en la que se estima la pendiente.

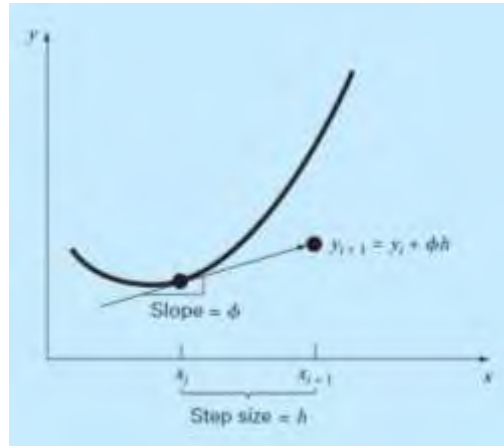


Figura 23. Ilustración gráfica del método de paso.

2.1.10.2. Método de Euler

La primera derivada ofrece una estimación directa de la pendiente en $x(i)$ Figura x:

$$\Phi = f(x(i), y(i)) \text{ Ecuación 3}$$

donde $f(x(i), y(i))$ es la ecuación diferencial evaluada en $x(i)$ y $y(i)$. La estimación se sustituye en la ecuación 1:

$$y(i+1) = y(i) + f(x(i), y(i))h \text{ Ecuación 4}$$

esta formula se conoce con método de Euler. Se predice un nuevo valor de y usando la pendiente (igual a la primera derivada en el valor original de x) para extrapolar linealmente sobre el tamaño de paso (ver **Figura 24**).

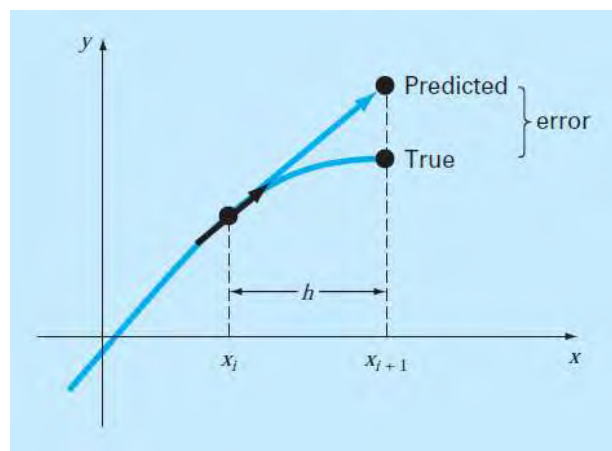


Figura 24. Método de Euler.

2.1.10.3. Método de Heun

Un método para mejorar la estimación de la pendiente emplea la determinación de dos derivadas en el intervalo (una en el punto inicial y otra en el final). Las dos derivadas se promedian después con la finalidad de obtener una mejor estimación de la pendiente en todo el intervalo (ver **Figura 25**).

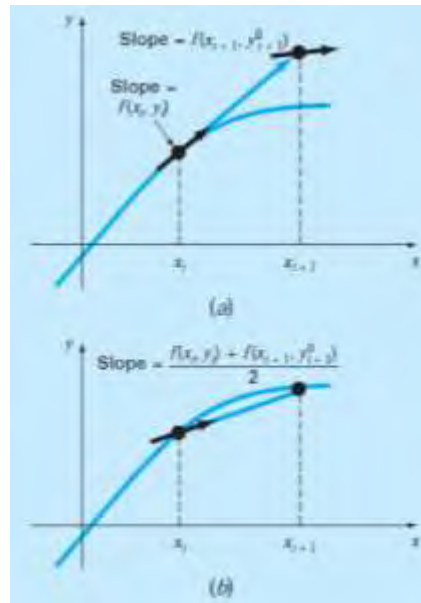


Figura 25. Representación gráfica del método de Heun. a) predictor y b) corrector.

Recuerde que en el método de Euler, la pendiente al inicio de un intervalo

$$y'(i)' = f(x(i), y(i)) \text{ Ecuación 5}$$

se utiliza para extrapolar linealmente a $y(i+1)$:

$$y^0(i+1) = y(i) + f(x(i), y(i))h \text{ Ecuación 6}$$

En el método estándar de Euler se debería parar aquí. Sin embargo, en el método de Heun la $y^0(i+1)$ calculada en la **Ecuación 6**, no es la respuesta final sino una predicción intermedia. Por consiguiente, la distinguimos con un superíndice o. La **Ecuación 6** se llama ecuación predictora. Da una estimación de $y(i+1)$ que permite el cálculo de una estimación de la pendiente al final del intervalo:

$$y'(i+1) = f(x(i+1), y^0(i+1)) \text{ Ecuación 7}$$

así se combinan las dos pendientes [Ecuaciones 4 y 6] para obtener una pendiente promedio en el intervalo:

$$\bar{y} = \frac{y'(i)+y'(i+1)}{2} = \frac{f(x(i),y(i))+f(x(i+1),y^o(i+1))}{2} \text{ Ecuación 8}$$

Esta pendiente promedio se utiliza después para extrapolar linealmente desde $y(i)$ hasta $(i+1)$ con el método de Euler:

$$y(i + 1) = y(i) + \frac{f(x(i),y(i))+f(x(i+1),y^o(i+1))}{2} h \text{ Ecuación 9}$$

2.1.10.4. Métodos de Runge-Kutta

Los métodos de Runge-Kutta (RJ) logran la exactitud del procedimiento de la serie de Taylor sin necesitar el cálculo de derivadas de orden superior. Existen muchas variantes, pero todas tienen la firma generalizada de la **Ecuación 10**:

$$y(i+1) = y(i) + \Phi (x(i), y(i), h) h \text{ Ecuación 10}$$

donde $\Phi (x(i), y(i), h)$ se conoce como la función de incremento, la cual puede interpretarse como una pendiente representativa en el intervalo. La función incremento se escribe en forma general como

$$\Phi = a_1k_1+a_2k_2+\dots+a_nk_n \text{ Ecuación 11}$$

donde las a son constates y las k son

$$k_1 = f(x(i), y(i))$$

$$k_2 = f(x(i + p_1h), y(i + q_{11}k_1h))$$

$$k_3 = f(x(i + p_2h), y(i + q_{21}k_1h + q_{22}k_2h))$$

$$k_4 = f(x(i + p_3h), y(i + q_{31}k_1h + q_{32}k_2h + q_{33}k_3h)) \dots$$

$$k_n = f(x(i + p_{n-1}h), y(i + q_{n-1,1}k_1h + q_{n-1,2}k_2h + \dots + q_{n-1,n-1}k_{n-1}h))$$

donde p y q son constantes. Observe que las k son relaciones recurrentes. Es decir, k₁ aparece en la ecuación k₂, la cual aparece en la k₃, etc. Como cada k es una evaluación funcional, esta recurrencia vuelve eficientes a los métodos RK para cálculos en computadora.

Tabla 5. Deducción de los métodos de Runge Kutta de segundo orden

<p>La versión de segundo orden de la ecuación 9 es:</p> $y(i+1) = y(i) + (a_1 k_1 + a_2 k_2) h \text{ (ecuación a)}$ <p>donde</p> $k_1 = f(x(i), y(i)) \text{ (ecuación b)}$ $k_2 = f(x(i + p_1 h), y(i + q_{11} k_1 h)) \text{ (ecuación c)}$ <p>para usar la ecuación 9 debemos determinar los valores de las constantes a₁, a₂, p₁ y q₁₁. Para ello recordamos que la serie de Taylor de segundo orden para y(i+1) en términos de y(i) y f(x(i), y(i)), se escriben como:</p> $y(i+1) = y(i) + f(x(i), y(i))h + \frac{\partial^2 f(x(i), y(i))}{2!} h^2 \text{ (ecuación d)}$ <p>donde f(x(i), y(i)) debe determinarse por derivación usando la regla de la cadena, de la siguiente manera:</p> $f'(x(i), y(i)) = \frac{\partial f(x,y)}{\partial x} + \frac{\partial f(x,y)}{\partial y} \frac{dy}{dx} \text{ (ecuación e)}$ <p>Si sustituimos la ecuación e en la ecuación d se obtiene:</p> $y(i+1) = y(i) + f(x(i), y(i))h + \left(\frac{\partial f(x,y)}{\partial x} + \frac{\partial f(x,y)}{\partial y} \frac{dy}{dx} \right) \frac{h^2}{2!} \text{ (ecuación f)}$ <p>La estrategia básica de los métodos de Runge Kutta es el uso de manipuladores algebraicos para obtener los valores de a₁, a₂, p₁ y q₁₁, que hacen equivalentes a las ecuaciones a y f.</p> <p>Para ello primero usamos una serie de Taylor para expandir la ecuación c. La serie de Taylor para una función de dos variables se define:</p>	$g(x + r, y + s) = g(x, y) + r \frac{\partial g}{\partial x} + s \frac{\partial g}{\partial y} + \dots \text{ (ecuación g)}$ <p>Si se aplica este método para expandir la ecuación c se llega a:</p> $f(x(i + p_1 h), y(i + q_{11} k_1 h)) = f(x(i), y(i)) + p_1 h \frac{\partial f}{\partial x} + q_{11} k_1 h \frac{\partial f}{\partial y} + O(h^2)$ <p>este resultado junto con la ecuación b, se sustituye en la ecuación a para obtener:</p> $y(i+1) = y(i) + a_1 h f(x(i), y(i)) + a_2 h f(x(i), y(i)) + a_2 p_1 h^2 \frac{\partial f}{\partial x} + a_2 q_{11} h^2 k_1 \frac{\partial f}{\partial y} + O(h^3) \text{ (ecuación h)}$ <p>O agrupando términos,</p> $y(i+1) = y(i) + [a_1 f(x(i), y(i)) + a_2 f(x(i), y(i))]h + [a_2 p_1 \frac{\partial f}{\partial x} + a_2 q_{11} k_1 \frac{\partial f}{\partial y}] h^2 + O(h^3) \text{ (ecuación i)}$ <p>Ahora, si comparamos términos comunes en las ecuaciones f y i, determinamos que para que las dos ecuaciones sean equivalentes, se debe satisfacer lo siguiente: (conjunto de ecuaciones j)</p> $a_1 + a_2 = 1$ $a_2 p_1 = 1/2$ $a_2 q_{11} = 1/2$ <p>las tres ecuaciones simultáneas anteriores contienen las cuatro constantes conocidas. Como hay una incógnita más que el número de ecuaciones, no existen un conjunto único de constantes que satisfaga las ecuaciones. Sin embargo, considerando un valor para una de las constantes, es posible determinar el valor de las otras tres. En consecuencia, existe una familia de métodos de segundo orden y no solo una versión.</p>
--	---

Es posible tener varios tipos de métodos de Runge Kutta empleando diferentes números de términos en la función de incremento especificada por n. Observese que en el método de Runge

Kutta de primer orden $n=1$ es, de hecho, el método de Euler. Una vez que se eligen n , se evalúan las a , p y q igualando la **Ecuación 9** a los términos de la expansión de la serie de Taylor (**Tabla 5**). Así, al menos para las versiones de orden inferior, el número de términos, n , por lo común representa el orden de la aproximación.

2.1.10.5. Runge Kutta de segundo orden

Como se describe en el **Tabla 5**, del conjunto de ecuaciones j supongamos un valor para a_2 . Entonces se resuelven la ecuaciones simultáneas obteniendo:

$$a_1 = 1 - a_2$$

$$p_1 = q_{11} = 1/2a_2$$

debido a que se pueden elegir un número infinito de valores para a_2 , hay un número infinito de métodos de Runge Kutta de segundo orden. Cada versión daría exactamente los mismos resultados se la solución de la EDO fuera cuadrática, lineal o constante. Sin embargo, se obtienen diferentes resultados cuando (como típicamente es el caso) la solución es más complicada.

2.1.10.6. Runge Kutta de tercer orden

Para $n=3$, es posible efectar un desarrollo similar al del método de segundo orden. El resultado de tal desarrollo genera seis ecuaciones con ocho incógnitas. Por lo tanto, se deben dar a priori los valores de dos de las incógnitas con la finalidad de establecer los parámetros restantes. Una versión común que se obtiene es:

$$y(i + 1) = y(i) + \frac{1}{6}(k_1 + 4k_2 + k_3)h \text{ Ecuación 12}$$

Donde

$$k_1 = f(x(i) + y(i))$$

$$k_2 = f\left(x\left(i + \frac{1}{2}h\right), y\left(i + \frac{1}{2}k_1h\right)\right)$$

$$k_3 = f(x(i + h), y(i - k_1k + 2k_2h))$$

2.1.10.7. Runge Kutta de cuarto orden

El más popular de los métodos de Runge Kutta es el de cuarto orden. Como en el caso de los procedimientos de segundo orden, hay un número infinito de versiones. La siguiente, es la forma más comunmente usada y, por lo tanto, le llamamos el método clásico de RK de cuarto orden:

$$y(i + 1) = y(i) + \frac{1}{6}(k_1 + 2k_2 + 2k_3 + k_4)h \text{ Ecuación 13}$$

Donde

$$k_1 = f(x(i) + y(i))$$

$$k_2 = f\left(x\left(i + \frac{1}{2}h\right), y\left(i + \frac{1}{2}k_1h\right)\right)$$

$$k_3 = f\left(x\left(i + \frac{1}{2}h\right), y\left(i + \frac{1}{2}k_2h\right)\right)$$

$$k_4 = f(x(i + h), y(i + k_3h))$$

La **Ecuación 13** representa un promedio ponderado de pendientes, para establecer la mejor pendiente (Figura 6).

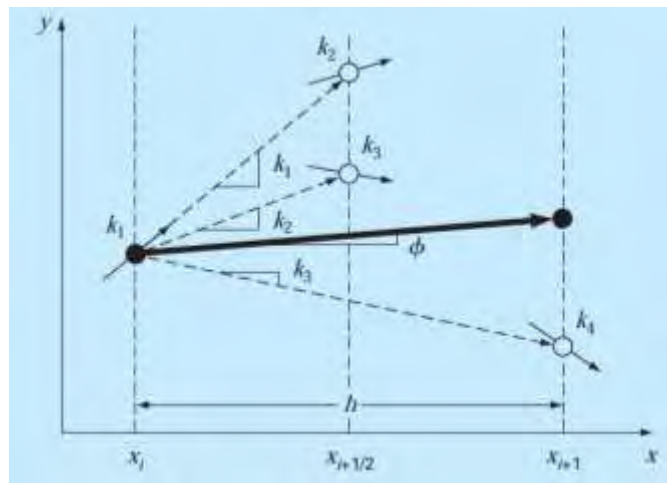


Figura 26. Representación gráfica de las pendientes estimadas empleadas en el método de RK de cuarto orden.

A través de códigos lógicos de algoritmos es posible programar los métodos numéricos antes descritos, para el presente trabajo fue relevante utilizar el software MatLab, mismo del que a continuación se hace una breve descripción.

2.1.11. Matlab versión 2017^a.

Matlab es un software producido por Mathworks, Inc. Empresa establecida por los analistas numéricos Cleve Moler y John Little. Como su nombre lo indica, MATLAB fue desarrollado en principio como un laboratorio de matrices (MATrix LABoratory). Es un sistema interactivo y lenguaje de programación para cómputo científico y técnico en general. La programación consiste en la correcta codificación de las proposiciones Matlab y su ensamble en la secuencia apropiada para alcanzar los resultados deseados. Un programa en Matlab consiste en una serie detallada de instrucciones o proposiciones organizadas en secuencia lógica para alcanzar resultados predecibles (Fernández, 2011).

Matlab es un lenguaje de alto rendimiento para cálculos técnicos, es al mismo tiempo un entorno y un lenguaje de programación. Uno de sus puntos fuertes es que permite construir nuestras propias herramientas reutilizables. Podemos crear fácilmente nuestras propias funciones y programas especiales (conocidos como M-archivos) en código Matlab, los podemos agrupar en Toolbox (también llamadas librerías): colección especializada de M-archivos para trabajar en clases particulares de problemas (Fernández, 2011).

Matlab (<http://www.mathworks.com>) es de facto un estándar en muchas áreas científicas y ya ampliamente utilizadas en sistemas biológicos. Proporciona numerosos métodos matemáticos y numéricos de última generación y una plataforma programable por el usuario, que utiliza un lenguaje de scripting simple pero potente y de alto nivel que evita la sobrecarga de programación que generalmente se presenta al desarrollar aplicaciones de software independientes. Schimidt y Jirstrand, (2006) reportaron el desarrollo de una aplicación basada en Matlab, para la solución de sistemas biológicos denominada Systems Biology Toolbox. Los usuarios encontrarán que es fácil usar la funcionalidad de Systems Biology Toolbox. Para que un usuario amplíe la funcionalidad de la caja de herramientas, se requiere conocimiento sobre el lenguaje de scripting MATLAB. Sin embargo, los usuarios que no estén familiarizados con MATLAB de antemano encontrarán

que es mucho más fácil aprender este lenguaje de scripting que aprender a programar aplicaciones independientes dependientes del sistema operativo.

En este trabajo de investigación, las bases del lenguaje de matlab fueron utilizadas en la solución de los modelos aquí discutidos.

2.2. Antecedentes

Los antecedentes directos están relacionados con un trabajo de tesis doctoral realizado por el grupo de trabajo en ciencias ambientales, este documento fue aprobado y puesto a disposición para ser consultado en el año 2013. De manera que el presente trabajo es continuidad del elaborado por Cortazar.

El dicho estudio, se evaluó cualitativamente el crecimiento de *T. versicolor* con *P. putida* durante la decoloración de rojo ácido 27. Los trabajos experimentales realizados en cajas Petri para determinar la toxicidad del colorante, la capacidad de decoloración y el crecimiento bajo diferentes condiciones fueron temas clave en la tesis doctoral. Entre los hallazgos relevantes, se encontró que *T. versicolor* con *P. putida* crecieron a 28 °C en los medios de cultivo: agar papa dextrosa, agar nutritivo y medio Kirk modificado, tomando en cuenta que el primero y el tercero, son específicos para el crecimiento de hongos.

Al estudiar el cultivo como consorcio (llamado cultivo mixto en este trabajo doctoral) en cajas Petri, resaltó que no hubo formación de halo de inhibición, lo que sugirió a la autora que ambos organismos tenían potencial para crecer juntos al menos en medios sólidos.

Se realizaron pruebas en las que al medio de cultivo se le agregó ABTS con la intención de mejorar la producción de enzimas lacasas, pues de acuerdo a los reportes que la autora refiere este compuesto es un mediador para la producción de dicha enzima. En estos experimentos se observó que cuando el consorcio fue cultivado hubo una formación de un halo de color rojizo, este hallazgo sugirió la formación del ABTS dicatión, aunque la interpretación química indicó que la interacción entre los microorganismos produjo un compuesto capaz de oxidar al ABTS.

Al realizar las pruebas de decoloración en caja Petri se observó que *T. versicolor* tuvo la capacidad de decolorar al AR27, aunque no puede utilizarlo como fuente de carbono, mientras que *P. putida* no tiene la capacidad para decolorarlo. Aunque su presencia no afectó el crecimiento de *P. putida*. Como muestra de las bondades del consorcio, se observó que decolora en menor tiempo en comparación que el monocultivo de *T. versicolor*. La decoloración inició en la zona donde se inocularon las bacterias, lo que pareció indicar que la presencia de *P. putida*

indujo el proceso de decoloración. Se iniciaron las pruebas en medio líquido para determinar las condiciones a las que se establecieron los cultivos mixtos. Se evaluó la decoloración utilizando *T. versicolor* en fase de crecimiento exponencial y como células libres, en ambas condiciones se logró la decoloración. Se realizó una prueba para establecer los cultivos mixtos utilizando pellets de *T. versicolor* con 7 días de crecimiento y 500 μl de un cultivo de *P. putida*, en medio Kirk suplementado con 1 g l^{-1} de glucosa y 30 mg l^{-1} de colorante. En estas condiciones no hubo decoloración y solamente se observó crecimiento de *P. putida*. A pesar de que *T. versicolor* fue inoculado en mayor proporción (550:1), *P. putida* utilizó la glucosa para crecer, lo cual probablemente impidió que *T. versicolor* produjera las enzimas extracelulares responsables de la decoloración. Para completar las pruebas realizadas en medio sólido, se realizaron cultivos en tubos de ensaye. La combinación *T. versicolor* con *P. putida*, a los 10 días de incubación, presentó una decoloración del 82% con respecto al tubo testigo, el cual contiene únicamente el medio Kirk con el colorante. En el cultivo sencillo de *T. versicolor* se alcanzó una decoloración del 70% hasta los 14 días de incubación. En ese mismo tiempo, en el cultivo sencillo de *P. putida*, se logró una decoloración del 30%. Esta decoloración puede deberse a la absorción del colorante en la biomasa del cultivo. Cuando se utilizó el sobrenadante de las bacterias no se observó decoloración.

El trabajo de Cortazar demostró la factibilidad del consorcio, no obstante deja de manifiesto la necesidad de abundar en el estudio de dicho consorcio. Este trabajo da el seguimiento, así como que desarrolla las condiciones y el esquema en que el consorcio debe operarse para obtener las mejores condiciones de eliminación de colorantes, de producción de enzimas lacasa.

Capítulo 3

Metodología

3.1. Esquema metodológico

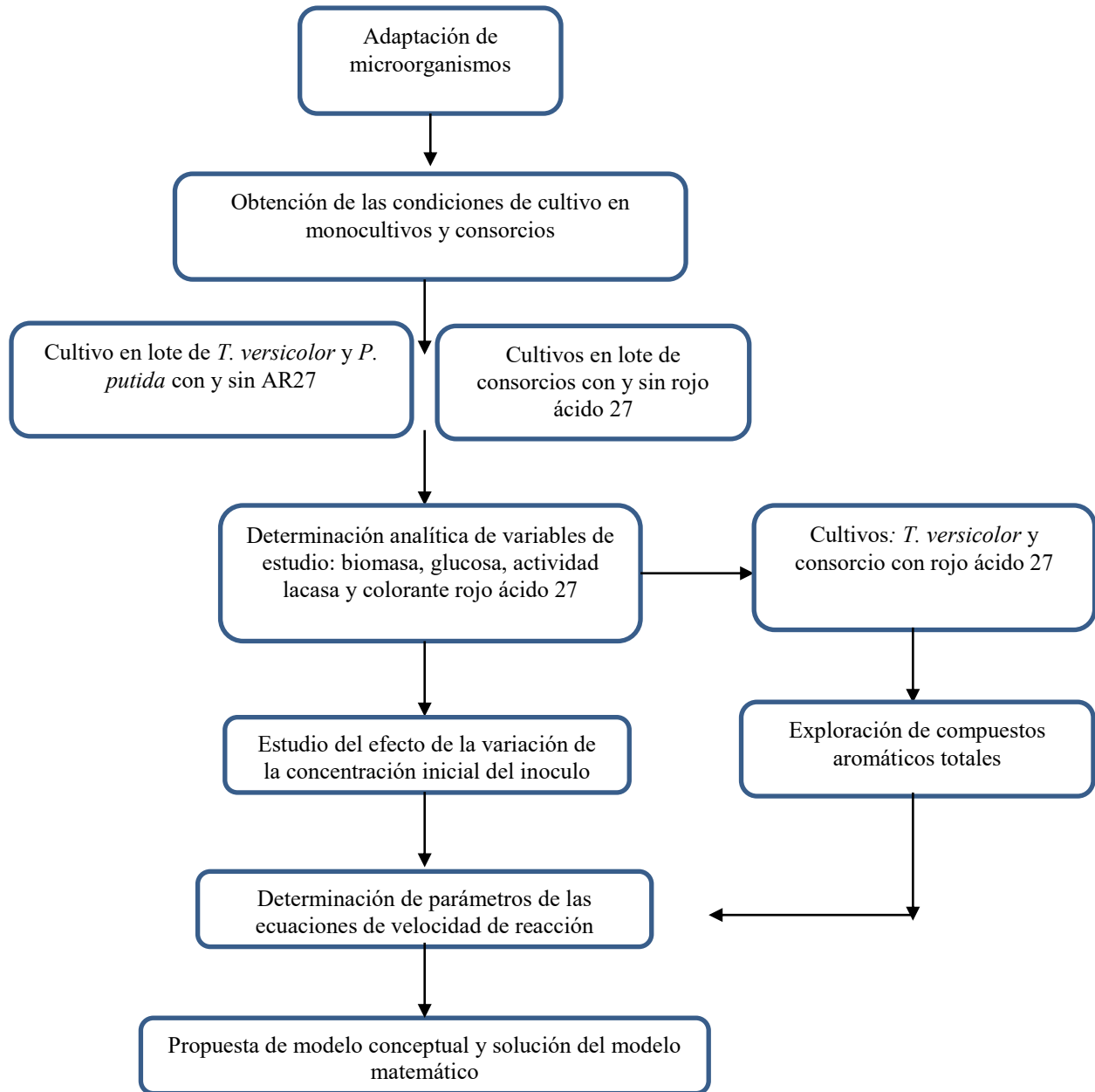


Figura 27. Esquema general de la metodología seguida en el presente estudio.

3.2. Compuestos químicos, reactivos y cepas microbianas

El hongo *Trametes versicolor* ATCC 20869 y la bacteria *Pseudomonas putida* CBB-B-100 fueron proporcionados por el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), México, D.F. La cepa de *T. versicolor* se preservó en agar dextrosa papa (PDA), en el mismo agar se preparó el inóculo. La cepa de *P. putida* se reactivó en medio salino con 0.2 g l^{-1} de tolueno más 0.2 g l^{-1} fenol, se preservó en agar nutritivo y posteriormente para la preparación del inóculo se cultivó en caldo de soya de tripticaseína (TCS). El colorante rojo ácido 27 (AR27) fue adquirido de la empresa Aldrich Sigma.

3.3. Preparación del consorcio

T. versicolor se sembró en el centro de la superficie de 30 ml de PDA solidificado en cajas petri, se incubó a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 240 h. Posteriormente se realizaron cortes circulares con tubos de polipropileno estériles con diámetro de 1.25 cm. Para conocer la cantidad de masa fúngica, un corte circular se depositó en un recipiente a peso constante, se secó durante 24 h en un horno a $90 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Por diferencia de peso entre círculos con y sin micelio, se obtuvo que hubo 0.0255 g (± 0.0100) de masa fúngica en 4.91 cm^2 .

P. putida se sembró por estría en agar nutritivo y se incubó a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. Posteriormente, una azada de bacterias se transfirió a un matraz Erlenmeyer con 50 ml de caldo soya tripticaseína (CST) (marca DIBICO) estéril. El matraz se introdujo a una incubadora orbital (IKA 3000) a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ con 130 rpm de agitación orbital durante 20 h. Después, se tomaron 5 ml del cultivo y se centrifugaron a 5000 rpm (marca SPROUT) durante 15 min, el sobrenadante se decantado y se lavó con 5 ml de agua destilada. La suspensión se depositó en un recipiente y se introdujo a un horno a $90 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. Por gravimetría se determinó que a las 20 h hubo 0.38 g l^{-1} de masa bacteriana. El cultivo para preparar inóculo fue referido como CTS-20h.

3.4. Crecimiento y producción de lacasas en monocultivos y consorcio

El crecimiento del *T. versicolor* y de *P. putida* se realizó en medio de cultivo Kirk elaborado como se ha reportado (Kirk, 1985), con la diferencia de que usamos 4 g l^{-1} de glucosa y 0.2 g l^{-1} de tartrato de amonio (Kirk modificado), para conseguir una relación carbono nitrógeno de 53.3

para producir lacasas. En matraces Erlenmeyer con 50 ml de medio Kirk modificado y para monocultivos se sembraron: a) 0.025 g de *T. versicolor* o b) 0.004 g de *P. putida*. Para los consorcios, la siembra fue con 0.025 g de *T. versicolor* al inicio del proceso y 72 h después 0.004 g de *P. putida*.

Tanto en monocultivos como en los consorcios, se evaluó la presencia de 0.2 gl^{-1} del AR27 (Aldrich Sigma, Toluca, México). El medio Kirk modificado con AR27 se denominó medio de decoloración. El pH óptimo de crecimiento para el hongo es de 4.5 (Gavril y Hodson, 2007) y se evaluó en el cultivo de *P. putida*. Todos los experimentos se incubaron a 30 °C y 130 rpm de agitación orbital (IKA 3000). En la **Tabla 6** se muestran las condiciones experimentales.

Para los monocultivos y los consorcios de *T. versicolor*, periódicamente se determinó la biomasa, concentración de glucosa, la actividad lacasa y la concentración de AR27. Para *P. putida* se determinó la biomasa y concentración de glucosa.

Tabla 6. Concentración de colorante AR27, pH y tiempo de cultivo.

Especies	AR27 concentración (gl^{-1})	pH	Tiempo (horas)
<i>T. versicolor</i>	0.2	4.5	250
<i>T. versicolor</i>	0	4.5	250
<i>P. putida</i>	0.2	7.0	24
<i>P. putida</i>	0	4.5	24
<i>P. putida</i>	0.2	4.5	24
<i>T. versicolor/P. putida</i>	0.2	4.5	250
<i>T. versicolor/P. putida</i>	0	4.5	250

3.5. Determinación de biomasa

Tanto en los monocultivos y los consorcios con *T. versicolor* se usó todo el medio de cultivo (50 ml) de cada matraz, el cual se vertió en un SterifilSystem (Millipore XX1101700), provisto con

filtros de micro fibra de vidrio GFC (Whatman 1822-047), con tamaño de poro de 1.6 μm . Se secaron durante 24 h a 90 °C. La biomasa se determinó por gravimetría.

Para *P. Putida* se centrifugaron 5 ml de muestra a 5000 rpm durante 15 min, se eliminó el sobrenadante y se lavó con 5 ml de agua destilada, el contenido se depositó en un recipiente y fue secado durante 24 h a 90 °C. La biomasa se determinó por gravimetría.

A las 130 h de incubación del consorcio con AR27, se contó el número de pellets, después tanto muestras de pellets fúngicos como de medio de cultivo, se tiñeron usando el método de Gram y se observaron con microscopio óptico. Se observó que las bacterianas estaban en el medio líquido y asociadas a los pellets.

Tabla 7. Método para separación de biomasa del consorcio.

Etapa de filtración	Observaciones de la prueba de gram en medio filtrado	Consideración para biomasa
Cultivo directo	Presencia de bacterias y de micelio abundantes (+++)	Fúngica
Filtrado con membrana de 8 μm de tamaño de poro	Presencia de bacterias y levaduras (++)	Fúngica
Filtrado con membrana de 2.5 μm de tamaño de poro	Presencia de bacterias y levaduras (+)	Bacteriana
Filtrado con membrana de 1.6 μm de tamaño de poro	No se observó la presencia de bacterias y levaduras	Bacteriana

Un caso particular para la cuantificación de biomasa se presentó, porque previo a la determinación gravimétrica era necesario separar la biomasa del hongo y de la bacteria. Es por lo que fue necesario utilizar una combinación de membranas para filtrar con base en el tamaño de los microorganismos. El procedimiento que no se ha reportado en la literatura pero aquí se implementó se elaboró con base en los resultados mostrados en la Tabla 7.

La biomasa fúngica fue obtenida en con la membrana de 8 μm de tamaño de poro. Para la obtención de biomasa bacteriana se usó lo retenido en las últimas dos membranas. Se debe tomar

en cuenta que en lo retenido en la de 8 μm , naturalmente hay bacterias presentes que pueden estar o no asociadas al micelio o levaduras fúngicas, no obstante, fue tomado en cuenta ese hecho al momento de los cálculos.

Para la determinación de glucosa, la actividad lacasa y del colorante AR27, se separó el medio de cultivo de la biomasa; la de *T. versicolor* en filtros de micro fibra de vidrio GFC y para *P. putida* en membranas de celulosa.

3.6. Determinación de glucosa

Fue determinada mediante el método fenol-ácido sulfúrico previamente reportado (Dubois *et al.*, 1956). El método consistió en verter en un tubo de vidrio, 40 μl de medio de cultivo, 1960 μl de agua, 242 μl de fenol (al 80%) y por goteo 5 ml de ácido sulfúrico. La mezcla se dejó en reposo durante 40 min a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 485 nm en un espectrofotómetro (JENWAY 6320D). La absorbancia fue comparada con una curva estándar de D-glucosa (J.T. Baker), para determinar la concentración de glucosa en la muestra problema.

3.6.1. Ricciocarpus natans como fuente de carbono alterna

Las muestras de *Ricciocarpus natans* fueron obtenidas de la laguna de Tecocomulco (sitio RAMSAR en el estado de Hidalgo) la cual es una laguna en una cuenca de más de 56 000 hectáreas a 29 km de Tulancingo, 39 km de Pachuca y 115 km de la Ciudad de México. Esta planta acuática crece sobre la superficie de agua y además a través de sus raíces forma asociaciones con otros microorganismos.

Para evaluar a la planta acuática *Ricciocarpus natans* como una alternativa para proveer de fuente de carbono al consorcio biológico se realizaron las siguientes pruebas.

Las plántulas de *R. natans* se lavaron en agua desmineralizada (sin esterilizar), para eliminar protozoarios, y partículas adheridas a la raíz de la planta, a través de 12 h en agitador a temperatura ambiente. En matraces de 250 ml se agregaron 100 ml de medio Kirk sin glucosa, a pH de 4.5 más 5 pellets de *T. versicolor* (pre-crecidos durante 100 h) en los que se inocularon 10, 20 y 30 plántulas de *R. natans*. Los matraces se agitaron a 100 rpm a temperatura ambiente, con periodos de iluminación de 24 h y 24 h ausencia de luz. Se determinó la producción de glucosa

en el medio de cultivo, la producción de lacasas y la morfología de las plántulas y los pellets fúngicos.

3.7. Determinación de la actividad lacasa

Fue determinada mediante el método de oxidación de 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) (ABTS) previamente reportado (Bourbonnais, 1990): se mezclan 200 µl de buffer de acetato de sodio (0.1 M), 1600 µl de la muestra y 200 µl de ABTS (0.5 mM), a 40 °C. Después de agregar al ABTS, la mezcla se introdujo a un espectrofotómetro (JENWAY 6320D) a 420 nm. Durante 3 min en intervalos de 10 segundos, se midió la absorbancia. Se graficó la absorbancia contra el tiempo y se calculó la pendiente que fue utilizada para calcular la actividad lacasa, considerando que una unidad de lacasa se define como la cantidad de enzimas capaces de oxidar 1 µmol de ABTS por minuto por litro (U^l), bajo condiciones estándares. El coeficiente de extinción del ABTS a una absorbancia de 420 nm es de 36000 M⁻¹cm⁻¹.

3.8. Determinación de AR27

Fue medida por espectrofotometría a 521nm (Behnajady *et al.*, 2007) y comparada con una curva estándar, asegurando que las mediciones estén dentro del rango de absorbancia de 0.05-0.8.

3.9. Efecto del inóculo bacteriano en la variación de la biomasa fúngica y la actividad lacasa

Se evaluó el efecto del inóculo bacteriano lavado, sin lavar, y sin lavar-filtrado-esterilizado (SLFE; sin bacterias). Los experimentos se realizaron en matraces Erlenmeyer con 50 ml de medio de decoloración, se sembraron 0.0255 g de *T. versicolor* y se incubaron a 30 °C durante 72 h a 130 rpm, posteriormente se agregó el inóculo bacteriano de tres maneras; a) sin lavar del CTS-20h, b) lavado del CTS-20h, mediante centrifugación a 5000 rpm durante 15 min, se decantó el sobrenadante y se sustituyó por solución salina isotónica y c) sin lavar-filtrado-esterilizado en el que 5 ml de CTS-20h que se filtraron con membrana de celulosa (Whatman10404106) y se esterilizaron durante 15 min a 121 °C y 1 atm. Se evaluaron cuatro concentraciones del inóculo sin lavar y lavado (gl⁻¹): 0.0276, 0.0828, 0.1656 y 0.2760. Los matraces con ambos microorganismos y el monocultivo con SLFE, se incubaron a 30 °C y 130

rpm durante 72 h. Posteriormente se determinó la concentración final de masa fúngica y la actividad lacasa.

3.10. Compuestos aromáticos

No se contaba con datos sobre los compuestos derivados de la decoloración de AR27. Por lo que fue necesario buscar a través de datos de literatura, los posibles subproductos generados de la decoloración de AR27, considerando tratamientos tanto de biodegradación como de técnicas fisicoquímicas, los trabajos revisados se muestran en la siguiente tabla.

De los compuestos de la **Tabla 8**, se eligieron aquellos que estuvieran disponibles en laboratorio y los que presentaran alguna forma de toxicidad, a este grupo de compuestos aromáticos se les denominó como compuestos aromáticos totales (CAT). Los CAT elegidos fueron: naftaleno, benceno, tolueno, ácido benzoico, catecol y anilina.

Se utilizó un cromatógrafo de gases de aplicaciones múltiples marca Agilent Technologies 7890B GC System Analytical control by PAC con detector FID. Provisto de una columna capilar de fase estacionaria HP-5 ((5%-fenil)-metilpolisiloxano) no polar, de 30 m x 0.320 mm x 0.25 μm , con límites de temperatura de -60°C hasta 325°C (350°C Pgm).

El método del GC-FID que permite la detección, separación y cuantificación de los CAT se describe a continuación. Se usó un volumen de 2.5 μl , un modo de entrada de (inlet) tipo split con un ratio de división de 0.1:1, flujo de 0.3 mlmin^{-1} , temperatura de 230°C , presión de 773.564 kPa, un flujo total de 6.3 mlmin^{-1} , flujo de purga del septo estándar y con gas servidor de 20 mlmin^{-1} . En las características de la columna se usaron un flujo inicial de 3 mlmin^{-1} , una presión de 77.564 kPa, velocidad promedio de 44.716 cmseg^{-1} con tiempo de espera de 1.163 min. Se usó una rampa de presión en la columna la cual inició con de 3 mlmin^{-1} con tiempo de espera de 1 min, seguido de 25 mlmin^{-1} que incrementaron a una velocidad de 50 mlmin^{-2} con un tiempo de espera de 3.17 min, después disminuyendo a la misma velocidad se llevó el sistema a 5 mlmin^{-1} durante 1.89 min y finalmente se aumentó a la misma velocidad hasta 20 mlmin^{-1} sin tiempo de espera.

Tabla 8. Subproductos en la transformación biológica y fisicoquímica del AR27.

Tipo de técnica	Subproductos generados	Referencia
Reacción fotocatalítica con H₂O₂ más 125 ml de C₂H₅OH y TiO₂ de diferentes tamaños de partícula (0.5 gm a 142 nm y de 0.25 gm a 50 nm) a temperatura ambiente. La mezcla se irradió con lámpara de mercurio (1000 watt) en una atmosfera de nitrógeno.	3,4-dioxo-3,4-dihidro-naphthaleno-2,7-disulfonate (c1) , disódico -3,4-dihidroxi -3,4-dihidro-naphthalene-2,7-disulfonato (c2) ysodio-4-hidroxi-naftaeno-1-sulfonato (c3)	(Elgendy y Al-Zahrani, 2013)
Reacción fotocatalítica: radiación con lámparas de mercurio con nano partículas de ZnO y oxigenación	1-amino-2,3,5-trihidroxi-naftaleno (c1), 1-amino-2,3-dihidroxi-benceno (compuesto 2), catecol (compuesto 3), O-benzoquinona (compuesto 4), ácido maleico (compuesto 5), compuestos del ciclo de Krebs.	(Shanti y Kuzhalsai, 2012)
Biodegradación utilizando consorcio biológico de bacterias anaeróbicas y micro aeróbicas	Naftaleno, 1,2,3-triol (c1), Naftaleno (c2), 3,4-dihidroxi-naftaleno-2,7-disulfonato (c3), 5,6,7-trihidroxi-naftaleno-2-sulfonato (c4), naftaleno-1,2,4-triol (c5), benzoato (c6), 2-(carboxiacetil) ácido benzoico (c7).	(chan <i>et al.</i> , 2012)
Biodegradación con <i>T. versicolor</i>	Obtención de metabolitos derivados del naftaleno y benceno sustituidos con hidroxilos, grupos sulfonicos y N=N	(Gadvril y Hodson, 2007)
Biodegradación a través del sistema mediador-lacasas	4-((oxo-3,6-disulfo-2,3-dihidroxi-naftalen-1-il) diaceni) naftaleno-1-sulfonato (c1), 4-diacetilnaftaleno-1-sulfonato (c2), naftaleno-1-sulfonato (c3) y 3,4-dioxo-7-sulfo-2,3,4,4a-tetrahidronaftaleno-2-sulfonato (c4).	(Chhabra <i>et al.</i> , 2015)
Biodegradación con el hongo <i>Armillaria sp.</i> en medio de cultivo optimizado	1,4-naftalendiol (c1), 1,2-dihidroxi-naftaleno (c2) y cumarina (c3)	(Adnan <i>et al.</i> , 2016)

El tiempo total de los flujos anteriores fue de 27.89 min. En tercer lugar, se indican las características relacionadas con el horno de calentamiento en el cual se emplearon rampas de temperatura: la primera inició en 30 °C durante un minuto, pasando a 66 °C a una velocidad de 10 °Cmin⁻¹, se aumentó la velocidad a 50 °Cmin⁻¹ para pasar a una temperatura del horno de 80 °C durante 6 min y finalmente a una velocidad de 10 °Cmin⁻¹, se llevó la temperatura del horno a

250 °C. Al acabar este ciclo de temperaturas, el equipo arranca el ventilador para ubicar la temperatura del horno a 80 °C. El detector utilizado fue uno de ionización de flama a 300 °C, con un flujo de aire de 280 mlmin⁻¹, flujo de H₂ de 90 mlmin⁻¹ y flujo de “maquillaje” con N₂ de 20 mlmin⁻¹. Este método recibió el nombre de ComAromFID, con el que se realizó la calibración de los compuestos CAT.

Las reacciones que suponen la generación de CAT corresponden a las siguientes: 1 mol de AR27 más 1 mol de lacasas, podría generar 2 moles de naftaleno, 1 mol de anilina, 2 moles de ácido benzoico, 2 moles de catecol y 2 moles de benceno tomando en cuenta la estructura del AR27 y las relaciones estequiometrias únicamente. Si la concentración inicial de AR27 es de 0.2 gl⁻¹ se espera que al menos haya (gl⁻¹): 0.084 de naftaleno, 0.030 de anilina, 0.080 de ácido benzoico, 0.072 de catecol y 0.051 de benceno. De manera que se prepararon soluciones de los 5 CAT a concentraciones de 0.01 a 1 gl⁻¹.

Las muestras de los 5 CAT se diluyeron en metanol o metanol/agua, se analizaron en secuencias de 10 muestras. El cromatógrafo de gases se controla mediante el software Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition C.01.06 el cual permite la visualización de la señal del detector FID a través de una gráfica del tiempo contra la pA (pico amperios). Como la concentración del compuesto es conocida, simplemente se asocia a la intensidad del pico.

Una vez estandarizado el método de detección de los CAT se procedió a la preparación de las muestras. Para *T. versicolor* y el consorcio con 0.2 gl⁻¹ de AR27. El volumen total de cada matraz fue filtrado para eliminar la biomasa fúngica y bacteriana. Una muestra de 10 ml fue pasada por filtros de extracción de fase reversa (Bond Elut Plexa, 200 mg. 3 ml) de la siguiente manera: 2 ml de NH₄OH (al 2%) fueron agregados a un filtro de fase reversa, se conectó al vacío para extraer a goteo dicha solución. Posteriormente se agregaron 10 ml de la muestra problema, se conectó al vacío para extraer a goteo. Enseguida se agregaron al cartucho 3 ml de metanol, que fueron extraídos por goteo. El metanol fue depositado en recipientes de 2.5 ml con tapón y septo, para su análisis en el GC-FID. Las señales fueron analizadas a través de las aplicaciones con las que cuenta el GC-FID.

3.11. Análisis estadísticos

Los experimentos se realizaron por triplicado. Las evaluaciones estadísticas de los resultados se llevaron a cabo mediante un análisis de varianza de una sola vía, con una comparación de medias con la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5%. Se utilizó el software Minitab 17 versión 17.1.0.

3.12. Modelo conceptual

Definición de los componentes del sistema:

Tabla 9. Componentes en el sistema biológico en consorcio durante la decoloración de AR27.

Componente del sistema	Símbolo	Características	Unidades de medición	Rango de valores	Condición inicial
Biomasa de bacterias	BBac	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	gl ⁻¹	0-10	0.1
Sustrato glucosa	Sglu	D-Dextrosa	gl ⁻¹	0-10	4
Biomasa de hongo	Bhon	<i>Trametes versicolor</i>	gl ⁻¹	0-10	0.1
Producto lacasas	Plac	Enzimas lacasas	UI ⁻¹	0-100,000	0
Colorante AR27	Colar27	Colorante Rojo ácido 27	gl ⁻¹	0-1	0
Sustrato aromáticos	Sarom	Compuestos derivados de la decoloración de rojo ácido 27	gl ⁻¹	0-1	0
Compuestos mejoradores	Cmejor	Compuestos producidos por <i>Pseudomonas putida</i> que mejoran el crecimiento de <i>Trametes versicolor</i>	gl ⁻¹	0-1	0

Los componentes del sistema biológico interactúan, hipotéticamente, de acuerdo con el modelo conceptual de la **Figura 28**, basado en ese modelo se hacen las siguientes consideraciones:

- Los dos microorganismos a pesar de tener condiciones de crecimiento diferentes, son capaces de crecer en un medio de cultivo único elaborado a base de los requerimientos para la producción de enzimas decolorantes.

- Los microorganismos consumen glucosa como su principal fuente de carbono, a través de éste sustrato crecen, se mantienen y producen sustancias de utilidad particular y de utilidad para el consocio.
- Las enzimas lacasas que se producen, en contacto con el colorante rojo ácido 27 lo transforman y la primera evidencia es que pierde su coloración. A su vez, se generarán compuestos aromáticos como producto secundario de la decoloración.

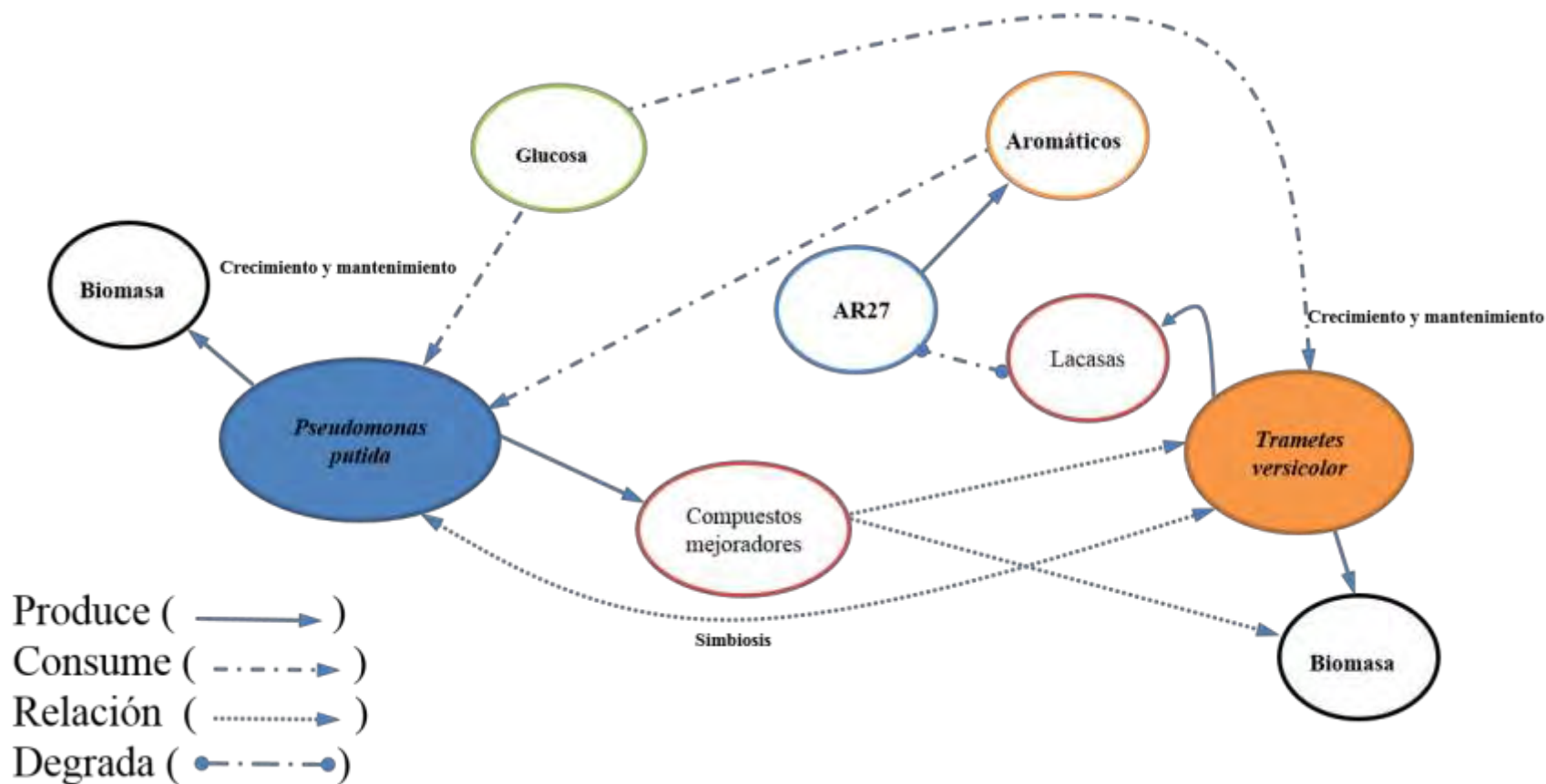


Figura 28. Componentes que pertenecen al sistema biológico de un consorcio constituido por dos microorganismos, en el que sus productos metabólicos, promueve la simbiosis del sistema.

- Los compuestos aromáticos son consumidos por las bacterias, gracias a sus características metabólicas, por lo que el hongo crecen sin la restricción causada por esta clase de compuestos.
- El sistema biológico se analizará en un sistema en lote. El balance de masa será el siguiente:

$$\frac{dC(i)}{dt} = r(i)C(i) \text{ Ecuación 14}$$

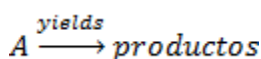
Donde $C(i)$ representa la concentración de las especies involucradas en el sistema y $r(i)$ representa la tasa de cambio con respecto al tiempo. Recordemos que la velocidad de reacción, también conocida como la velocidad de aparición o desaparición de los componentes, está representada por una ecuación algebraica y en muchos casos, las ecuaciones que están reportadas en la literatura representan en forma adecuada las velocidades de reacción.

3.13. Modelos cinéticos de velocidad de reacción

La velocidad de una reacción (r_j) nos indica con qué rapidez se consume cierta cantidad de moles de una especie química para formar otra especie química. La velocidad de reacción, es el número de moles de una especie que reaccionan por unidad de tiempo por unidad de volumen (Fogler, 2008).

La ecuación de velocidad (es decir la ley de velocidad) para r_j es una ecuación algebraica que sólo es función de las propiedades de los materiales que reaccionan y las condiciones de reacción (es decir, concentración de las especies, la temperatura, la presión o el tipo de catalizador, si lo hay) en un punto del sistema. La ecuación de velocidad es independiente del reactor en el cual se efectúa la reacción (Fogler, 2008).

La ley de velocidad de una reacción química es esencialmente una ecuación algebraica que involucra la concentración, no una ecuación diferencial. Por ejemplo, la forma algebraica de la ley de velocidad $-r_A$ para la reacción



Puede estar en función lineal de la concentración

$$-r_A = KC_A$$

aunque puede ser alguna otra función algebraica de la concentración como

$$-r_A = KC_A^2$$

o

$$-r_A = \frac{K_1 C_A^2}{1 + K_2 C_A}$$

Para una reacción dada, la dependencia de la concentración específica que la ley de velocidad muestra, se debe determinar por observación experimental o usando las que se han reportado para sistemas semejantes.

Específicamente para los componentes propuestos en el modelo conceptual del presente trabajo, las leyes de velocidad fueron tomadas de la literatura, basándose en que su uso en sistemas semejantes ha demostrado de manera acertada su representación. En la **Tabla 10** se concentran las leyes de velocidad para cada componente y algunos tados relevantes adicionales.

Tabla 10. Resumen de leyes de velocidad por componente de sistema *T.versicolor/P.putida*.

Componente del sistema	Modelo cinético		Parámetros		Principio	Referencia
	Nombre	Ecuación	Significado de parámetros	Unidades		
Biomasa de bacterias	Haldane	$\mu_x = \frac{\mu_{max} S}{K_s + S + K_I S^2}$	μ_{max} : velocidad máxima de crecimiento	h^{-1}	Representa la una forma de inhibición causada por el sustrato	(Bajaj <i>et al.</i> , 2008)
			ks: constante de saturación y de afinidad con el sustrato	$g l^{-1}$		
			ki: constante de inhibición	$g l^{-1}$		
Sustrato, consumo de glucosa	Monod	$\mu_s = -\left(\frac{\mu_{max}}{y_x} + m_x\right)$	yx: rendimiento en la generación de biomasa a partir del sustrato	$g g^{-1}$	Representa el consumo de sustrato para dos fines de viabilidad celular	(Kumar <i>et al.</i> , 2005)
			m: constante de mantenimiento, uso de sustrato para fines metabólicos	h^{-1}		
Biomasa de	Monod	$\mu_x = \frac{\mu_{max} S}{(K_s + S)}$	μ_{max} : velocidad máxima de	h^{-1}	Crecimiento de microorganismos	(Abuhamed

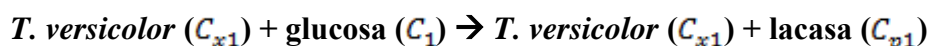
hongo			crecimiento		asociados al consumo de sustrato sin limitaciones, no obstante la velocidad depende la concentración de sustrato	<i>et al., 2004)</i>
			ks: constante de saturación y de afinidad con el sustrato	g ⁻¹		
Producción de lacasas	Luedeking-Piret	$\mu_p = \alpha \mu_x + \beta C_x$	α : coeficiente de producción de metabolitos asociados al crecimiento microbiano	adimensional	Producción de metabolitos microbianos asociados y no asociados al crecimiento	Luedeking y Piret , (1959)
			β : coeficiente de producción para metabolitos que no están asociados al crecimiento	h ⁻¹		
Decoloración de AR27	Michaelis-Menten	$\mu_{AR27} = \frac{v_{max} AR27}{(K_M + AR27)}$	V _{max} : velocidad máxima de decoloración	h ⁻¹	Decoloración considerando la presencia de enzimas y sustrato como el colorante a descomponer para perder el grupo cromóforo	(Cristóvão <i>et al.</i> , 2009).
			K _M : Constante de Michaelis-Menten sobre la asociación de la enzima y el sustrato	g ⁻¹		
Sustrato aromáticos	Monod	$\mu_s = -\left(\frac{\mu_{max}}{y_x} + m_x\right)$	yx: rendimiento en la generación de biomasa a partir del sustrato	gg ⁻¹	Representa el consumo de sustrato para dos fines de viabilidad celular	(Kumar <i>et al.</i> , 2005)
			m: constante de mantenimiento, uso de sustrato para fines metabólicos	h ⁻¹		

Las ecuaciones anteriores requieren de ser incorporadas en balances de materia, para su análisis en sistemas por lote, de tal manera que las consideraciones hechas a continuación transfieren en modelo conceptual portulado antes, en una serie de ecuaciones diferenciales parciales que representaran el comportamiento del sistema a estudiar. Antes de mostrar las ecuaciones, se debe puntualizar que los compuestos mejoradores para la producción de enzimas o los que mejoran el crecimiento de la

biomasa ya sea bacteriana o fungica no han sido sugeridos en la literatura, de manera que quedan fuera de la representación matemática.

3.14. Modelo matemático del consorcio

Para el crecimiento del *T. versicolor* se usó el peso seco como biomasa total y se asumió que su comportamiento puede ser bien descrito por la ley de velocidad propuesta por Monod, siendo el principal sustrato la glucosa. Para su crecimiento, mantenimiento y producción de las enzimas lacasas la glucosa será la materia prima. Una ecuación con balance de materia que describe lo anterior sería como sigue:



$$\frac{\partial C_{x1}}{\partial t} = \left(\frac{\mu_{\max} x1 \cdot C_1}{K_s x1 + C_1} \right) \cdot (C_{x1}) - kdC_{x1} \quad \text{Ecuación 15}$$

La **Ecuación 15** muestra por una parte que la principal función de la glucosa es permitir el crecimiento del hongo en forma exponencial, mientras que una vez que los recursos se agotan el crecimiento desacelera y la biomasa total inicia una etapa de decaimiento (segundo término). La etapa de decaimiento suele ser considerada cuando en ella se suscitan fenómenos de interés para el sistema que se estudia. Sin embargo, en la producción de lacasas tiene relevancia secundaria, por lo que no es tomado en cuenta de manera que la **Ecuación 15**, se convierte en la **Ecuación 16**.

$$\frac{\partial C_{x1}}{\partial t} = \left(\frac{\mu_{\max} x1 \cdot C_1}{K_s x1 + C_1} \right) \cdot (C_{x1}) \quad \text{Ecuación 16}$$

La misma ecuación de Monod requiere del estudio del consumo de sustrato, pues sobre este recae la posibilidad de generar las condiciones que permiten al sistema generar las sustancias que dan origen a la interacción entre los microorganismos. En la **Ecuación 17** se describe la relación que tiene el sustrato, glucosa, para la generación de biomasa, el mantenimiento celular y la producción de lacasas. Los tres términos se ilustran a continuación.

$$-\frac{\partial C_1}{\partial t} = \left[\left(\frac{1}{Y_{C_{x1}C_1}} \left(\frac{\partial C_{x1}}{\partial t} \right) \right) \right] + mC_{x1} + \left[\left(\frac{1}{Y_{C_{p1}C_1}} \left(\frac{\partial C_{p1}}{\partial t} \right) \right) \right] \quad \text{Ecuación 17}$$

La ecuación tres incluye la dependencia de dos ecuaciones diferenciales, la primera es la que describe el crecimiento microbiano de *T. versicolor* y la segunda la que describe la producción de la actividad lacasa, de esta última se presenta el balance de masa en la Ecuación IV.

$$\frac{\partial C_{p1}}{\partial t} = \alpha_{x1} \frac{\partial C_{x1}}{\partial t} + \beta_{x1} \cdot C_{x1} \quad \text{Ecuación 18}$$

Los símbolos ocupados en este primer conjunto de ecuaciones se comentan en los siguientes renglones:

C_{x1} : Concentración de biomasa de *Trametes versicolor* ($g l^{-1}$)

C_1 : Concentración de glucosa ($g l^{-1}$)

μ_{max_x1} : Velocidad máxima de crecimiento específico para *Trametes versicolor* en glucosa (h^{-1})

K_{s_x1} : Constante de saturación de glucosa con la biomasa de *Trametes versicolor* ($g l^{-1}$)

$Y_{C_{x1}C_1}$: Rendimiento biomasa de *Trametes versicolor*/glucosa (adimensional)

En este punto es importante hacer una consideración. Las unidades de actividad lacasa no representan en ningún momento la cantidad de enzimas que están presentes en el sistema, por lo que para fines de representación se hará uso del dato reportado en literatura por Cristóvão *et al.*, (2009), sobre el contenido de **120 UI⁻¹** de actividad lacasa por cada 1 gramo de sustancia. Con lo anterior puede emplearse una unidad de concentración arbitraria. Sin embargo, para estudios de mayor precisión será necesario realizar una metodología que determine el contenido de actividad lacasa por unidad de masa de producto. En el presente estudio los fines perseguidos son diferentes.

$Y_{C_{p1}C_1}$: Rendimiento lacasas/glucosa (adimensional)

$Y_{C_{p1}C_1}^*$: Rendimiento lacasas/glucosa ajustado ($g g^{-1}$)

C_{p1} : Cantidad de actividad lacasa (UI^{-1})

C_{p1}^* : Cantidad de actividad lacasa ajustada ($g l^{-1}$)

α_{x1} : Coeficiente de generación de actividad lacasa asociada al crecimiento (adimensional)

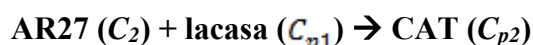
β_{x1} : Coeficiente de generación de actividad lacasa no asociada al crecimiento (h^{-1})

α_{x1} *: Coeficiente de generación de actividad lacasa asociada al crecimiento ajustado (adimensional)

β_{x1} *: Coeficiente de generación de actividad lacasa no asociada al crecimiento ajustado (h^{-1})

Para algunos casos la variable ajustada (representada con un asterisco) mostrará observaciones más precisas del elemento que en su momento este en discusión.

La siguiente etapa del modelo conceptual está enfocada en la transformación del colorante AR27 a través de una reacción enzimática. Tal como se sugirió en la **Tabla 10**, la ecuación propuesta por Michaelis y Menten describe con precisión las reacciones enzima sustrato. La siguiente expresión ilustra como procede esta reacción.



Además la ecuación matemática que muestra tanto la integración de la velocidad de reacción enzima sustrato, como el balance de masa, está indicada en la **Ecuación 19**.

$$-\frac{\partial C_2}{\partial t} = \left(\frac{V_{max} \cdot C_2}{K_{ME}C_2 + C_2} \right) * C_{p1} * V_t \text{ Ecuación 19}$$

Hay que hacer un par de aclaraciones. En primer lugar, la ecuación de balance indica que C_{p1} debe estar representada en unidades de masa de la enzima, y no en unidades de actividad. En este punto es donde vale la pena la conversión arbitraria de unidades de actividad lacasa a masa de lacasa, que está indicada como la actividad lacasa adaptada. Tomando en cuanto a que se está midiendo la actividad lacasa por unidad de volumen, el volumen total del sistema se aborda en esta consideración, por lo que la variable V_t se puede omitir. Con lo anterior la Ecuación V se transforma en la **Ecuación 20**.

$$\frac{\partial C_2}{\partial t} = - \left(\frac{V_{max} \cdot C_2}{K_{ME}C_2 + C_2} \right) * C_{p1} \text{ Ecuación 20}$$

C_2 : Concentración de AR27 en el medio de cultivo ($g l^{-1}$)

$V_{\max_{C_2}}$: Velocidad máxima de decoloración (h^{-1})

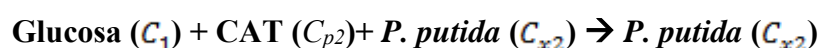
$K_{ME_{C_2}}$: Constante de Michaelis-Menten para la relación AR27 y lacasas (gl^{-1})

C_{p1} : Concentración de actividad lacasa ajustada (gl^{-1})

V_t : Volumen total del sistema (l)

El lector se habrá percatado que hasta el momento no se ha abordado el detalle sobre los elementos que consideran a la bacteria, esto es porque hay una descripción del fenómeno del consorcio en dos etapas categorizadas con base en la presencia de los microorganismos. Por lo tanto, para la segunda etapa, se inicia comentando que la bacteria *P. putida* debe ser capaz de crecer bajo las condiciones estudiadas, las cuales deben favorecer al hongo, por ser el elemento clave para la producción de las enzimas responsables de la eliminación del AR27. Aunado a lo anterior, es de conocimiento común que las comunidades bacterianas presenten un metabolismo más acelerado en comparación con el de los hongos. Por lo tanto, en un sistema donde la principal fuente de carbono sea glucosa, se espera haya una competencia por su consumo. Sin embargo, este consorcio se incentiva a favor de la comunidad bacteriana considerando que tendrán al menos dos fuentes de carbono, pues se espera que los compuestos generados en la decoloración del AR27 sean la segunda fuente de carbono.

Una ecuación que sugiere la producción de biomasa bacteriana se presenta a continuación:



El crecimiento bacteriano estará asociado a dos formas de crecimiento. Por un lado el crecimiento ante el consumo de glucosa y el segundo ante el consumo de los compuestos aromáticos derivados de la decoloración del AR27. Por lo tanto el crecimiento bacteriano de *P. putida*, quedará representado de la siguiente manera, las siguientes ecuaciones contienen el balance de materia necesario.

$$\frac{\partial C_{x2}}{\partial t} = \left(\frac{\mu_{\max_{x2}(C_1)} \cdot C_1}{K_{s_{x2}(C_1)} + C_1} \right) (C_{x2}) \quad \text{Ecuación 21}$$

La **Ecuación 21** de Monod puede ajustar al crecimiento bacteriano asociado al consumo de glucosa, mientras que la **Ecuación 22** es un caso especial para sustratos de naturaleza fenólica se puede asociar al crecimiento de *P. putida*.

$$\frac{\partial C_{x2}}{\partial t} = \left(\frac{\mu_{\max_x2}(C_{p2}) \cdot C_{p2}}{(K_{s_x2}(C_{p2}) + C_{p2} + C_{p2}K_i)} \right) (C_{x2}) \text{ Ecuación 22}$$

Tal como para la representación matemática para el hongo, la bacteria usará a la glucosa para fines de generación de biomasa y mantenimiento celular. Aunque la producción de enzimas para la degradación de compuestos fenólicos por parte de las bacterias está altamente estudiada, no es objeto de estudio del presente modelo matemático debido a que la atención del consorcio destaca en la producción de enzimas y el acoplamiento de ambos microorganismos al crecimiento sinérgico, por lo tanto se descarta. Con lo anterior, la **Ecuación 23** queda se muestra sin el término que relaciona a la producción de un metabolito de interés.

$$-\frac{\partial C_1}{\partial t} = \left[\left(\frac{1}{v_{C_{x2}C_1}} \left(\frac{\partial C_{x2}}{\partial t} \right) \right) \right] + mC_{x2} \text{ Ecuación 23}$$

La simbología y dimensiones para cada término utilizado en esta sección sobre modelos matemáticos relacionados con *P. putida* se lista en seguida.

C_{x2} : Concentración de biomasa de *P. putida* (gl^{-1})

C_{p2} : Concentración de compuestos aromáticos (gl^{-1})

$\mu_{\max_x2}(C_1)$: Velocidad máxima de crecimiento específico de *P. putida* en glucosa (h^{-1})

$\mu_{\max_x2}(C_{p2})$: Velocidad máxima de crecimiento específico de *P. putida* en aromáticos (h^{-1})

C_1 : Concentración de glucosa (gl^{-1})

$K_{s_{x2}}(C_1)$: Constante de saturación de glucosa para *P. putida* (gl^{-1})

$K_{s_{x2}}(C_{p2})$: Constante de saturación de compuestos aromáticos para *P. putida* (gl^{-1})

K_i : Constante de inhibición de compuestos aromáticos en el crecimiento de *P. putida* (gl^{-1})

$Y_{C_{x2}C_1}$: Rendimiento de biomasa bacteriana respecto al sustrato glucosa (adimensional)

m: Constante de mantenimiento celular bacteriano (h^{-1})

Con los modelos matemáticos sugeridos, la siguiente tarea consistió en buscar valores de los parámetros. En el siguiente apartado se describe con detalle su determinación.

3.15. Parametrización de las ecuaciones de leyes de velocidad

Con base en las ecuaciones propuestas para el modelo matemático, se determinaron los parámetros cinéticos para cada ecuación diferencial y para cada característica evaluada. El procedimiento abordado fue el siguiente, a) a través de la función ESTIMACION.LINEAL se obtiene una ecuación matemática de un polinomio que tiene como variable dependiente la variable que se está estudiando y como variable independiente el tiempo con diferentes valores exponenciales desde 1 hasta 5 (ejemplo $\frac{\partial C_{x1}}{\partial t} = at + bt^2 + ct^3 + dt^4 + et^5$), b) se calculó la primer derivada del polinomio, para con ello obtener el cambio instantáneo de la variable dependiente (ejemplo $\frac{\partial C_{x1}}{\partial t} = a + 2bt + 3ct^2 + 4dt^3 + 5et^4$), c) las derivadas representan los valores de μ y este se puede utilizar o modificar, según sea el requerimiento del proceso matemático, d) a menos que el modelo no esté como una ecuación linealizada, realizar los cambios algebraicos para linealizarla. Para la ecuación de Monod la forma linealizada es la siguiente:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_{max}} \left(\frac{1}{C_1} \right) + \frac{1}{\mu_{max}} \text{ Ecuación 24}$$

De esta manera al graficar $\frac{1}{\mu}$ contra $\frac{1}{C_1}$, se obtiene la pendiente $\frac{K_s}{\mu_{max}}$ y la ordenada al origen es igual a $\frac{1}{\mu_{max}}$, de los que es fácil calcular μ_{max} y K_s , ambos parámetros representan el crecimiento de cada organismo. Para el consumo de sustrato, por estimación lineal se calcula la velocidad de cambio instantánea del sustrato $\frac{\partial C_1}{\partial t}$, y los de $\frac{\partial C_{x1}}{\partial t}$ ya han sido estimados previamente, se grafica $\frac{\partial C_1}{\partial t}$ contra $\frac{\partial C_{x1}}{\partial t}$ y con la pendiente se puede calcular el valor de $Y_{C_{x1}C_1}$. Para la producción de la actividad lacasa, los parámetros α y β se calculan directamente de una estimación lineal de $\frac{\partial C_{p1}}{\partial t}$, con las

variables $\frac{\partial C_{x1}}{\partial t}$ y C_{x1} . En el caso de la decoloración, la ecuación de Michaelis-Menten se linealizada es la siguiente:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_{ME}}{V_{max}} \left(\frac{1}{C_2} \right) + \frac{1}{V_{max}} \text{ Ecuación 25}$$

De esta manera al graficar $\frac{1}{V}$ contra $\frac{1}{C_2}$, se obtiene la pendiente $\frac{K_{ME}}{V_{max}}$ y la ordenada al origen es igual a $\frac{1}{V_{max}}$, de los que es fácil calcular V_{max} y K_{ME} .

Para los sistemas donde está incluido a *P. putida* como elemento principal del estudio, los parámetros de Monod fueron estimados como en los sistemas con *T. versicolor*.

3.16. Solución del modelo matemático

3.16.1. Empleo de consola de MATLAB

En la solución de los modelos matemáticos se utilizaron los parámetros obtenidos por linealización algebraica y con el apoyo de la función ESTIMNACION.LINEAL. Las ecuaciones diferenciales de los modelos y la solución numérica mediante el método de Runge-Kutta de 4to orden se programaron en lenguaje de MATLAB. El código que se programó en un módulo de MATLAB se presenta en la sección de anexos.

La programación en MATLAB fue útil para analizar la solución de los modelos matemáticos, sin embargo, los parámetros de los experimentos generaron líneas del modelo que no correspondieron con los datos experimentales, por lo anterior fue necesario realizar mejoras al algoritmo.

3.16.2. Empleo de lenguaje Python

Fue necesario que el algoritmo calculara la diferencia entre el modelo matemático y los datos experimentales a través de la suma del error cuadrado y que buscará la combinación de parámetros que minimizará el error. Para dicho fin, se decidió cambiar de plataforma para programar en lenguaje de Python.



Figura 29. Logotipo comercial de la plataforma Python.

Python es un lenguaje de programación potente y fácil de aprender. Cuenta con estructuras de datos de alto nivel eficientes y un enfoque simple pero efectivo para la programación orientada a objetos. La elegante sintaxis y escritura dinámica de Python, junto con su naturaleza interpretada, lo convierten en un lenguaje ideal para la creación de scripts y el rápido desarrollo de aplicaciones en muchas áreas en la mayoría de las plataformas.

El intérprete de Python y la extensa biblioteca estándar están disponibles gratuitamente en forma de fuente o binario para todas las plataformas principales desde el sitio web de Python, <https://www.python.org/>, y pueden distribuirse libremente. El mismo sitio también contiene distribuciones y punteros a muchos módulos, programas y herramientas de Python de terceros, y documentación adicional.

El intérprete de Python se amplía fácilmente con nuevas funciones y tipos de datos implementados en C o C ++ (u otros idiomas que se pueden llamar desde C). Python también es adecuado como un lenguaje de extensión para aplicaciones personalizables.

La versión de Python que se utilizó fue la 3.7.1. la cual es adecuada para sistemas operativos posteriores a Windows XP. En la sección de anexos se presenta el código utilizado.

3.16.3. Normalización de ecuaciones

Los límites superiores e inferiores de las variables fueron los siguientes, para el caso de biomasa bacteriana de 0.001-1.500 gl^{-1} , biomasa fúngica de 0.001-1.600 gl^{-1} , glucosa 0.001-4.000 gl^{-1} , colorante 0.001-0.200 gl^{-1} , sin embargo para la actividad lacasa el rango fue más amplio 0.001-3500.000 UI^{-1} . Este valor al momento de resolver los sistemas de ecuaciones diferenciales, pueden causar cambios abruptos en las otras variables de estudio. Por tal razón, se decidió que la manera adecuada de presentar y resolver el sistema de ecuaciones diferenciales sería con ecuaciones normalizadas. El procedimiento que se siguió, se presenta a continuación.

Las variables a normalizar fueron: **x (biomasa)**, **s (glucosa)**, **p (actividad lacasa)**, **A (rojo ácido 27)** y **t (tiempo)**. Las variables características, que representan un valor de la variable a normalizar y que como condición deben ser una entidad la variable, fueron los siguientes: **x₀** que representa el valor de biomasa máxima en el cultivo, **s₀** que indica el valor inicial del sustrato, **p₀** es el valor máximo de actividad lacasa y **t₀** representa el tiempo final de evaluación de los experimentos. La siguiente tabla muestra las relaciones matemáticas que generan los términos normalizados.

Tabla 11. Arreglos para la normalización de ecuaciones.

Consideración 1	Derivada	Despeje
$x = \bar{x} x_0$	$dx = d(\bar{x} x_0)$	$dx = x_0 d(\bar{x})$
$s = \bar{s} s_0$	$ds = d(\bar{s} s_0)$	$ds = s_0 d(\bar{s})$
$p = \bar{p} p_0$	$dp = d(\bar{p} p_0)$	$dp = p_0 d(\bar{p})$
$A = \bar{A} A_0$	$dA = d(\bar{A} A_0)$	$dA = A_0 d(\bar{A})$
$t = \bar{t} t_0$	$dt = d(\bar{t} t_0)$	$dt = t_0 d(\bar{t})$

Sustituyendo esos valores en las ecuaciones balanceadas se obtiene lo siguiente, para la ecuación de biomasa.

$$\frac{x_0 d(\bar{x})}{t_0 d(t)} = \left(\frac{\mu_{max} \bar{s} s_0}{K_s + \bar{s} s_0} \right) (\bar{x} x_0)$$

$$\frac{d(\bar{x})}{d(t)} = \left(\frac{\mu_{max} \bar{s} s_0 t_0 \bar{x}}{K_s + \bar{s} s_0} \right) \text{Ecuación 26}$$

Para la ecuación de consumo que no considera la producción de algún componente de importancia para el sistema

$$\frac{s_0 d(\bar{s})}{t_0 d(t)} = - \left[y_x \left(\frac{\mu_{max} \bar{s} s_0 t_0 \bar{x}}{K_s + \bar{s} s_0} \right) + m \bar{x} x_0 \right]$$

$$\frac{d(\bar{s})}{d(t)} = - \left[y_x \left(\frac{\mu_{max} \bar{s} s_0 t_0 \bar{x}}{(K_s + \bar{s} s_0) s_0} \right) + \frac{m \bar{x} x_0 t_0}{s_0} \right]$$

$$\frac{d(\bar{s})}{d(t)} = - \left[y_x \left(\frac{\mu_{max} \bar{s} s_0 t_0^2 \bar{x}}{(K_s s_0 + \bar{s} s_0^2)} \right) + \frac{m \bar{x} x_0 t_0}{s_0} \right] \text{Ecuación 27}$$

Para la ecuación de consumo de sustrato que si considera la generación de un producto se calcula una vez normalizada la ecuación para el producto.

$$\frac{d(\bar{p})}{d(t)} = \left[\alpha \left(\frac{\mu_{max} \bar{s} s_0 t_0 \bar{x}}{K_s + \bar{s} s_0} \right) + \beta \bar{x} x_0 \right] \left(\frac{t_0}{p_0} \right)$$

$$\frac{d(\bar{p})}{d(t)} = \left[\alpha \left(\frac{\mu_{max} \bar{s} s_0 t_0^2 \bar{x}}{K_s p_0 + \bar{s} s_0 p_0} \right) + \frac{\beta \bar{x} x_0 t_0}{p_0} \right] \text{Ecuación 28}$$

Tomando en cuenta la **Ecuación 29** se agrega el término sobre producto

$$\frac{s_0 d(\bar{s})}{t_0 d(t)} = - \left[y_x \left(\frac{\mu_{max} \bar{s} s_0 t_0 \bar{x}}{K_s + \bar{s} s_0} \right) + m \bar{x} x_0 + y_p \frac{d(\bar{p})}{d(t)} \right]$$

$$\frac{s_0 d(\bar{s})}{t_0 d(t)} = - \left[y_x \left(\frac{\mu_{max} \bar{s} s_0 t_0 \bar{x}}{K_s + \bar{s} s_0} \right) + m \bar{x} x_0 + y_p \left[\alpha \left(\frac{\mu_{max} \bar{s} s_0 t_0^2 \bar{x}}{K_s p_0 + \bar{s} s_0 p_0} \right) + \frac{\beta \bar{x} x_0 t_0}{p_0} \right] \right]$$

$$\frac{d(\bar{s})}{d(t)} = - \left[y_x \left(\frac{\mu_{max} \bar{s} s_0 t_0 \bar{x}}{K_s + \bar{s} s_0} \right) + m \bar{x} x_0 + y_p \left[\alpha \left(\frac{\mu_{max} \bar{s} s_0 t_0^2 \bar{x}}{K_s p_0 + \bar{s} s_0 p_0} \right) + \frac{\beta \bar{x} x_0 t_0}{p_0} \right] \right] \left(\frac{t_0}{s_0} \right)$$

$$\frac{d(\bar{s})}{d(t)} = - \left[y_x \left(\frac{\mu_{max} \bar{s} s_0 t_0^2 \bar{x}}{(K_s s_0 + \bar{s} s_0^2)} \right) + \frac{m \bar{x} x_0 t_0}{s_0} + y_p \left[\alpha \left(\frac{\mu_{max} \bar{s} s_0 t_0^3 \bar{x}}{K_s p_0 + \bar{s} s_0 p_0} \right) + \frac{\beta \bar{x} x_0 t_0^2}{p_0 s_0} \right] \right] \text{Ecuación 29}$$

Finalmente para la decoloración

$$\frac{A_0 d(\bar{A})}{t_0 d(t)} = \left(\frac{V_{max} \bar{A} A_0}{K_M + \bar{A} A_0} \right) (Clac)$$

$$\frac{d(\bar{A})}{d(t)} = \left(\frac{V_{max} \bar{A} A_0}{K_M + \bar{A} A_0} \right) \frac{(Clac) t_0}{A_0}$$

$$\frac{d(\bar{A})}{d(t)} = \left(\frac{V_{max} \bar{A} (Clac) t_0}{K_M + \bar{A} A_0} \right) \text{Ecuación 30}$$

Capítulo 4

Resultados y conclusiones

4.1. Preliminares para *P. putida*

Los microorganismos estuvieron almacenados durante un largo periodo de tiempo a -80 °C, de manera que tuvo que verificarse la calidad de los mismos. Al hacer un cultivo en medio nutritivo se observó, con ayuda de los colorantes de Gram, la presencia de cocos Gram positivos y bacilos Gram negativos.

La cepa contaminada se sembró en medio de cultivo (base Kirk) con tolueno y/o fenol como fuentes de carbono. La presencia de tolueno y/o fenol suprimieron el crecimiento de los microorganismos Gram positivos. Al realizar una prueba con medio Kirk sin fuente de carbono, se observó que las bacterias Gram negativas crecieron (**Tabla 12**). Considerando de *P. putida* degrada compuestos aromáticos, no debe pasar inadvertido que el medio Kirk contiene dos componentes que quizás la bacteria utilizó, tales como el clorhidrato de tiamina y el ácido nitriloacético. La bacteria *P. putida* produce enzimas que degradan al tolueno (90 mg l⁻¹), benceno (90 mg l⁻¹), y fenol (50 mg l⁻¹), para usarlos como fuente de carbono.

La concentración de fenol utilizada aquí fue mayor que la reportada por Abuhamed *et al.*, (2004) no obstante, le permitió crecer, este hecho fue verificado a través del conteo de unidades formadoras de colonia en placa.

Tabla 12. Cultivos para el mantenimiento de *P. putida*.

Características del cultivo	Crecimiento en placa de agar nutritivo	Tinción de Gram
Medio Kirk (blanco 1)	Nulo	NA
Medio Kirk + microorganismos sembrados (blanco 2)	Crecimiento mínimo	Mezcla de positivos y negativos
Medio Kirk + 2000 mg l ⁻¹ de tolueno + microorganismos sembrados	Crecimiento abundante	negativos
Medio Kirk + 2000 mg l ⁻¹ de fenol + microorganismos sembrados	Crecimiento abundante	negativos

Una vez aislada *P. putida* se comprobó su identidad a través de 6 pruebas bioquímicas: movilidad, nitrato de potasio, hidrólisis de gelatina, asimilación de citrato, catalasa

(peroxidasa) y formación de indol, los resultados son iguales a los publicados en el Manual Bergey de bacteriología sistemática, estos resultados se pueden consultar en la

Tabla 13. Caracterización bioquímica para *Pseudomonas putida* y pruebas de producción de colorantes fluorescentes en medios selectivos para *Pseudomonas*.

Prueba	Valor reportado en Manual Bergey	Valor obtenido
Movilidad	Positivo	Positivo
Nitrato de potasio	Negativo	Negativo
Asimilación de citrato	Positivo	Positivo
Catalasa (peroxidasa)	Positivo	Positivo
formación de indol	Negativo	Negativo
Agar Pseudomonas F	Crece y forma coloración fluorescente amarillo verdoso alrededor de las colonias	Creció y formo color fluorescente amarillo verdoso
Agar Pseudomonas P	Crece pero no forma pionicina (pigmento azul)	Creció y no formo colorante azul
Aislamiento de Pseudomonas	Crece	Creció

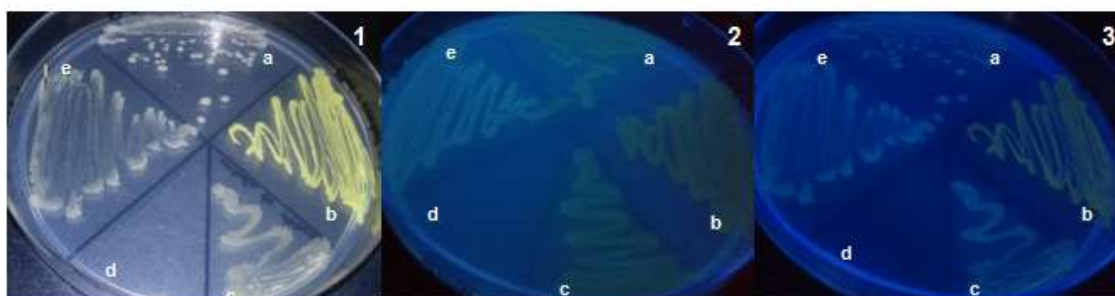


Figura 30. Producción de compuestos fluorescentes. 1) Agar *Pseudomonas* P bajo luz blanca: a) *P. aeruginosa*, b) bacteria desconocida amarilla Gram (+) (control negativo), c) cepa crecida en agar Pseudomonas, e) cepa a identificar. 2) Agar Pseudomonas F, 3) Agar Pseudomonas P.

El cultivo aislado de *P. putida* creció en agar Pseudomonas F y en Pseudomonas P, se observó en el primer agar producción de fluoresceína, mientras que en el segundo no hubo producción de pionicina (Figura 30).

La producción del colorante fluoresceína es típica de *P. putida* (Merino, 2007), la piocionina se produce con mayor frecuencia en *P. aeruginosa* pero no el *P. putida* (Kong *et al.* 2006).

Para preparar suficiente biomasa bacteriana en estado viable, la bacteria se creció en medio de cultivo de soya de tripticaseina (TCS) durante 50 h, la biomasa a través de la densidad óptica fue determinada y graficada en función del tiempo (**Figura 31**). La cepa de *P. putida* empleó 4 h para adaptarse al medio TCS, después creció en forma exponencial hasta las 25.5 h. A las 20 h la concentración de biomasa fue de 1.72 g^l⁻¹, donde se consumió alrededor de 84.7% de glucosa. Esta prueba es importante porque se puede elegir el tiempo en el que hay un máximo de biomasa, este dato se ocupó en los siguientes experimentos.

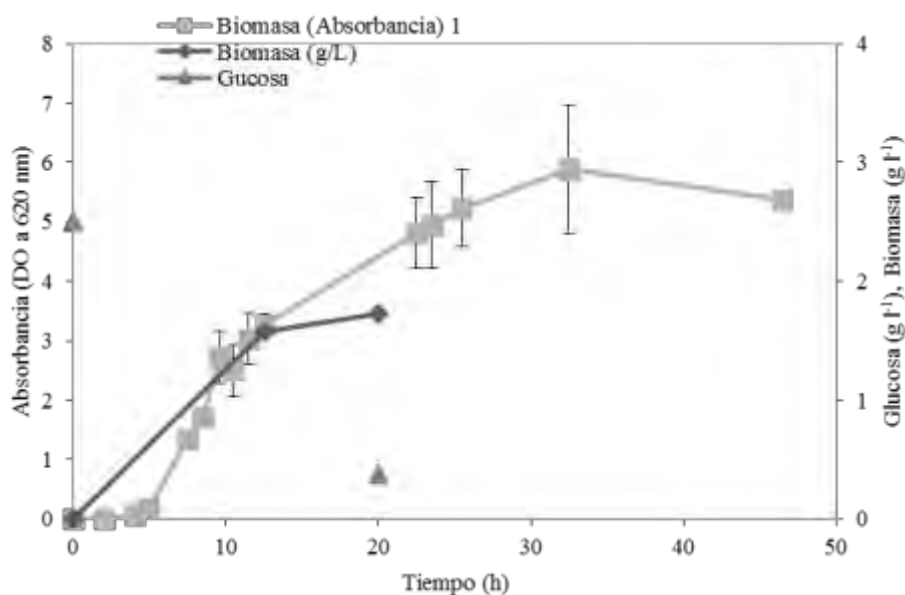


Figura 31. Crecimiento de *P. putida* en caldo de soya tripticaseina.

4.2. Crecimiento en cultivos puros y consorcio

En estudios preliminares observamos que cuando en el cultivo se inoculaban simultáneamente *T. versicolor* y *P. putida*, esta última inhibía el crecimiento del hongo y por lo tanto no se detectaba actividad lacasa, las bacterias predominaban en el consumo del sustrato y esto llevaba a que no se formara el consorcio. Otra restricción fue encontrada en los monocultivos de la bacteria con AR27 como única fuente de carbono, en este caso se observó que el AR27 no es un sustrato que asimile la bacteria bajo las condiciones estudiadas.

Tomando en cuenta lo anterior, se decidió usar una estrategia de crecimiento de los microorganismos del consorcio, en primer lugar, se permitió el crecimiento del hongo como monocultivo y a las 72 horas se agregó el inóculo bacteriano. Para entonces el *T. versicolor* había crecido lo suficiente como para constatar la presencia de pellets con aproximadamente 0.1 cm de diámetro, mientras que la decoloración del AR27 llegaba a ser en la mayoría de los casos del hasta del 100%. De esta manera se garantizó la sobrevivencia de ambos microorganismos.

El crecimiento de *T. versicolor* y *P. putida* en monocultivos y en los consorcios, con y sin AR27, se muestra en la **Figura 32**. Más específicamente, no hubo diferencia significativa en la concentración máxima del *T. versicolor* en monocultivos a las 240 h con y sin AR27 (**Tabla 14**). En el consorcio, la biomasa máxima de *T. versicolor* fue mayor ($p < 0.05$) en comparación con los monocultivos (**Tabla 14**). La masa máxima del hongo en el consorcio a las 158 h sin AR27 (1.00 g l^{-1}) fue menor ($p < 0.05$) que en el consorcio con AR27 (1.39 g l^{-1}). Por el contrario, para *P. putida* la biomasa máxima se alcanzó a las 12 h sin AR27 (1.660 g l^{-1}) y fue mayor ($p < 0.05$) que la alcanzada con AR27 (0.940 g l^{-1}) a las 5 h. En el cultivo de *P. putida* con AR27 la concentración de la biomasa comenzó a decaer a las 7 h y sin AR27 a las 20 h (**Figura 32**).

En el monocultivo de hongos, *T. versicolor* creció en menor velocidad en comparación con los cultivos en consorcio. En este sentido los perfiles mostrados en la **Figura 32**, describen el progreso del crecimiento, el cual se midió como biomasa total. Con el método utilizado para cuantificar la biomasa fúngica y bacteriana del consorcio hubo dos detalles importantes a resaltar.

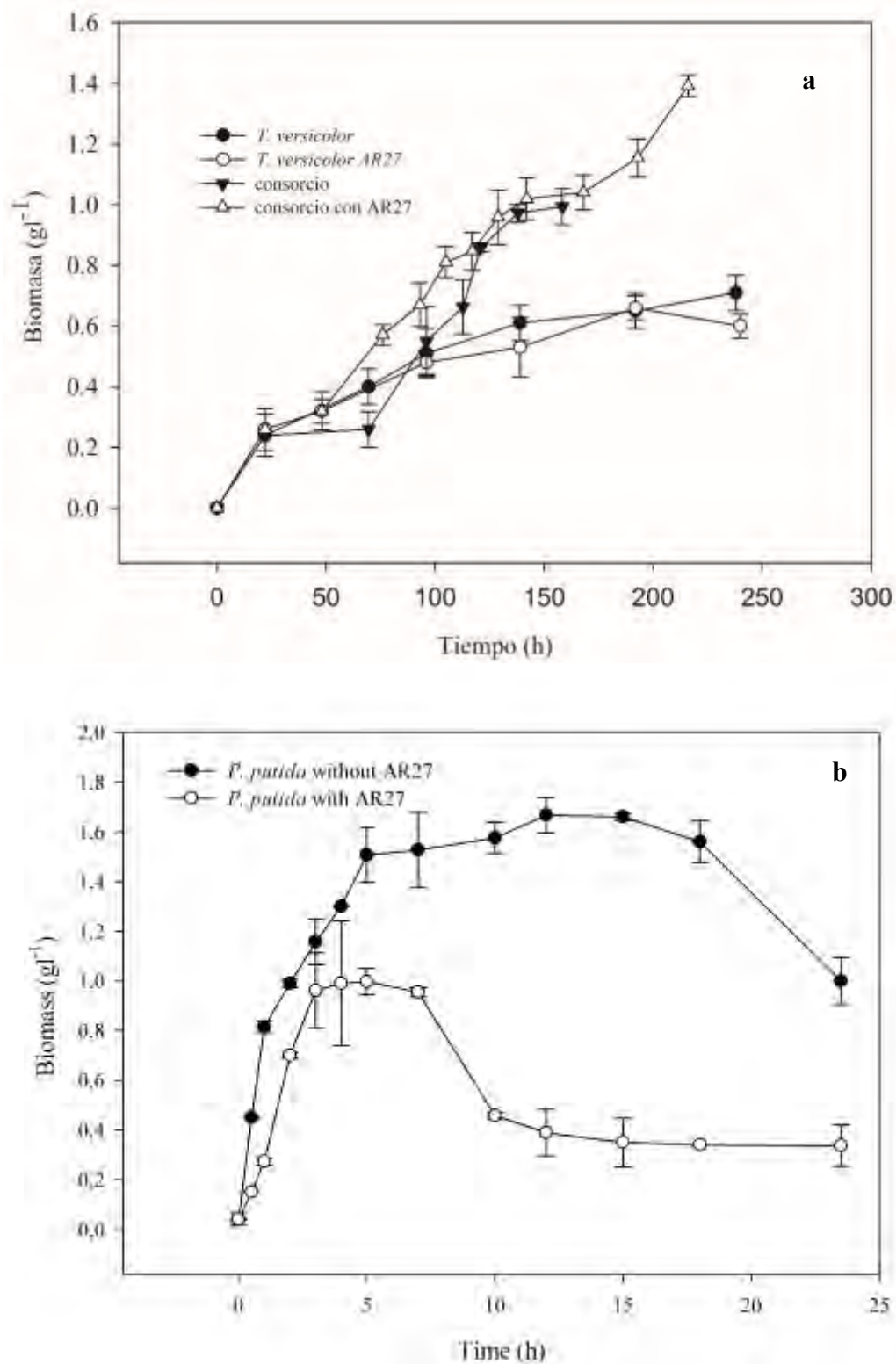


Figura 32. Perfiles de crecimiento a) fúngico y del consorcio con y sin AR27 y b) bacteriano con y sin AR27.

El primer detalle fue que la cuantificación de bacterias por peso seco no arrojó datos confiables, por lo que se cambió el método de cuantificación al de cuenta en placa. El segundo detalle, está relacionado con la curva de crecimiento bacteriano en el consorcio obtenida por cuenta en placa (**Figura 33**), el perfil mostrado sugiere que en las primeras horas de bioreacción las bacterias crecen preferentemente en el medio de cultivo sin ninguna asociación aparente con la biomasa fúngica, sin embargo conforme el tiempo avanzó las células bacterianas prefirieron crecer cerca de la biomasa fúngica, de tal manera que después de 10 h de bioreacción no se detectó la presencia de bacterias en el medio de cultivo. En un análisis del consorcio a las 130 h, se encontró que el número de pellets en el consorcio con AR27 fue de 180 con un diámetro aproximado de 0.3 cm, mientras que al mismo tiempo de bioreacción en el cultivo de *T. versicolor* sin AR27 se contaron 30 pellets con diámetro aproximado de 0.7 cm. Las observaciones a través de microscopía óptica de pellets fúngicos y medio de cultivo del consorcio con AR27, mostraron que en los pellets hubo células de bacterianas mezcladas con hifas del hongo y en el medio de cultivo las células bacterianas fueron escasas. Las observaciones anteriores muestran que la interacción entre ambos microorganismos mejoró la producción de pellets fúngicos.

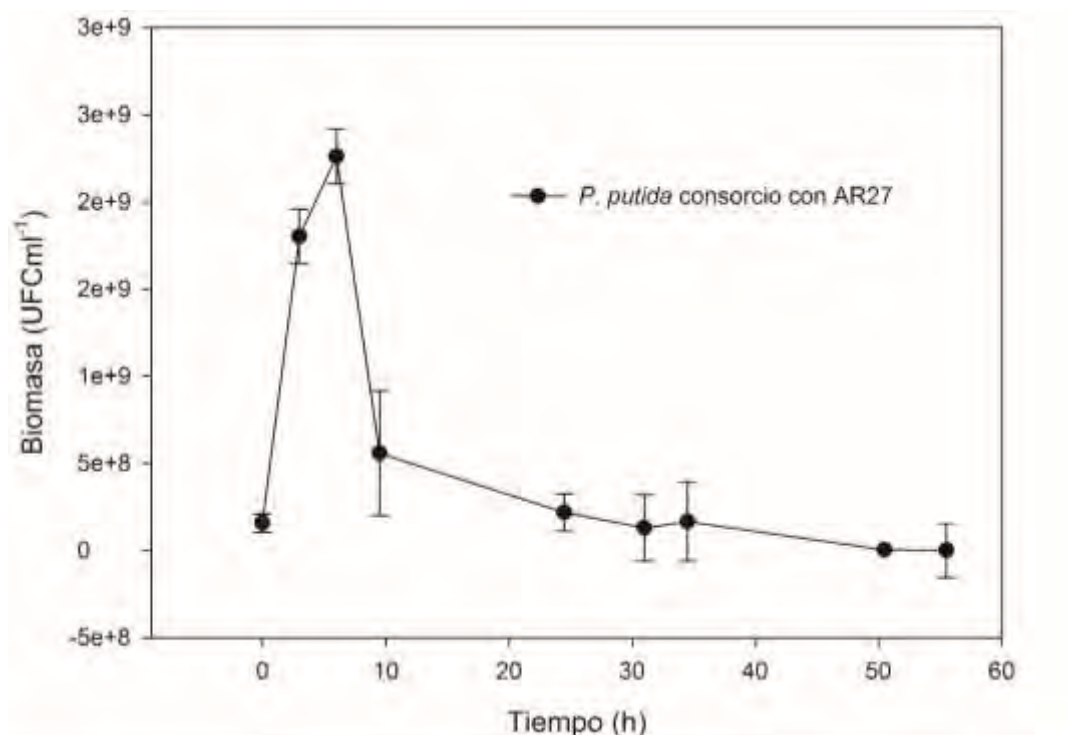


Figura 33. Crecimiento de *P. putida* en el cultivo en consorcio con AR27.

La razón por la que el consorcio de *T. versicolor* y *P. putida* se deben adaptar al medio Kirk, es porque al hongo le permite producir lacasas y en consecuencia decolorar al AR27. Existe la evidencia bibliográfica de que *T. versicolor* produce lacasas en medio Kirk a pH de 4.5, suplementado con ($g\ l^{-1}$): 10 de glucosa, 0.31 de amonio, 0.1 de inóculo que produjeron 3.0 de biomasa las 144 h (Thiruchelvam y Ramsay, 2007). La producción de lacasas se índice entre otras cosas con la cantidad de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo, medida a través de la relación molar carbono/nitrógeno la cual debe ser mayor a 10 (Gavril y Hodson, 2007), hecho que se cumple en el presente estudio debido a que el valor fue de 53.3. La producción de biomasa fúngica es necesaria para la producción lacasas y está relacionada con la concentración (Zhu *et al.*, 2016), es decir a mayor concentración de biomasa de *T. versicolor* mayor será la actividad lacasa.

El crecimiento fúngico es estimulado con medios de cultivo enriquecidos o bien con compuestos sintetizados químicamente. Se reportó en el 2012 el uso de $CuSO_4$ como agente inductor en la producción de actividad lacasa, aunado a este hecho se encontró que la biomasa del microorganismo productor aumentó significativamente como resultado del estrés abiótico. A pesar de la efectividad del $CuSO_4$, esta clase de compuestos afecta negativamente al medio ambiente cuando se utiliza en altas concentraciones (Singhal *et al.*, 2012) por lo que su uso debe ser usado a consciencia.

Los consorcios biológicos son una clase de inductores naturales, se consideran como una alternativa sutil y ecológicamente aceptable, aquí se presentaron las evidencias del mejoramiento en el crecimiento de *T. versicolor* en comunidad con *P. putida*.

Un aspecto controversial al momento de crecer ambos organismos en el medio Kirk fue el valor del pH. Mientras que para el hongo el pH del sistema fue el óptimo, para la bacteria no lo fue. A pesar de la implicación abiótica, el pH de 4.5 fue adecuado para que tanto del hongo como de la bacteria crecieran, en la medida de mantener la sobrevivencia del consorcio. Como parte de los trabajos preliminares en esta tesis, se realizó una prueba en la que el pH del medio Kirk se modificó a 7.0 y era de esperarse, la bacteria creció generando mayores concentraciones de biomasa en comparación con la evaluación en medio Kirk a pH de 4.5, esto tuvo tres implicaciones interesantes: a) el medio de cultivo Kirk no restringe el crecimiento bacteriano, b) como agente inductor la bacteria pudo generar las condiciones adecuadas para afectar positivamente el

crecimiento fúngico y c) las bacterias no tuvieron un crecimiento óptimo y con ello se evita que consuman los recursos del medio de cultivo en una medida que afecte el crecimiento del hongo.

En la literatura se ha reportado el crecimiento de *P. putida* WLY en medio ácido, durante la biodegradación del compuesto X-3B. Se reportó una densidad celular de 10^8 ufcml⁻¹ a pH de 6.0-8.5 mientras que a pH de 4.5 disminuyó a $10^{6.5}$ ufcml⁻¹ (Yang *et al.*, 2011).

A saber no existe ningún reporte que indique que la asociación de estos organismos sea sinérgica o a beneficio de algún bioproceso. Por lo que se reporta por primera vez la ventaja de crecer *Pseudomonas putida* con *Trametes versicolor*, bajo las condiciones aquí mostradas.

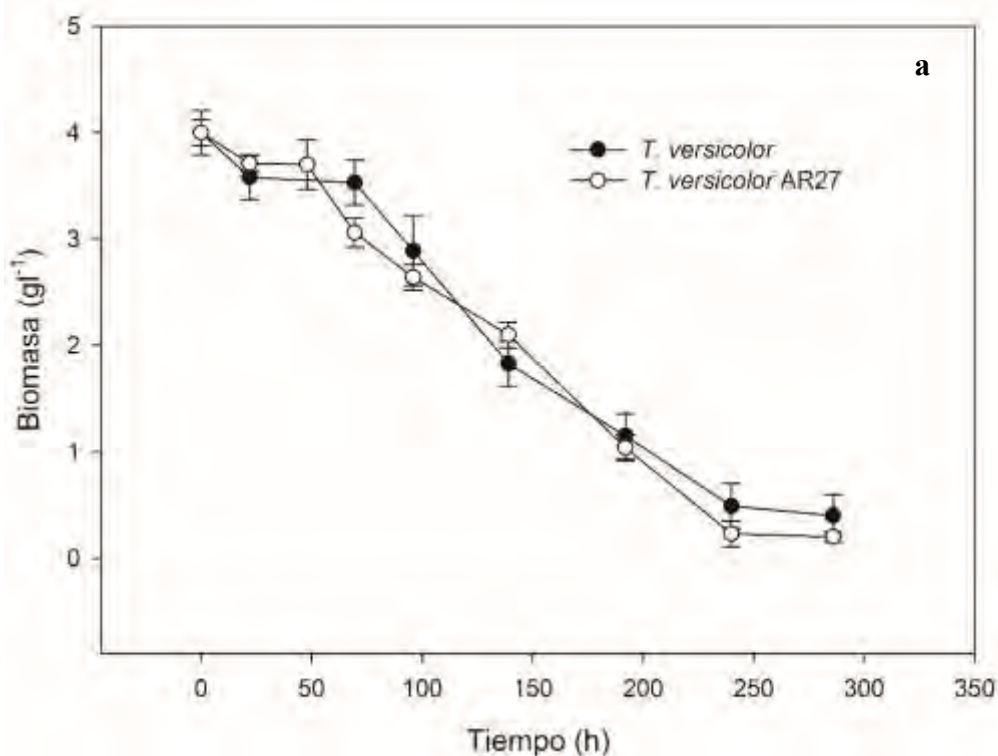
Tabla 14. Cantidades máximas de biomasa, actividad lacasa y concentración de glucosa residual en monocultivos y consorcios. Las letras superíndices representan la diferencia significativa entre los experimentos.

Experimento cinético	Biomasa máxima (g l ⁻¹)	Glucosa Residual (g l ⁻¹)	Actividad lacasa máxima (U l ⁻¹)
<i>T. versicolor</i> con AR27	0.657 ^c	2.487 ^a	170.830 ^c
<i>T. versicolor</i> sin AR27	0.757 ^{bc}	1.830 ^a	95.030 ^c
Consorcio con AR27	1.391 ^a	0.394 ^b	851.800 ^b
Consorcio sin AR27	1.000 ^b	1.620 ^a	1652.700 ^a
<i>P. putida</i> con AR27	0.940 ^B	3.216 ^A	NA
<i>P. putida</i> sin AR27	1.660 ^A	1.311 ^B	NA

NA: no se aplica. La concentración de glucosa residual se obtuvo a las 139 h para los cultivos de *T. versicolor* y los consorcios, y a las 12 h para *P. putida*.

4.3. Consumo de glucosa

La concentración de glucosa en los monocultivos y en los consorcios de *T. versicolor* y *P. putida* se muestra en la Figs. 34 y 35. A las 139 h hubo 1.83, 2.48, 0.39 y 1.62 gl^{-1} de glucosa para los cultivos *T. versicolor* con y sin AR27 y consorcios con y sin AR27, respectivamente (Tabla 14). En los cultivos de *T. versicolor* con y sin AR27, así como en el consorcio sin AR27, se consume alrededor del 75% de glucosa a las 200 h, en cambio el mismo porcentaje se obtiene 77 h antes en el consorcio con AR27, sugiriendo que la presencia de AR27 en el consorcio induce el consumo de glucosa (Figura 9). Respecto a los cultivos de *P. putida*, a las 12 h se consumieron 15.9 y 64.5% de glucosa con y sin AR27, respectivamente (Tabla 14). Estos resultados están relacionados con el crecimiento de la biomasa del consorcio, es decir, el consumo de glucosa es mayor en el consorcio y en presencia de AR27 porque la interacción microbiana promueve el crecimiento mutuo y porque ante la necesidad de eliminar contaminantes del medio de cultivo, es fácil pensar que ambos organismos utilizaran más recursos del entorno para producir enzimas que incentiven la sobrevivencia de ambos.



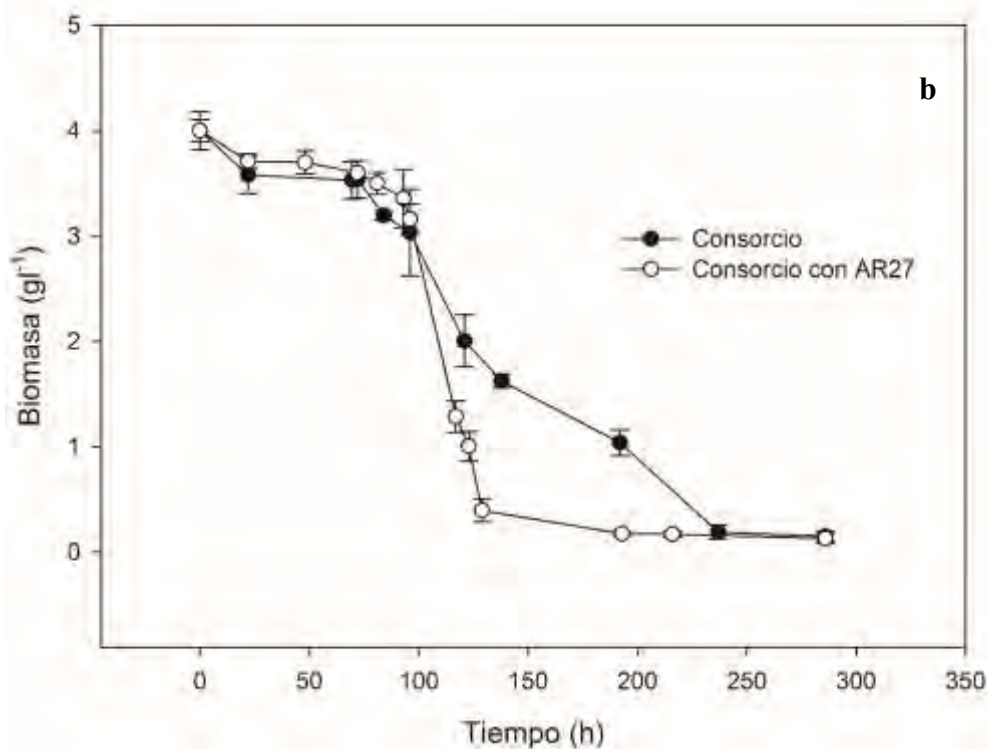


Figura 34. Consumo de glucosa para a) los cultivos de *T. versicolor* con y sin AR27 y b) los cultivos del consorcio con y sin AR27

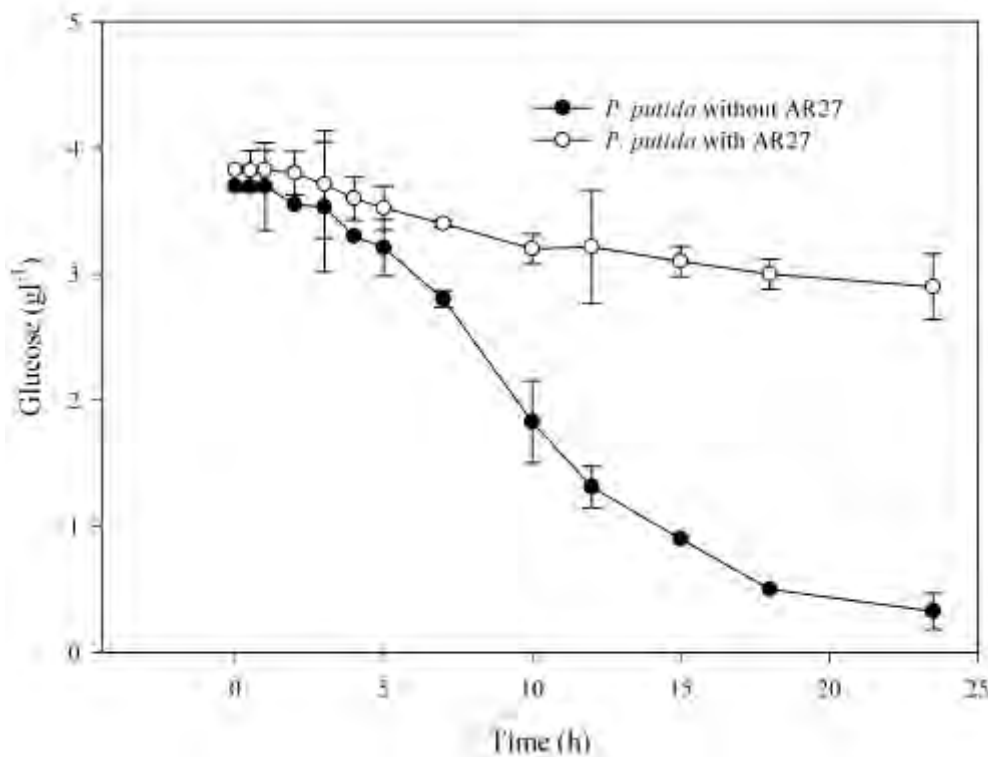


Figura 35. Consumo de glucosa con monocultivos bacterianos en presencia y ausencia de AR27.

En monocultivo de hongos sin AR27 el consumo de glucosa fue más lento (aproximadamente 10 veces) que el de la bacteria, observe que el hongo tardó 240 h para consumir 99% de glucosa y la bacteria lo hizo a las 12 h (**Figura 35**), por lo que es posible que en el consorcio el hongo entre a un estado de inanición por glucosa. Esta característica es propia de la naturaleza fisiológica de los microorganismos, aquí lo que vale la pena resaltar es la estrategia para que a pesar de estas condiciones de consumo diferentes, haya sido posible crecer a ambos microorganismos para un fin en particular.

Hasta aquí se presentan dos evidencias de las mejoras del consorcio. La primera es aumentar densidad celular fúngica y asociarse a la bacteria para promover el consumo de sustratos. La glucosa es una fuente de carbono fácil de asimilar por la mayoría de los organismos involucrados en procesos de eliminación de colorantes (Zhu *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Kurade *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2006), sin embargo otras fuentes alternativas podrían estudiarse en este consorcio para mejorar valores de costo/eficiencia. No es atrevido pensar que fuentes de carbono provenientes de los desechos agroindustriales sean candidatos viables. Lo que aquí se deja como evidencia es el mejoramiento en el consumo de sustrato como resultado de la interacción de *P. putida* y *T. versicolor*.

La presencia de un carbohidrato simple como la glucosa, xilosa o sacarosa son necesarias para el crecimiento del microorganismo y la consecuente producción de actividad lacasa. En cuanto a la fuente de nitrógeno las más frecuentes son la peptona de carne, bactopectona, extracto de soya, nitrato de sodio, cloruro de amonio, sulfato de amonio, extracto de malta, triptona, sulfato de amonio. En algunos casos, la producción de lacasas se favorece con altos niveles de nitrógeno. Así sucede con *Cryptococcus albidus* FIST3 (Singhal *et al.*, 2009). Para otros casos la producción de lacasas se favorece restringiendo los niveles de nitrógeno, esto sucedió en cultivos de *Pycnoporus cinnabarinus-Phlebia radiata* (Dwivedi *et al.*, 2011) y *Trametes versicolor* (Singhal *et al.*, 2009). Para *Cryptococcus albidus* FIST3 la fuente de carbono debió ser baja porque el exceso de glucosa y sacarosa produce un fenómeno denominado obstrucción de la iniciación y reduce la actividad lacasa (Singhal *et al.*, 2009), este fenómeno se puede evitar al usar sustratos poliméricos como la celulosa de acuerdo a lo que sugiere Shraddha *et al.*, (2011).

En este trabajo de investigación se realizaron pruebas con la planta acuífera *Ricciocarpus natans* para evaluar su uso como una fuente alternativa de carbono como insumo para el crecimiento de los elementos del consorcio.

4.3.1. *Ricciocarpus natans* alternativa como fuente de carbono

Los resultados que se obtuvieron de la evaluación del *Ricciocarpus natans* como proveedor de fuentes de carbono para el crecimiento fúngico mostraron que, las plántulas de *R. natans* así como los pellets inoculados disminuyeron su tamaño durante los primeros 8 días de crecimiento. De hecho, se observó que algunos pellets del *T. versicolor* funcionaron como un soporte para que las algas presentes en el sistema, que seguramente se incorporaron al cultivo junto con las plántulas de *R. natans*, crecieran muy cercanas al hongo de *T. versicolor*. Aquí pudo darse una adaptación entre algas y el hongo, sin embargo las muestras se almacenaron para posteriores estudios por parte del grupo de trabajo.

La pérdida de tamaño de los pellets del hongo al crecer en el cultivo con *R. natans*, podría ser debido a que las células se desagregan al chocar con las plántulas de *R. natans* en la agitación o porque las células mueren ante la falta de una fuente de carbono asequible para su crecimiento y mantenimiento celular.

Por otro lado para las plántulas de *R. natans* se observó que su aspecto fue diferente al final de la prueba. En los sistemas agitados las plántulas de *R. natans* presentaron mayor decoloración de la parte superior de la plántula (Tabla 11), lo cual puede estar relacionado con el daño celular. Aunado a lo anterior se observó un desprendimiento de las raíces las cuales se depositaban en el fondo del matraz. Desde el punto de vista positivo, las raíces desprendidas de las plántulas fueron soporte para el crecimiento del *T. versicolor*. En algunos casos el tamaño de las plántulas redujo.

En la siguiente tabla se presentan algunas variaciones que fueron realizadas en los experimentos de este apartado. En la cual la variable de la agitación se estudió porque en pruebas preliminares se observó que tuvo un impacto en la calidad de las plántulas de *R. natans* en cuanto a aspectos tales como el tamaño de las plántulas, la coloración y el desprendimiento de las raíces.

Tabla 15. Aspecto de planta y hongo después de 376 h

Prueba	Numero de plántulas	Color del medio de cultivo	Aspecto de <i>T. versicolor</i>	Aspecto de <i>R. natans</i>
Sin Agitación	10	Verdoso	Pellets con crecimiento de células verdes en su periferia	3 plántulas con tono verde café, con posible daño
	20	Verdoso	Pellets con crecimiento de células verdes en su periferia/ para el duplicado no hubo crecimiento verdoso en pellets	3 plántulas ligeramente decoloradas
	30	Transparente	Pellets blanquecinos, se observó una asociación del hongo con una plántula	4 plántulas ligeramente decoloradas
Con agitación	10	Transparente	café oscuro de tamaño menor a los pellets en sistemas con agitación	6 de 10 con aspecto dañado, se apreció decoloración de la planta
	20	Transparente		1 plántula perdió por completo la tonalidad verde, el resto presentan aspecto blanquecino alrededor de la planta
	30	café, turbio		8 plántulas con pérdida total de coloración verde

Los cultivos no agitados generan mejores condiciones de conservación de vida para las plántulas de *R. natans*, aunque como se ha reportado y observado para el presente estudio, la agitación mejora la producción de actividad lacasa por parte del *T. versicolor*. De resultar positiva la interacción entre ambos organismos, se requeriría de una estrategia de agitación intermitente que permita que ambas especies satisfagan sus requerimientos de crecimiento.

En la evaluación del número de plántulas de *R. natans* de 10 a 30 plántulas, se midió la actividad lacasa y la concentración de glucosa a lo largo de 376 h de cultivo. En la muestra tomada a las 24 h de cultivo se cuantificaron 0.02 gl^{-1} para el sistema con 10 plántulas, 0.04 gl^{-1} para el sistema con 30 plántulas y 0.02 gl^{-1} para el sistema con 20 plántulas. La presencia de glucosa a las 24 h podría estar más relacionada con su incorporación a través del inóculo de *T. versicolor* agregado al sistema, más que por su producción en el sistema por parte de *R. natans*. Como se puede observar en la siguiente figura, se midió la presencia de glucosa a las 144 y 376 h, en este momento ya no es posible atribuir la presencia de esas cantidades de glucosa al aspecto comentado a las 24 h, en cambio se podría atribuir a que los participantes del sistema pueden estar generándola y aportándola al cultivo. La concentración de glucosa medida a las 144 y 376 h no pudo soportar el crecimiento de *T. versicolor*, esto se observó al identificar que

el número de pellets en el sistema y su tamaño disminuyó con respecto al valor inicial de cada cultivo.

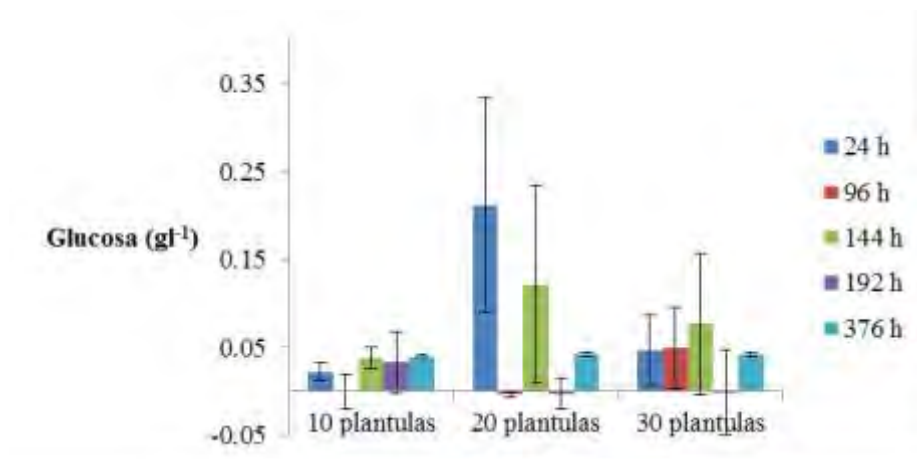


Figura 36. Glucosa detectada en co-cultivo de *R. natans* con *T. versicolor*

El pH del sistema fue medido y se observó que conservó su valor inicial de 4.5, además de que la decoloración y disminución del tamaño de las plántulas, así como el desprendimiento de las raíces se genera a mayor velocidad bajo esta condición abiótica.

En cuando a la producción de actividad lacasa esta fue encontrada en valores de 0 hasta 32 UI^{-1} . Aunque para la mayoría de los muestreos (86.6%) se cuantifico mínima o nula. Se detectó una actividad lacasa superior a 0 en 4 de 5 muestreos del experimento con 10 plántulas, 2 de 5 para 20 plántulas y 2 de 5 para 30 plántulas. La mayor actividad lacasa fue obtenida con 30 plántulas después de 376 h de agitación. Hubo un incremento de la actividad lacasa en la prueba con 20 plántulas a los 276 h. La peculiaridad de las pruebas con mayor actividad lacasa fue el patrón de agitación al que fueron sometidas. Primero se agitaron suavemente durante 8 días con foto iluminación y después de agito con mayor velocidad durante 8 días más.

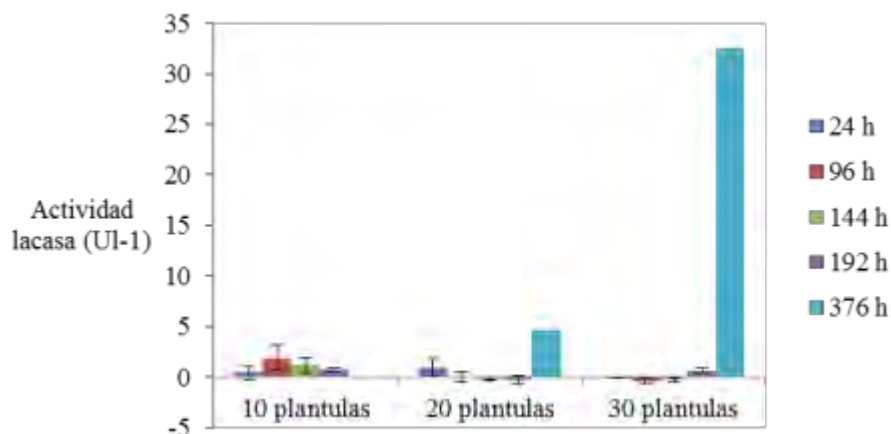


Figura 37. Producción de actividad lacasa del co-cultivo hongo planta

Basados en los resultados anteriores se considera que no hay diferencia significativa ($\alpha < 0$) en el número de plántulas, entre 10 y 30, en la actividad lacasa y la generación de glucosa. Otras condiciones de cultivo, propias para *R. natans* deberían ser evaluadas, considerando los resultados anteriores.

La mayoría de las plantas hepáticas contienen cuerpos de aceite, estructuras intracelulares únicas en el reino de las plantas. Los cuerpos de aceites acumulan terpenoides, algunos de los cuales muestran actividades intestinales tales como anticancerígenos, antibióticos, anti apetito y actividades reguladoras del crecimiento de las plantas (Wuzel y Becker, 1990). Los compuestos que están contenidos intracelularmente quizá fueron liberados a través del patrón de agitación utilizado en las pruebas de esta sección, y al liberarse fueron usados por el *T. versicolor* para la producción de enzimas que aumentaron la actividad lacasa. Aún bajo estas condiciones lo que se esperaría del consorcio es que tanto la planta como el hongo sobrevivan.

En el presente estudio se da evidencia de que las condiciones estudiadas no fueron las adecuadas para el crecimiento en consorcio de *R. natans*. Aunque se ha reportado condiciones de cultivo para el *R. natans* a través de sistemas axénicos, es decir con plántulas aisladas, y con suplementos de sacarosa para la obtención de suficiente material de plantas para estudios fisicoquímicos (Wuzel y Becker, 1992), valdría la pena evaluar el costo beneficio de obtener este material vegetal, bajo dichos métodos, para que la planta funcione como proveedor de fuentes de carbono para otros microorganismos.

Lo que aquí se reporta es que bajo las condiciones estudiadas, que están a favor del crecimiento y producción de actividad lacasa de *T. versicolor*, las plántulas de *R. natans* no general suficientes carbohidratos o biomoléculas para sostener el crecimiento de *T. versicolor* en la generación de actividad lacasa. Aunque no se concluye la ineficiencia de *R. natans* como posible proveedor de fuente de carbono para otros microorganismos. La plántulas de *R. natans* no fueron estudiadas bajo otras condiciones, debido a que las evaluadas representan una ventaja en el tratamiento de colorantes, el cual es el objetivo principal de este trabajo de investigación.

El consumo de sustrato para el *T. versicolor* además de ser empleado en la sobrevivencia, está relacionado con la producción de enzimas. Las lacasas fueron las que se estudiaron aquí, en el siguiente apartado se muestra la tercera ventaja del consorcio sobre la producción de actividad lacasa.

4.4. Actividad lacasa

La actividad lacasa de *T. versicolor* en monocultivos y en los consorcios se muestra en la **Figura 36**. La máxima actividad lacasa se alcanzó a las 168 y 158 h, respectivamente, en los consorcios con AR27 (7851.80 UI⁻¹) y sin AR27 (1652.70 UI⁻¹), y fue menor ($p < 0.05$) en el consorcio con AR27 (**Tabla 14**). Por otro lado, no hubo diferencia ($p > 0.05$) para la actividad lacasa entre los monocultivos de *T. versicolor* con y sin AR27 (**Tabla 14**). Lo anterior sugiere que la presencia de la bacteria aumentó la actividad lacasa. En la **Figura 36** se puede observar que en el monocultivo de *T. versicolor* sin AR27 la actividad lacasa empezó a decaer a la 100 h y para *T. versicolor* con AR27 a las 120 h. Por el contrario, para los cultivos en consorcios no se observó decaimiento de la ac

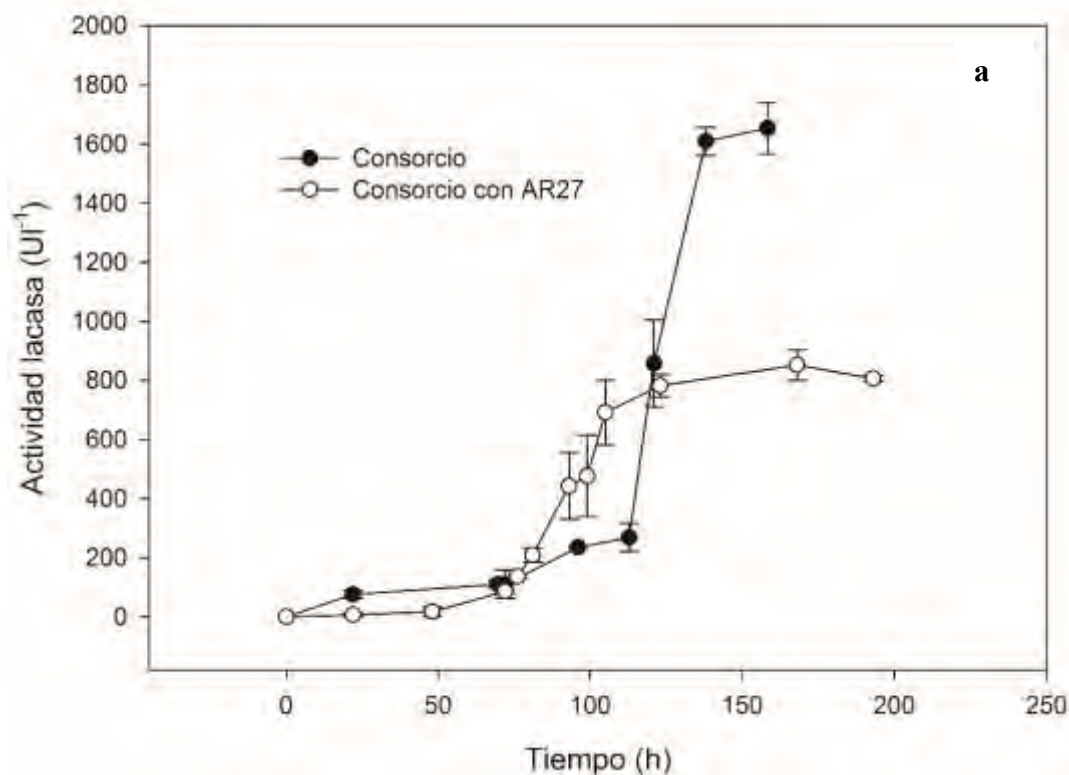


Figura 38. a) Evolución de la actividad lacasa en consorcio con y sin AR27.

De acuerdo a la literatura, hay dos maneras de demostrar que un sistema mejoró la producción de lacasas. La primera es con base en la cantidad y la segunda con base en la calidad. En este estudio se valoró la cantidad de enzimas lacasas en función de la actividad que estas presentan. La evidencia en el mejoramiento de la cantidad es fácil de ver en la **Figura 36**. Aunque la calidad de las lacasas no fue evaluada, vale la pena

mencionar que si se compara la actividad lacasa de los consorcios contra los monocultivos fúngicos al final de la bioreacción, se puede observar que la actividad lacasa no disminuyó en los consorcios. Lo anterior podría estar altamente relacionado con el cambio de las características de las enzimas, mismas que a pesar de las condiciones cambiantes no decrecientan su actividad. Con frecuencia la estabilidad enzimática de las lacasas está relacionada con la producción de nuevas isoformas.

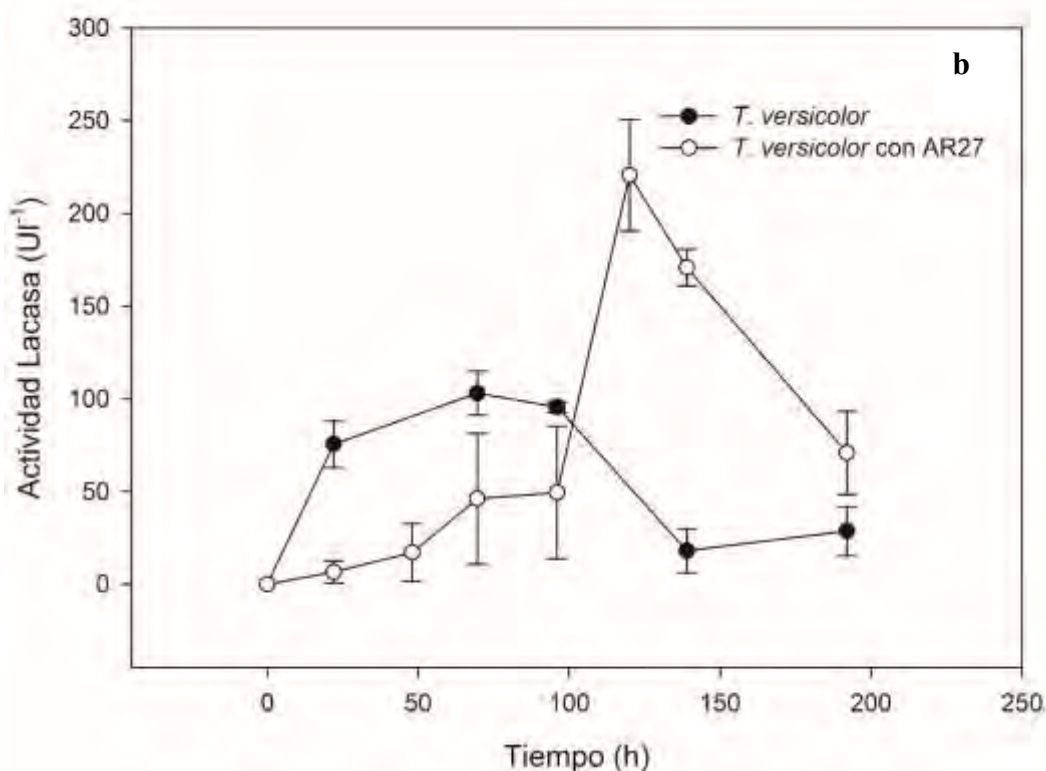


Figura 38. b) Evolución de la actividad lacasa en consorcio con y sin AR27.

Los inductores son moléculas que afectan el metabolismo del organismo productor de lacasas, estresándolo (Jaszek *et al.*, 2006) o influyendo a nivel genético. La acción del inductor se puede observar a través del incremento de la actividad lacasa o en la disminución del tiempo de producción.

La exposición de *T. versicolor* o de *A. biennis* al herbicida paraquat, aumentó la actividad lacasa como resultado de la presencia de sistemas de protección contra el estrés oxidativo, Las lacasas forman parte del sistema antioxidante (Jaszek *et al.*, 2006).

La bacteria como inductor biológico aumentó la actividad lacasa alrededor de 8.96 veces en el consorcio con AR27 y 17.39 veces en el consorcio sin AR27, en

comparación con el monocultivo de *T. versicolor* sin AR27. Los inductores biológicos representan toda clase de consorcios entre hongos/hongos (Kuhar *et al.*, 2015), hongos/levadura (Hailei *et al.*, 2009), hongos/bacterias (Kurade *et al.*, 2012), entre otros.

Se ha demostrado que la sobreproducción de lacasas en el consorcio de *Trametes versicolor* BAFC 42FC con *Ganoderma lucidum* E47 esta atribuida a la interacción entre los organismos en el consorcio (Kuhar *et al.*, 2015). En el presente estudio, la interacción entre *P. putida* y *T. versicolor*, fue la causa del aumento en la biomasa fúngica y la actividad lacasa, en respuesta a: i) una competencia por el sustrato, con ventaja para las células bacterianas porque a pH de 4.5 sin AR27 consumen glucosa a una velocidad aproximadamente de 10 veces mayor que la del hongo y ii) la presencia de metabolitos bacterianos en el inóculo y que podría seguir produciendo durante su crecimiento en el consorcio. Se ha reportado que la actividad lacasa aumenta hasta 1.18 veces más respecto al control, en el consorcio de *T. versicolor* con *Candida sp.* HSD07A, debido a que la cepa HSD07A consume 99% de la glucosa del medio de cultivo en 10 h y en respuesta a la inanición por glucosa, *T. versicolor* aumenta la actividad lacasa (Hailei *et al.*, 2009). La producción de lacasas por inducción biológica es el resultado de fenómenos relacionados con cambios morfológicos y de los patrones de crecimiento de los miembros del consorcio, la diversificación de las isoformas de lacasas y la generación de metabolitos secundarios. La sobre producción de lacasas de *Trametes sp.* AH28-2 en cocultivo con *Trichoderma sp.* ZH1 estuvo relacionada con la producción de una nueva isoforma de lacasa (Zhang *et al.*, 2006). Una sustancial inducción de la actividad lacasa en el hongo *R. solani*, fue causada por los metabolitos antifúngicos producidos por la bacteria *Pseudomonas fluorescens* (Crowe y Olsson, 2001), mismos que no fueron identificados. En los reportes relacionados con la producción de lacasas con consorcios, se observa que los consorcios se conforman como resultado de una contaminación accidental durante la producción de lacasas (Hailei *et al.*, 2009), mediante organismos extraídos de un ambiente natural (Jaszek *et al.*, 2006) y en función sus capacidades para producir lacasa (Baldrian, 2004), aunque no siempre la interacción entre organismos mejora la producción de lacasas. Esto último se reportó en el estudio del consorcio conformado por *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus citrinopileatus* (ambos degradadores de lignina), en los cuales la producción de enzimas

lignocelulósicas disminuyó (entre estas lacasas y Mn-peroxidasas) (Carabajal *et al.*, 2012).

Por otro lado, se debe comentar que hubo problemas técnicos en el crecimiento de la biomasa fúngica, bajo las condiciones estudiadas. Tal como al inicio de la sección de resultados se indicó, hubo pruebas en las que el hongo no creció porque las bacterias consumieron la fuente de carbono sin dejar alternativas para el hongo. Aun con la estrategia implementada, hubo casos en donde el hongo moría, y las pruebas debían ser descartadas. Para evitar esta situación, se evaluó el efecto de la concentración de biomasa fúngica en el crecimiento en consorcio de *T. versicolor* y de la actividad lacasa. La **Figura 39** muestra los resultados obtenidos en esta etapa del estudio.

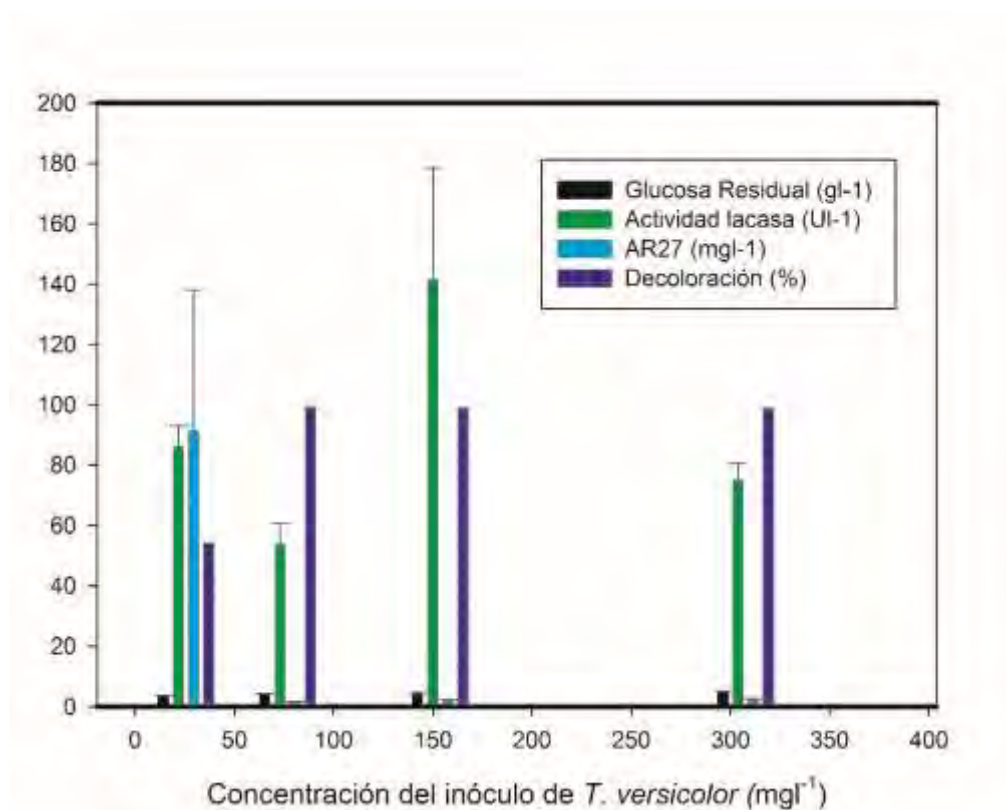


Figura 39. Efecto de la concentración del inóculo fúngico en la actividad lacasa, glucosa residual, contenido de AR27 y decoloración.

Las variables cuantificadas fueron la glucosa residual, el porcentaje de decoloración, la concentración de AR27 y la actividad lacasa. Sin embargo, la variable que resalta por su importancia es la de la actividad lacasa. De la **Figura 37** se puede observar que por abajo de 50 mg l⁻¹ de biomasa fúngica, la probabilidad de que las bacterias crezcan

evitando el crecimiento de hongos es elevada. Observe que la concentración de AR27 disminuye a 90 mg l^{-1} de 200 mg l^{-1} iniciales y que la actividad lacasa alcanzó un máximo de 84 UI^{-1} . El caso contrario se presentó al usar concentraciones de inóculo fúngico por arriba de 50 mg l^{-1} y hasta de 150 mg l^{-1} , en los cuales se encontraron porcentajes de decoloración de 99% para ambos casos y la actividad lacasa aumentó hasta 142 UI^{-1} para el caso de 150 mg l^{-1} de biomasa fúngica. Mayores concentraciones de inóculo fúngico no garantizan un aumento en la actividad lacasa, es así que a una concentración de 300 mg l^{-1} de biomasa fúngica generó 78 UI^{-1} de actividad lacasa. Para los siguientes experimentos la concentración de biomasa fúngica que se utilizó fue la de 150 mg l^{-1} , con lo que se evitó el problema técnico.

Existen diversas formas de inocular al hongo para el crecimiento en cultivos líquidos, entre ellas se destacan, los agregados celulares, en forma de pellets homogenizados, inóculo líquido con alta densidad celular y discos de agar removidos de la zona de crecimiento exponencial. Cada uno de estos casos es particular para el tipo de colorante y el sistema de bioreactor empleado, pero un común entre las pruebas es que a mayor concentración del inóculo inicial es mayor el porcentaje de decoloración (Jaramillo *et al.*, 2014).

Finalmente, fue relevante cuestionarse porqué la actividad lacasa y la biomasa fúngica mejoran ante la presencia de las bacterias. Para responder esa incógnita se evaluó el efecto de la concentración del inóculo bacteriano, así como el tipo de inóculo bacteriano. Los resultados se presentan en la siguiente sección.

4.5. Efecto del inóculo bacteriano en la variación de la biomasa fúngica y la actividad lacasa

Se evaluó el efecto del inóculo bacteriano lavado, sin lavar y sin lavar-filtrado-esterilizado (SLFE; sin bacterias), en otras palabras, lo que se incorporó al cultivo de células fúngicas fue: a) células bacterianas vivas libres de residuos, b) células bacterianas vivas con residuos y nutrientes que contiene el medio de cultivo de soya de tripticaseína y c) medio de cultivo de soya de tripticaseína sin células bacterianas, pero con metabolitos producidos por la bacteria, respectivamente. En el cultivo del hongo adicionado con el inóculo SLFE se obtuvo una biomasa de 1.138 g l^{-1} a las 144 h (**Tabla 15**). Con el inóculo sin lavar a concentraciones de 0.0276 y 0.0828 g l^{-1} , se obtuvo 0.958 y 0.930 g l^{-1} de masa fúngica, respectivamente. Sin embargo, estas concentraciones no fueron diferentes ($p > 0.05$), tampoco con respecto a la obtenida con el inóculo SLFE. Por el contrario, con el inóculo sin lavar, pero a concentraciones mayores de 0.1656 y 0.2760 g l^{-1} , la masa fúngica final disminuyó (88 y 100%, respectivamente) significativamente (**Tabla 15**).

Tabla 16. Producción de biomasa fúngica y variación de la actividad de lacasa en cultivos fúngicos sembrados con diferente tipo y concentración de inóculo bacteriano.

Concentración del inóculo bacteriano (g l^{-1})	Biomasa del hongo (g l^{-1})	Actividad lacasa (U l^{-1})
SLFE (sin bacterias)	1.138 ^a	2245.700 ^b
0.0276-sin lavar	0.958 ^a	736.010 ^c
0.0828-sin lavar	0.930 ^a	3066.590 ^a
0.1656-sin lavar	0.219 ^b	364.250 ^{cd}
0.2760-sin lavar	0.001 ^b	9.459 ^d
0.0828-lavado	0.773 ^a	237.770 ^{cd}
0.1656-lavado	0.750 ^a	276.350 ^{cd}
0.2760-lavado	0.914 ^a	313.960 ^{cd}

En las pruebas con inóculo lavado a concentraciones de 0.0828, 0.1656 y 0.2760 gl^{-1} , la concentración final de masa fúngica no fue diferente ($p > 0.05$), tampoco con respecto a la obtenida con el inóculo SLFE (**Tabla 15**).

La variación de actividad lacasa en relación al tipo y concentración del inóculo bacteriano se muestra en la **Tabla 15**. Cuando el cultivo de *T. versicolor* con AR27 se inoculó con el cultivo sin lavar de la bacteria a concentración de 0.0828 gl^{-1} , se obtuvo la mayor ($p < 0.05$) actividad lacasa (3066.59 UI^{-1}), seguido por el cultivo inoculado con SLFE (2245.70 UI^{-1}) y por el inóculo sin lavar a concentración de 0.0276 gl^{-1} (736.01 UI^{-1}) (**Tabla 15**). Sin embargo, a mayor concentración del inóculo sin lavar (0.1656 y 0.2760 gl^{-1}), la actividad lacasa disminuyó significativamente (0.219 y 0.001 gl^{-1} , respectivamente) con respecto a la actividad lacasa obtenida a 0.0828 gl^{-1} (**Tabla 15**). Finalmente, la menor actividad lacasas se obtuvo cuando se usó el cultivo lavado de la bacteria.

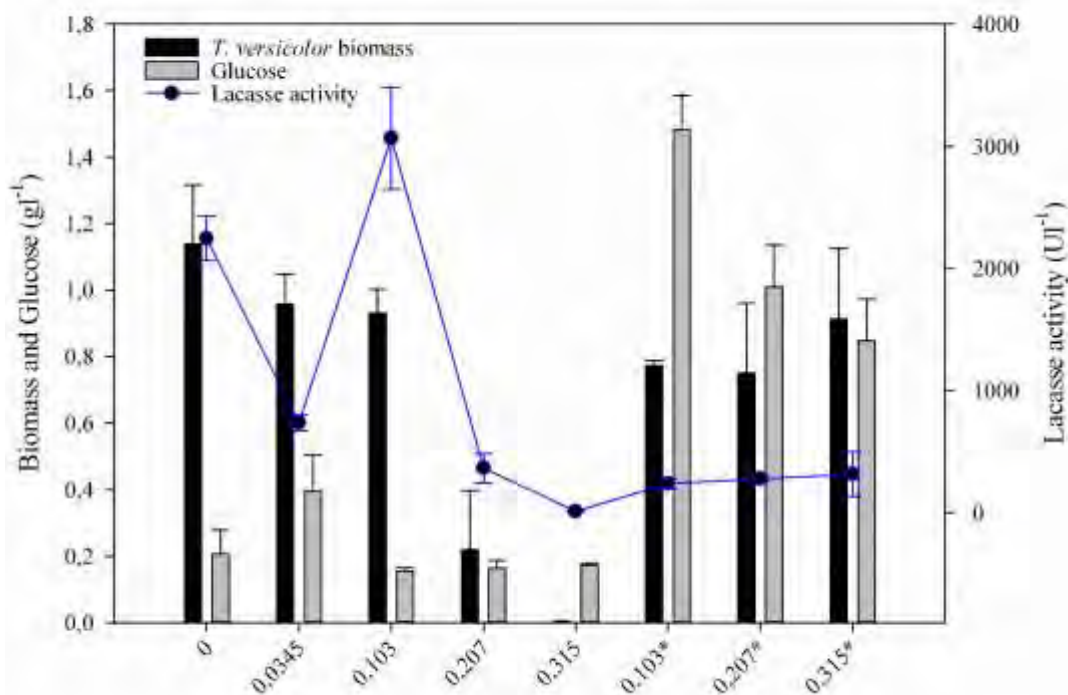


Figura 40. Masa de *T. versicolor*, glucosa residual y actividad lacasa medida en sistemas con concentración del inóculo bacteriano desde 0.0345 hasta 0.315 gl^{-1} . Los valores con asterisco refieren al inóculo bacteriano lavado.

Con la **Figura 38** es fácil observar que el inóculo lavado representa una desventaja en la producción de lacasa. Es poco probable que en el proceso de lavado las bacterias pierdan capacidades para el mejoramiento del consorcio, a juzgar por el método de lavado. Incluso incorporar diferentes concentraciones de bacterias lavadas al cultivo del hongo, no afectó la producción de actividad lacasa. Esto llevó a sugerir que para aumentar la actividad lacasa no se requiere de la biomasa bacteriana, sino en las sustancias que genera. Fue por eso que el medio de cultivo soya de tripticaseína sin células bacterianas y el mismo medio con concentraciones de bacterias de 0.034 a 0.103 gl^{-1} aumentaron la actividad lacasa.

Los resultados indican que las sustancias que produce la bacteria fueron las responsables del aumento de la actividad lacasa. Incluso se realizó una prueba adicional con caldo de soya de tripticaseína recién estéril sin usarse en la preparación de bacterias, resultando en la baja generación de actividad lacasa, con esta prueba se descartó la posibilidad de que los componentes del caldo de soya de tripticaseína fueran los responsables del aumento de la actividad lacasa. Además, en cierto modo la presencia de bacterias vivas a concentraciones por arriba de 0.103 gl^{-1} pueden ser perjudiciales para el crecimiento fúngico y en consecuencia la actividad lacasa. No se estudió cuáles fueron las sustancias responsables del aumento de la actividad lacasa, quizá sea tema para otros trabajos de investigación.

Para aumentar la baja producción de actividad lacasa generada en monocultivos microbianos (Mann *et al.*, 2015), se usan inductores químicos que, aunque son eficientes podrían afectar negativamente al medio ambiente (Jaszek *et al.*, 2006). Para el presente estudio se usó como inductor biológico a *P. putida* permitiendo mejorar el crecimiento fúngico y la actividad lacasa. En los consorcios los microorganismos encuentran beneficio al reutilizar productos intermediarios que uno u otro genera (Romaní *et al.*, 2006). En este estudio el *T. versicolor* descompuso al AR27 en compuestos aromáticos que podrían resultarle una limitante para su crecimiento (Gavril y Hodson, 2007), aunque si estos compuestos fueron reutilizados por *P. putida*, considerando su capacidad degradativa de aromáticos (Oren *et al.*, 1991), el hongo crecería sin restricciones produciendo mayor actividad lacasa. Resaltó en este estudio, que el crecimiento bacteriano fue menor en comparación con lo reportado en literatura (Basu *et al.*, 2006), como resultado de la acidez del medio de cultivo (Kirk *et al.*, 1985), sin embargo, creció en el nivel suficiente para incrementar el crecimiento fúngico y la

actividad lacasa. La presencia de AR27 disminuyó el consumo de glucosa y el crecimiento bacteriano, esto es semejante a lo que se reportó para *P. putida* CSV86 durante la degradación de compuestos aromáticos, como resultado de tres situaciones: (1) la glucosa no suprime la producción de enzimas para la degradación de compuestos aromáticos, (2) se activa la modulación de la captación de glucosa y (3) se suprime la producción de enzimas que utilizan a la glucosa (Basu *et al.*, 2006). En el consorcio el hongo y la bacteria crecen compartiendo espacio, esta asociación podría ser utilizada para proteger células de las condiciones abióticas, tal como las perlas de alginato que protegen células de *P. Putida* durante la degradación de fenol (Chung *et al.*, 2003).

Tabla 17. Comparación de la producción de actividad lacasa del presente estudio con datos de la literatura

Microorganismo	Actividad Lacasa (U ^l)	Referencia
<i>Cryptococcus albidus</i>	832 200	(Singhal y col. 2012)
<i>Ganoderma lucidum</i>	74 840	(Manavalan y col. 2013)
<i>Pycnoporus sp.</i> SYBC-L3	72 000	(Liu y col. 2013)
<i>Trametes versicolor</i> CICC 14001	23 140	(Wang y col. 2013)
<i>Trametes versicolor/Candida sp.</i> HSD07A	10 500	(Hailei y col. 2009)
<i>Trametes sp.</i> AH28-2/ <i>Trichoderma sp.</i> ZH1	6 210	(Zhang y col. 2006)
<i>Trametes versicolor</i> ATCC 20869	3066	Presente estudio
<i>Trametes versicolor</i> ATCC 42530	1 700	(Blánquez y col. 2004)
	2 000	
<i>Trametes versicolor</i> ATCC 42530	1 100	(Romero y col. 2006)
<i>Trametes versicolor</i> HEMIM-9	800	(Bertrand y col. 2015)
<i>Trametes versicolor</i> CICC 14001	588.9	(Wang y col. 2013)

La interacción entre *P. putida* y *T. versicolor* aumento la actividad lacasa, quizá porque ambos organismos compitieron por el consumo de glucosa, en la que las bacterias tuvieron ventaja, porque consumieron glucosa 10 veces más rápido que los hongos.

Además, los productos generados por las bacterias durante el crecimiento en consorcio, aumentaron la producción de actividad lacasa, participando posiblemente como mediadores o inductores. En la literatura, se diferencian dos tipos de compuestos para aumentar la producción de lacasas; los mediadores y los inductores. Los mediadores son moléculas de bajo peso molecular fáciles de oxidar por las lacasas, que transportan electrones hasta una molécula compleja que las lacasas no pueden oxidar (Mann *et al.*, 2015). Por otro lado, los inductores son moléculas u organismos que afectan el metabolismo del organismo productor de lacasas, estresándolo ((Jaszek *et al.*, 2006) e influyendo a nivel genético (Hailei *et al.*, 2009). Se ha demostrado que la sobreproducción de lacasas en el consorcio de *Trametes versicolor* BAFC 42FC con *Ganoderma lucidum* E47 estuvo relacionada en la manera en cómo interactuaron (Kuhar *et al.*, 2015). Así la interacción entre microorganismos que propició la competencia por el sustrato, aumentó 1.18 veces la producción de lacasas en el consorcio de *T. versicolor* con *Candida sp.* HSD07A, debido a que la cepa HSD07A consumió 99% de la glucosa del medio de cultivo en 10 h dejando en inanición a *T. versicolor* (Hailei *et al.*, 2009). Por otro lado, se reportó la inducción de la actividad lacasa en el hongo *R. solani* porque *Pseudomonas fluorescens* produjo metabolitos antifúngicos que estimularon al hongo (Crowe y Olsson, 2001). La razón por la que la actividad lacasa mejoró al aumentar 3 veces la concentración inicial de bacterias, puede deberse al aumento del efecto de inanición, al aumento de la concentración de los metabolitos bacterianos o a ambas.

Finalmente, una **Tabla 16** comparativa que muestra el mayor valor de actividad lacasa obtenido en el presente estudio, en comparación con los datos en literatura. Como se mencionó *Cryptococcus albidus* fue el mejor productor de actividad lacasa el cual rebasó el valor del consorcio *T. versicolor/P. putida* por 271.4 veces, sin embargo hay que mencionar que la misma forma de inducción podría ser evaluada en ese microorganismo incrementando aún más la actividad lacasa. En general la producción de actividad se encuentra dentro de los niveles de producción para hongos inducidos químicamente o mediante métodos biológicos.

4.6. Decoloración de AR27

El proceso de decoloración del AR27 implica la desaparición de sus grupos cromóforos y la formación de compuestos derivados. La toxicidad de sus compuestos derivados no está reportada en la literatura, aunque la probabilidad de que presenten características de toxicidad es elevada, pues lo que sí se ha reportado es que los derivados de la decoloración decrementan la capacidad de crecer del *T. versicolor* y son compuestos que en su estructura química presentan anillos aromáticos de benceno y naftaleno. En las pruebas realizadas en esta tesis, se corroboró la decoloración del AR27 en los dos sistemas conformados por *T. versicolor* con AR27 y el consorcio con AR27. Como se observará en la **Figura 39** los tiempos de decoloración son semejantes, porque un requisito para la formación del consorcio era que la biomasa hubiera crecido a un nivel razonable para evitar la muerte causada por inanición de glucosa impuesta por las bacterias (a las 72 h).

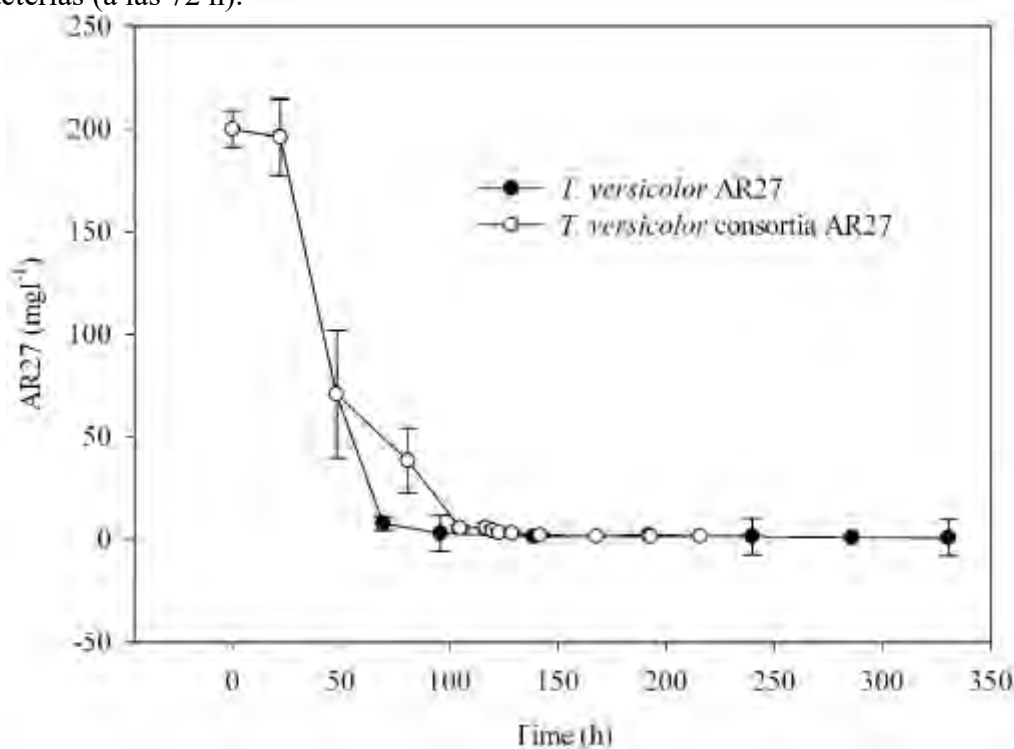


Figura 41. Disminución de la concentración de AR27 en monocultivo y consorcio.

Lo que es interesante es que en ambos sistemas la producción de actividad lacasa fue diferente (sección actividad lacasa), más bien asociada a la presencia de metabolitos bacterianos, aunque es muy probable que la cantidad de enzimas requeridas para

descomponer 200 mg^l⁻¹ de AR27 sea la misma en ambos sistemas. Lo que podría sugerir un punto de cambio del bioproceso. Es decir, justo en el momento en el que se inocularon a las bacterias, en proceso ya no está enfocado en la decoloración sino en la degradación de los derivados del AR27. Y como el colorante afecta el crecimiento de las bacterias, su desaparición garantiza el acoplamiento de ambos microorganismos, en cambio las bacterias podrían estar iniciando un proceso de actividad enzimática enfocada en degradación de compuestos aromáticos.

Hay pocas aplicaciones prácticas sobre el uso monocultivos de hongos o bacterias para el tratamiento de colorantes azoicos. El motivo es que en los monocultivos se han identificado inconvenientes, relacionados con una elevada susceptibilidad a la contaminación biológica (Lu *et al.*, 2009), tienen baja producción de enzimas decolorantes (Jadhav *et al.*, 2008; Kuhar *et al.*, 2015), las cepas simples no pueden adaptarse a las complejas y variables condiciones abióticas del efluente (O'Neill *et al.*, 1999) y las enzimas decolorantes pueden desactivarse en poco tiempo (Ayed *et al.*, 2010). Aunado a lo anterior, un número reducido de hongos usa al colorante azoico como fuente de carbono y energía, y el crecimiento del micelio consume mucho tiempo. En el caso de la degradación bacteriana, hay baja eficiencia en la degradación colorantes azo bajo condiciones aeróbicas, porque el oxígeno es más eficiente aceptor de electrones en comparación con el compuesto azo (Ayed *et al.*, 2010). Los consorcios microbianos ofrecen ventajas sobre el uso monocultivos en el tratamiento de colorantes, debido a que cada cepa que conforma el consorcio puede actuar en la molécula del colorante en diferentes posiciones o podrían usar los productos de descomposición producidos por otra cepa para subsecuentes descomposiciones (Jadhav *et al.*, 2008; Kurade *et al.*, 2012).

El aumento en la eficiencia de la decoloración está bien ejemplificado en el reporte de Jadhav *et al.*, (2008), quienes estudiaron al consorcio formado por *Galactomyces geotricum* MTCC 1360 y *Bacillus sp.* VUS, con el cual se obtuvo 100% de decoloración del compuesto azoico cafe 3REL en 2 h, mientras que fueron menores los porcentajes de decoloración en monocultivo; *Galactomyces geotricum* MTCC 1360 (39% en 24 h) y *Bacillus sp.* VUS (100% en 5 h). El consorcio excretó a las enzimas lignina peroxidasa, tirosinasa y rivo flavina reductasa, mismas que aumentaron la decoloración, mediante el sinergismo entre enzimas. De forma semejante Kuhar *et al.*, (2015), reportaron como la eficiencia en la decoloración de verde de malaquita aumentó

3 veces, en comparación con los monocultivos, durante su tratamiento con el consorcio formado por *G. lacidum* y *T. versicolor*. El consorcio decoloró eficientemente debido a la producción de una isoforma de la lacasa, que no producen ninguno de los hongos en monocultivo. A pesar de que los consorcios hongo-bacteria no son frecuente en la literatura, Kurade *et al.*, (2012) reportaron que el consorcio formado por *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360 como la principal especie degradadora de colorantes y a *Brevibacillus laterosporus* MTCC 2298 como decolorador secundario, disminuyó la coloración de Scarlet RR al 98% en 18 h, bajo condiciones estáticas. El crecimiento en consorcio cambió los niveles de producción de veratril alcohol oxidasa, lacasas, tirosinasa y NADH-DCIP reductasa. Mediante análisis de GC-MS, se demostró que el consorcio degradó al Scarlet RR mediante una ruta metabólica diferente a la de los monocultivos. Se debe enfatizar que *Brevibacillus laterosporus* MTCC 2298 es una bacteria empleada principalmente para el control biológico de insectos, nematodos, moluscos y plantas patógenas (Ruiu, 2013) y no precisamente para la degradación de colorantes, sin embargo, su interacción con *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360 resulto conveniente para el tratamiento de colorantes. En los consorcios diseñados, se conoce la manera en que cada miembro del consorcio trasforma al colorante; es así como el consorcio bacteriano NAR-2 conformado por *Citrobacter freundii* A1, *Enterococcus casseliflavus* C1 y *Enterobacter cloacae* L17 degradó al colorante rojo ácido 27 (0.1 g^{-1}). Se exploró el destino de los metabolitos generados, encontrando que el rojo ácido 27 sufre un proceso de aminación, en segundo lugar, una desulfonación durante una etapa de biodegradación microaerofílica, seguido de una azo reducción (etapa de decoloración que duro 2 h). Posteriormente bajo condiciones aerobias ocurre la mineralización (etapa que duro 48 h). Los autores propusieron una ruta metabólica, basados en la detección de los compuestos benzoil-CoA, protocatecuato, silicilato, gentisato, catecol, ácido cinámico y 2 oxopentenoato (Chan *et al.*, 2012).

Es aquí donde se hizo necesario realizar un seguimiento de compuestos aromáticos derivados de la decoloración. El primer elemento en cuestión fue prever cuáles son esas posibles moléculas que se generan después de la decoloración de AR27 y en seguida realizar un seguimiento a través de alguna prueba analítica. El siguiente apartado comenta estos detalles.

4.7. Compuestos aromáticos totales

Derivado de una revisión bibliográfica exhaustiva, se obtuvieron 6 referencias de artículos científicos que describen algunos de los compuestos generados de AR27 a través de degradación. De esta revisión resultaron 15 compuestos que podrían ser analizados en las muestras que contienen al AR27 decolorado a través del *T. versicolor* o mediante el consorcio. De los compuestos propuestos se obtuvieron características fisicoquímicas reportadas en literatura y de utilidad para la cromatografía de gases, tales como el punto de ebullición, el peso molecular, la solubilidad en agua y datos relacionados con toxicidad.

A continuación, se fueron descartando los compuestos que no resultaron tóxicos, no quedaron fuera de la elección aquellos de los que no se tuvieran datos de toxicidad. Finalmente se eligieron los que estaban disponibles en el laboratorio de grupo de trabajo.

La lista final de los compuestos elegidos fue la siguiente: naftaleno, benceno, tolueno, ácido benzoico, catecol y anilina. Los primeros resultados que se presentan en esta sección se refieren a la obtención de las curvas estándar en el GC-FID.

Se realizaron curva estándar con los compuestos CAT de manera que se pudo calcular la ecuación de la línea recta, estos datos se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 18. Ecuaciones de las líneas rectas de las curvas de calibración para los CAT

Compuesto	Ecuación	R ²	Tiempo de Retención (min)	Desvest (min)
Benceno	Y=331.1x-11.38	0.999	1.5007	0.003
Anilina	Y=3823x-94.89	0.999	4.0696	0.0171
Naftaleno	Y=3168x-38.27	0.998	8.1762	0.0138
Ácido Benzoico	Y=1813x-145.9	0.998	8.8826	0.315
Catecol	Y=1937x-137.5	0.997	8.8986	0.0424

Y representa el área bajo la curva, mientras que x representa la concentración del analito.

Las ecuaciones de la **Tabla 17** se obtuvieron al graficar la concentración del compuesto contra el valor de la señal que se convirtió en señales medidas en nA, los cuales

representan el área bajo la curva (Figura 40). Además, se presenta en tiempo de retención típico y constante para todas las concentraciones estudiadas del benceno.

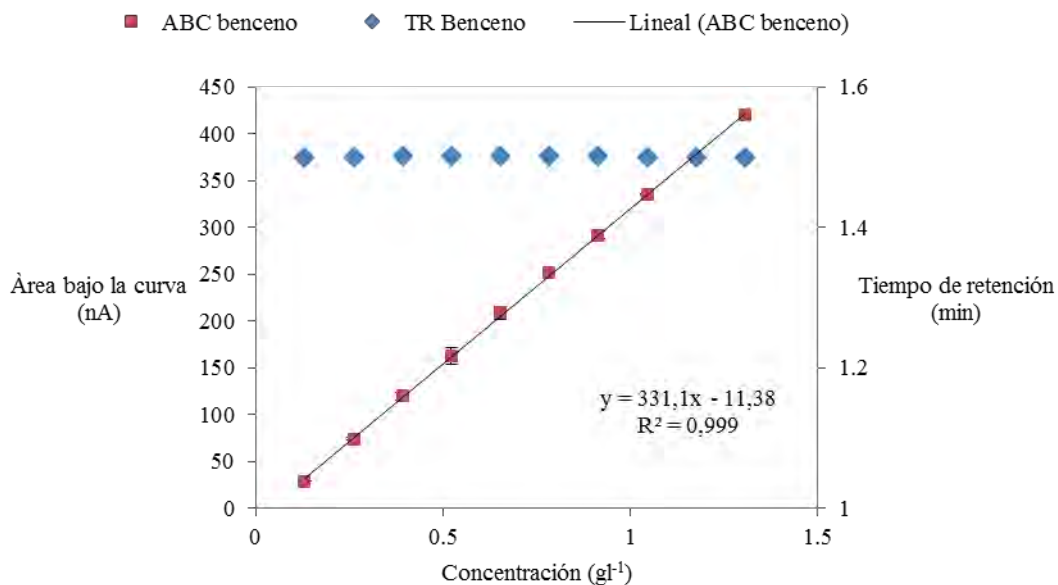


Figura 42. Línea de calibración para benceno en GC-FID

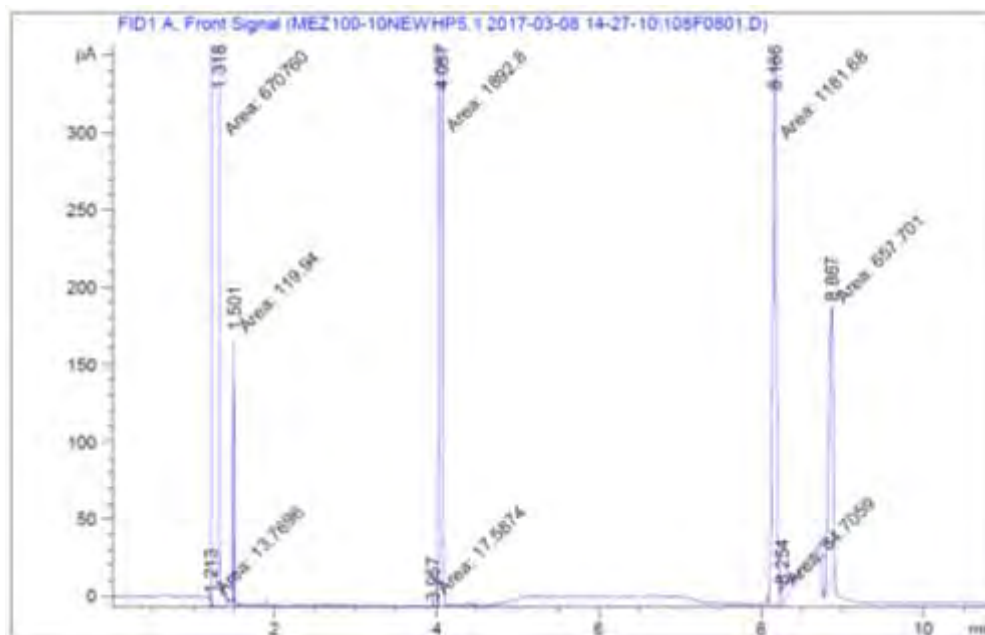


Figura 43. Cromatograma que muestra los tiempos de retención de los compuestos aromáticos estudiados como posibles metabolitos en la degradación de AR27 .

Basados en el tiempo de retención las señales van apareciendo en el cromatograma de la siguiente manera: la primera señal corresponde al metanol, que es la fase móvil de la muestra analizada, en seguida con un tiempo de retención de 1.5001 min sale el

benceno, seguido de anilina con 4.057 min, a los 8.166 min sale el naftaleno, pocos segundos después con 8.254 min se puede ver la señal del ácido benzoico y finalmente con 8.867 min se aprecia la señal del catecol.

Estos últimos tres compuestos conforme su concentración aumenta, se traslapan las señales sin la posibilidad de diferenciar la presencia de ellos. No obstante, para las concentraciones que se esperaba encontrar, el método del GC-FID con las características sugeridas es adecuado. En la **Figura 41** se puede observar lo antes comentado.

El análisis de las muestras problema se realizó sin poder encontrar alguno de los compuestos sugeridos.

Tabla 19. Extracción de datos del GC-FID y su respectivo equivalente en $g\ l^{-1}$ de acuerdo con las gráficas estándar.

Muestra	Compuesto /área bajo la curva	Concentración ($g\ l^{-1}$)
<i>T. versicolor</i> a las 57 h	Anilina/ 94.625; Catecol/13.4201	Con base en la curva estándar las concentraciones son indetectables
<i>T. versicolor</i> a las 66 h	Catecol/13.4307	
<i>T. versicolor</i> a las 75 h (1-2)	Catecol/13.5205	
<i>T. versicolor</i> a las 75 h (2-2)	Anilina/ 97.385; Catecol/13.8604	Para anilina 6.52×10^{-4} , mientras que para catecol con base en la curva estándar las concentraciones son indetectables
<i>T. versicolor</i> a las 93.5 h (1-2)	Anilina/ 93.9177; Catecol/11.603	Con base en la curva estándar las concentraciones son indetectables
<i>T. versicolor</i> a las 93.5 h (2-2)	Catecol/12.8853	Con base en la curva estándar las concentraciones son indetectables

Las concentraciones a las cuales se presentan son indetectables para las concentraciones estudiadas en el método propuesto. Además de que no reflejan ninguna tendencia sobre los compuestos aromáticos sugeridos.

En la **Figura 42** se aprecian las señales generadas al analizar las muestras de 57, 66, 75 y 93.5 h de bioreacción. Es importante resaltar que la metodología para separar los

compuestos propuestos de una muestra blanco fue realizada, y las señales de los CAT aparecieron en concentraciones menores, el porcentaje de recuperación fue de entre 70 y 100% para los compuestos estudiados. Lo anterior garantiza la separación de los compuestos sugeridos de una muestra de agua.

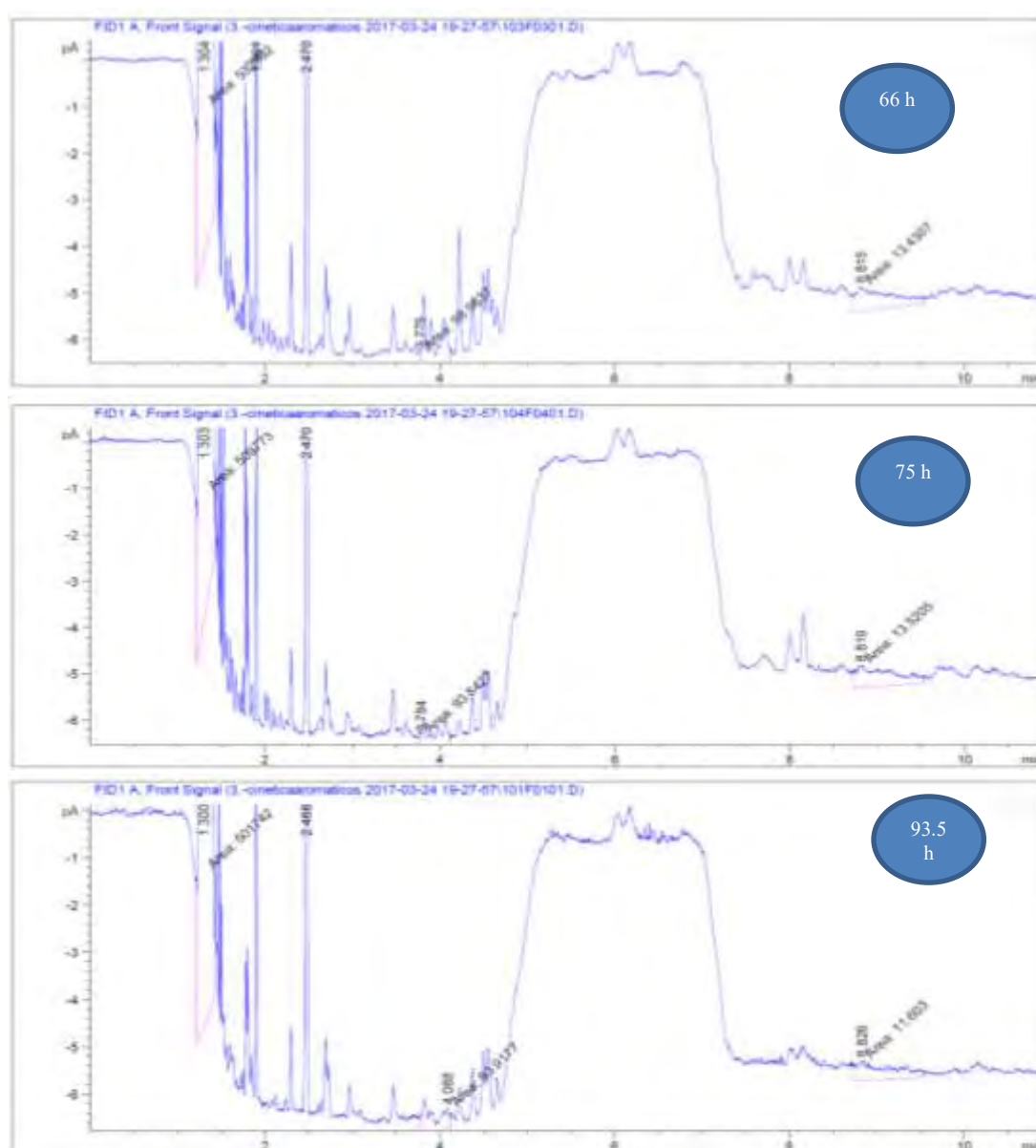


Figura 44. Cronogramas para muestras de *T. versicolor* con AR27 a diferentes tiempos del bioproceso (círculos azules, tiempo en horas).

La cromatografía de gases ha sido empleada para detectar compuestos derivados de la decoloración o degradación de colorantes azoicos (Moscipan *et al.* 2016). Como ejemplo Plum *et al.* 2003 describieron un método simple de análisis directo de 21 aminas aromáticas usando pirólisis cromatografía de gases acoplada a masas. El método

descrito no necesitó de una preparación inicial de la muestra. Un estudio semejante lo realizaron Rehorek y Plum, (2007) para detectar aromaticos sulfonados. Cabe destacar que la mejor propuesta para determinar derivados de colorantes azoicos implica el uso de una columna capilar no polar. El aspecto anterior se puede corroborar en el trabajo realizado por Skarping y Renman, (1983) quienes probaron la GC con columna capilar combinada con un detector de selectivo de nitrógeno (detector termoiónico específico, TSD) para analizar trazas derivatizados de aminas aromáticas. El método usado en este trabajo es factible para la determinación de los CAT.

Para las muestras de consorcio, tampoco hubo señales de los CAT sugeridos (datos no mostrados). Las muestras analizadas fueron del medio de cultivo fresco, filtrado para eliminar la biomasa microbiana. Las muestras que no fueron estudiadas fueron la biomasa fúngica y la del consorcio, en la que posiblemente los CAT podrían estar asociados. Un Mayor esfuerzo será necesario realizar para evaluar otros compuestos o las células de hongo y bacterias para dar seguimiento a los CAT. El seguimiento de los aromáticos no pudo ser concluido por lo tanto para las siguientes etapas del estudio se excluyó de los análisis.

La necesidad por detectar aminas aromáticas o aromaticos sulfonados en efluentes textiles es porque algunos de esos compuestos presentan propiedades toxicas. Uno de los criterios para clasificar un colorante como perjudicial para los humanos es su capacidad para romperse reductivamente, y en consecuencia formar aminas aromáticas cuando están en contacto con sudor, saliva o jugos gástricos. Algunos de esos compuestos son carcinogénicos y pueden acumularse en la cadena alimenticia, por ejemplo, los bifenilaminas tales como bencidina y 4-bifenilamina (Drumond *et al.*, 2011). El compuesto 2,3-dimetil-4-aminobenceno tiene relación con cáncer de vejiga urinaria de empleados de la industria manufacturera de colorantes (Drumond *et al.*, 2011). El compuesto N,N-dimethyl-4-aminoazobenzene tiene efecto hepatocarcinogenicos (Drumond *et al.*, 2011). En 1954 fue la causa de tumores de vejiga observados en trabajadores de la industria de colorantes el 2-naftilamina (Drumond *et al.*, 2011). Bencidina, 4-aminbifenil, monoacetilbencidina y acetilaminobifenil fueron positivos para la prueba en *Salmonella*/microsoma en presencia de S9 (Cergiglia *et al.*, 1986), en (Drumond *et al.*, 2011).

De acuerdo a la legislación de la Comunidad Europea del 17 de Julio de 1994, la aplicación de los azo colorantes en textiles está restringida a aquellos colorantes que no pueden, bajo ninguna circunstancia, ser convertidos a cualquiera de los siguientes productos: 4-aminodifenil; 4-amino-2,3-dimetilazobenceno (o-aminoazo-tolueno); 4-aminofenileter (4-4'-oxidianilina); 4-aminofeniltioeter (4,4'-tiodianilina); bencidina; bis-(-4-aminofenil)-metano (4,4'-diaminodifenilmetano); 4-cloroanilina (*p*-cloroanilina); 4-cloro-2-metil-anilina (4-cloro-*o*-toluidina); 2,4-diaminotoleno (2,4-toluilenediamina); 3,3'-diclorobencidina dihidroclorida; 3,3'-dimetoxibencidina (*o*-dianisidina); 3,3'-dimetilbencidina (*o*-toluidina); 3,3'-dimetil-4,4'-diaminofenilmetano; 2-metoxi-5-metil-anilina (*p*-kresidina); 4-metoxi-1,3-fenilelediamina sulfato hidratado (2,4-diaminoanisol); 4,4'-metilen-bis (2-cloroanilina); 2-metil-5-nitroanilina (2-amino-4-nitrotolueno); 2-naftilamina; *o*-toluidina; 2,4,5-trimetil-anilina (Drumond *et al.*, 2011).

Las nitroanilinas son aminas aromáticas que son comúnmente generadas durante la biodegradación de azo colorantes bajo condiciones anaeróbicas, formadas por una ruptura reductiva de los azo enlaces por la acción de los microorganismos presentes en aguas residuales (Khalid et al. 2009 reportado en Drumond *et al.*, 2011).

Se debe poner especial atención en la eliminación de esta clase de contaminantes, además de que un prueba de toxicidad es necesaria para corroborar la disminución de la misma.

4.8. Modelos matemáticos

Los parámetros que se encuentran en las ecuaciones de leyes de velocidad fueron obtenidos para todos los elementos que se consideraron en el consorcio. El análisis de los resultados se presenta relacionado con el tipo de cultivo estudiado.

Para los cultivos bacterianos los parámetros calculados con base en los resultados experimentales, describen el crecimiento microbiano a razón del consumo de sustrato en presencia o ausencia del colorante AR27 (**Tabla 19**). Los valores obtenidos fueron 0.014 y 0.003 h⁻¹ sin y con AR27, respectivamente y con valores de K_s de 3.778 gl⁻¹ para el cultivo sin AR27 y 3.836 gl⁻¹ para el cultivo bacteriano con AR27. Estos parámetros obtenidos a través de la linealización de la ecuación de Monod mostraron una correlación de 0.99 y 0.95, respectivamente. Además, los parámetros de *m* y Y_x para cultivos sin y con AR27, que describen características sobre el consumo de glucosa, fueron de 0.117 y 0.081 h⁻¹ para *m* y para Y_x fueron de 0.250 y 0.410, con valores de r² de 0.985 y 0.987, respectivamente. En general la correlación entre los datos experimentales y la ecuación linealizada fueron aceptables por encontrarse por arriba de 0.95 en el valor de r², el cual es un valor adecuado para experimentos semejantes reportados en la literatura (Thao *et al.*, 2004; Juang y Tsai, 2006).

Los sistemas de ecuaciones diferenciales se evaluaron con base en los valores iniciales incluidos en la siguiente tabla.

Tabla 20. Condiciones iniciales en la solución de los modelos matemáticos.

Variable	Condición inicial
Biomasa bacteriana	0.004 gl ⁻¹
Biomasa fúngica	0.025 gl ⁻¹
Glucosa	4.000 gl ⁻¹
AR27	200.000 mgl ⁻¹
Actividad lacasa	0.000
Tiempo inicial	0.000
Tiempo final	250.000 h

La solución del sistema de ecuaciones diferenciales se presenta de dos maneras, en primer lugar, con las figuras generadas con parámetros obtenidos de la linealización y en segundo lugar con el ajuste manual de los parámetros para que los modelos matemáticos coincidan en mayor medida con los datos experimentales.

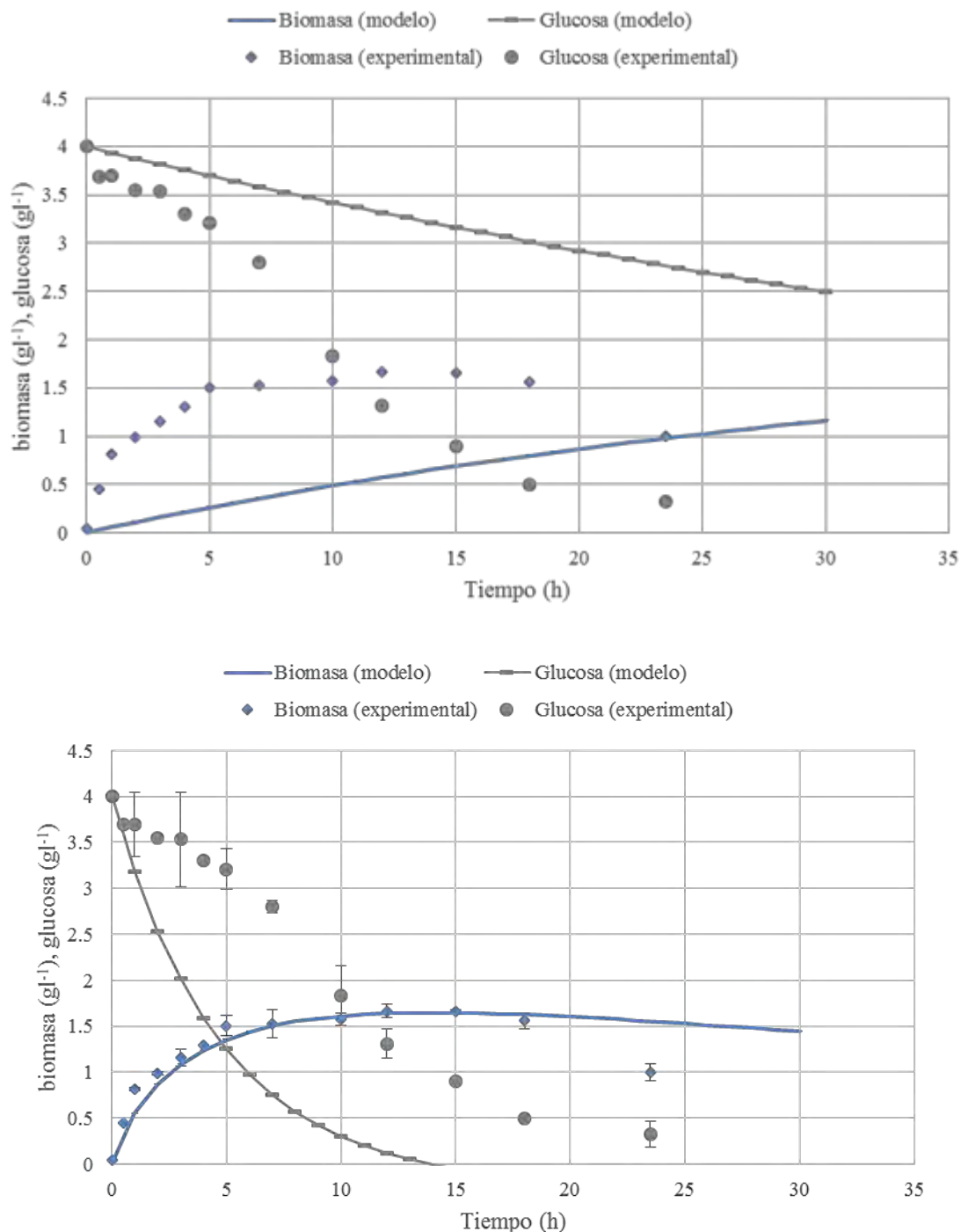


Figura 45. Datos experimentales en comparación con modelos matemáticos para el sistema de *Pseudomonas putida* sin AR27, con parámetros: a) obtenidos por métodos algebraicos de linealización y b) ajustados en la solución del modelo. MATLAB.

Los parámetros obtenidos por linealización, alimentados en el modelo matemático, generan líneas que no coinciden con los datos experimentales. Para mostrar la complejidad del ajuste, se realizaron cambios aleatorios “a mano” de los valores de los parámetros. Se logró hacer coincidir el perfil de crecimiento de biomasa bacteriana pero no el del consumo de sustrato. El problema consistió en evaluar n veces cada parámetro de las ecuaciones diferenciales, y buscar que la diferencia entre los modelos matemáticos y los valores experimentales sea la mínima. Para esta actividad se usó el lenguaje de programación de Python, por ser más sofisticado y versátil (además de ser semejante a la programación en MATLAB) en el cual se construyó un algoritmo que realizó las siguientes tareas:

1.- Ingresar datos experimentales. Python integra valores directamente de hojas de cálculo de Excel guardadas con extensión .CSV que genera valores numéricos delimitados por comas.

2.- Resolver el modelo matemático considerando cualquier valor inicial de los parámetros, los cuales fueron los generados a través de la parametrización algebraica. Se generó una función del método de Runge-Kutta debido al uso frecuente en las subrutinas del algoritmo. En método se modificó de acuerdo al número de ecuaciones diferenciales que se deben resolver en el sistema.

3.- Calcular el error entre modelo y datos a través de la suma de cuadrados. Se generaron dos subrutinas, la primera consistió en buscar los datos del modelo matemático que sean equivalentes al obtenido experimentalmente, esta acción se realizó a través de la interpolación de valores. En segundo lugar, se calcularon las diferencias cuadráticas de los valores que tuvieran concordancia con el mismo tiempo.

4.- Generar un optimizador que vaya cambiando los valores de los parámetros aleatoriamente un número n de veces suficientemente elevado, hasta que encuentre el valor menor de error cuadrático y sea el que se use al final en la solución del modelo.

5.- Graficar los datos experimentales y del modelo. Se generaron los puntos experimentales contra los obtenidos por el modelo así como su comparación. Los errores de cada experimento se indican en cada ciclo de optimización, finalmente la suma de los errores de cada línea representa la correlación global del modelo matemático.

Nuevamente para el modelo matemático referente al crecimiento y consumo de sustrato de *P. putida* sin AR27 los resultados se presentan en las siguientes figuras.

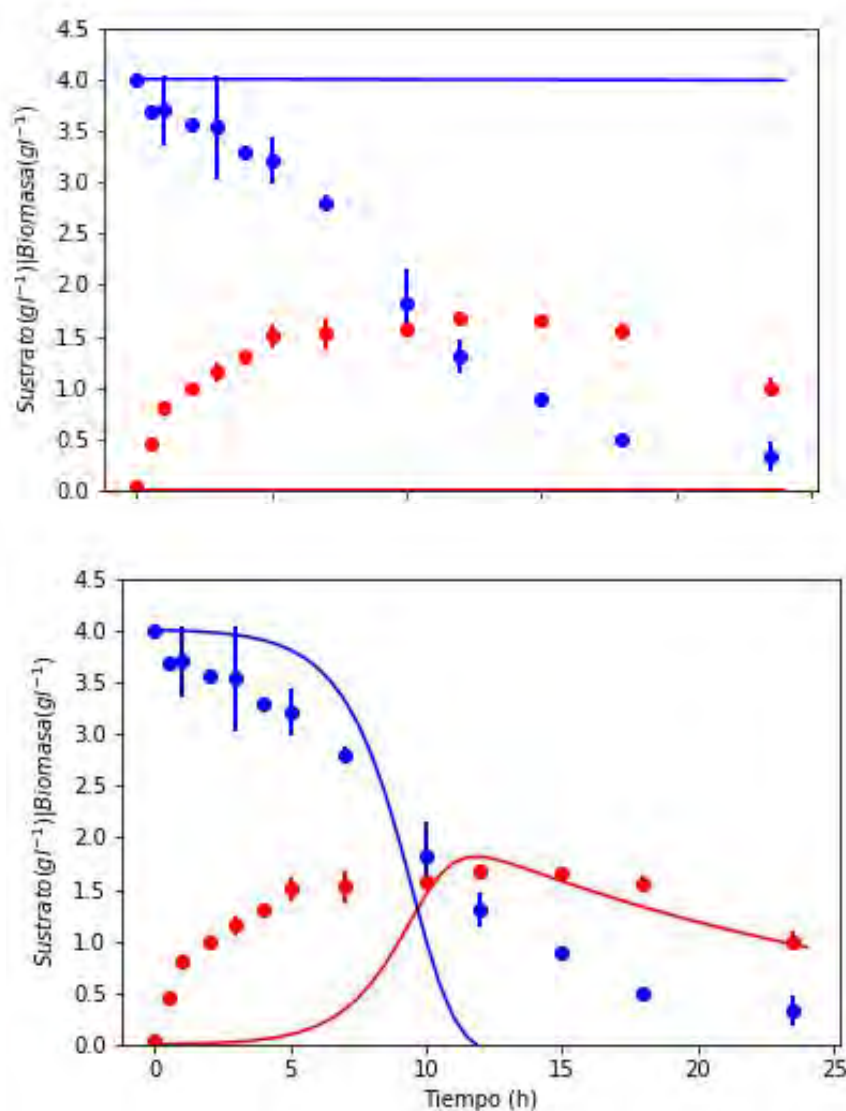


Figura 46. Datos experimentales en comparación con modelos matemáticos para el sistema de *Pseudomonas putida* sin AR27, con parámetros optimizados con Python.

El error global paso de 71.24 a 13.78, recordando que se trata de la diferencia de la suma de cuadrados, es decir se disminuyó 80% el error total.

En valor del error cuadrático en función del número de ciclos de cálculo se presenta en la Figura 45. .

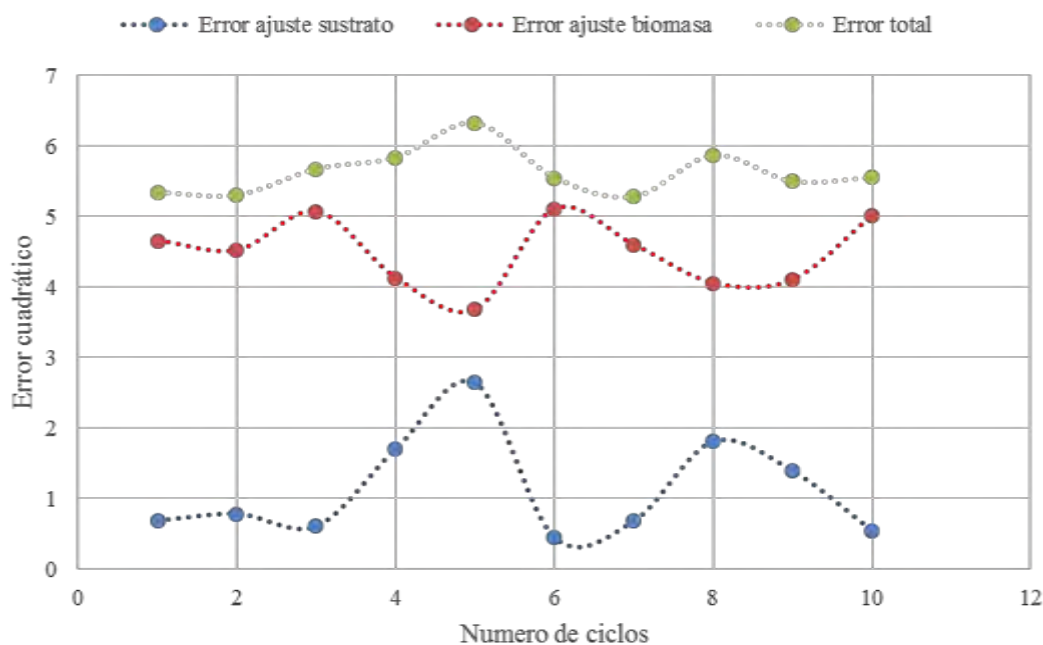


Figura 47. Evolución del error para cada ecuación y para el valor global en el sistema de ecuaciones diferenciales para *Pseudomonas putida* sin AR27.

En la **Figura 45** se muestra un análisis del error total generado por el algoritmo que optimiza los parámetros cinéticos de las ecuaciones modelo. Se puede observar que el error tiene variaciones ascendentes y descendentes, aunque converge hacia un valor promedio, que representa el mínimo error cuadrático en la solución. Una vez que el programa realiza n (los cuales el usuario puede definir) ciclos los cálculos, el programa obtiene los parámetros que generan el menor valor del error total y genera un gráfico.

En la **Figura 45** se puede observar una tendencia en la que a mayor número de ciclos de cálculo es menor el error total.

A mayor número de ecuaciones diferenciales que resolver, es mayor el número de errores que se suman y en consecuencia al sistema le toma más tiempo y recursos resolver el algoritmo.

Tabla 21. Parámetros cinéticos en monocultivos y consorcios de *T. versicolor* y *P. putida*.

Parámetros	μ_{\max}	K_s	r^2	y_x	m	y_p	r^2	α	β	r^2	V_{\max}	K_{ME}	r^2
<i>P. putida</i> sin AR27	0.014 ^{ab}	3.776 ^a	0.991	0.250 ^b	0.117 ^a	NA	0.985	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>P. putida</i> con AR27	0.003 ^b	3.836 ^a	0.954	0.410 ^b	0.081 ^a	NA	0.987	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>T. versicolor</i> sin AR27	0.005 ^b	3.831 ^a	0.974	0.225 ^b	0.083 ^a	182.186 ^b	0.949	664.292 ^c	8.544 ^a	0.976			
<i>T. versicolor</i> con AR27	0.002 ^b	3.937 ^a	0.991	0.883 ^a	0.030 ^a	872.530 ^b	0.998	106.649 ^d	0.731 ^a	0.908	0.070 ^a	1.589 ^a	0.858
Consortio sin AR27	0.012 ^{ab}	5.105 ^a	0.967	0.862 ^a	0.022 ^a	5761.453 ^a	0.993	1466.771 ^a	30.772 ^a	0.943			
Consortio con AR27	0.049 ^a	3.879 ^a	0.979	0.349 ^b	0.033 ^a	202.679 ^b	0.997	981.268 ^b	0.756 ^a	0.949	0.032 ^a	1.003 ^a	0.907

Tabla 22. Parámetros cinéticos en monocultivos de *P. putida*.

Parámetros	μ_{\max}	K_s	y_x	m	Error	Error total
					total-ajuste	Sin ajuste
<i>P. putida</i> sin AR27	1.0719	2.7958	1.8477	0.0873	13.5868	71.2473
<i>P. putida</i> con AR27	0.3620	3.6831	0.5454	0.9273	7.2003	10.2420.

Al alimentar los parámetros iniciales (experimentales) al algoritmo se garantiza que la solución este alrededor de esos datos. En otras palabras, el algoritmo es preciso y la exactitud está definida por los datos experimentales.

Para el resto de los experimentos: Cultivos de

Es importante resaltar que el AR27 implicó limitaciones para el crecimiento bacteriano, porque no es un sustrato que haya consumido, además de que parece afectar el consumo de glucosa (por lo tanto el crecimiento) como principal fuente de carbono. Al respecto se ha reportado que *P. putida* puede degradar compuestos aromáticos en forma preferencial por encima de carbohidratos y ácidos grasos (Basu *et al.* 2006), sin embargo, dichos sustratos están restringidos a la afinidad que tengan con el centro activo de las enzimas que la bacteria utiliza para su degradación (Abuhamed *et al.*, 2004). En este sentido se puede concluir que bajo las condiciones estudiadas la presencia del AR27 representa una condición negativa para las bacterias, aunado a que el medio de cultivo tanto en su composición como en el valor del pH no fueron las óptimas. El reporte de Kalyani *et al.*, (2007) demostró que para *P. putida* existe la posibilidad de degradar compuestos azoicos tales como el rojo BLI, solo bajo condiciones anaeróbicas o en presencia de otros microorganismos. Se ha reportado que el consorcio de *A. ochraceus* NCIM-1146 con *Pseudomonas sp.* SUK1 fue capaz de degradar el colorante Rubine GFL de un efluente textil en un sistema aeróbico (Lade *et al.*, 2012). En el trabajo de Thao *et al.*, (2013) se reportó la degradación de naranja de metilo en condiciones estáticas y de agitación con células suspendidas e inmovilizadas. La tendencia de gradación fue semejante bajo condiciones estáticas y anaeróbicas, aunque no hubo remoción bajo condiciones aeróbicas. Las condiciones óptimas de decoloración fueron: pH de 7 y temperaturas de 33-35 °C para biodegradación suspendida anoxica. Las cinéticas de degradación fueron una V_{max} de 0.75 $mgg^{-1}l^{-1}$ y una K_m de 283 gl^{-1} , no fueron evaluadas las cinéticas de crecimiento microbiano. En cambio, Lv *et al.*, (2015) reportaron la degradación de éteres de difenilo polibromados, compuestos recalcitrantes presentes en efluentes textiles, en las que se estudió el crecimiento microbiano empleando el modelo de Monod. Los parámetros obtenidos fueron μ_{max} y K_s para los cuales se reportaron rangos de 15.74 a 31.69 $mg l^{-1}$ y 0.0843 y 0.1311 $días^{-1}$. Estos valores representan la velocidad y afinidad con los diferentes sustratos, en

general fueron buenos sustratos y en consecuencia fueron degradados. Los parámetros obtenidos para los cultivos microbianos están dentro de los rangos reportados en literatura. Se ha reportado un valor de velocidad máxima de crecimiento bacteriano igual a 0.20 h^{-1} con una K_s de 4.86 mg l^{-1} para *P. putida* cuando consume glucosa como única fuente de carbono (Oliveira *et al.*, 2009). Otro estudio la biodegradación de benceno, tolueno y fenol a través de cinéticas de crecimiento de *P. putida* F1 usando el modelo de Andrews. Las velocidades máximas específicas para benceno, tolueno y fenol fueron de 0.335-0.73, 0.42-0.86 y $0.051\text{-}0.569 \text{ h}^{-1}$, respectivamente, y los valores de K_s para benceno, tolueno y fenol, fueron de 0.12 a 3.36, 3.98-13.8 y 5.27-32 mg l^{-1} , respectivamente (Abuhamed *et al.*, 2004). Las velocidades de crecimiento reportadas en el presente trabajo fueron bajas en comparación con los datos en literatura, quizá porque el medio de cultivo está diseñado para hongos y no para bacterias. Las velocidades de crecimiento bacteriano no fueron calculadas en los consorcios porque la biomasa está mezclada con la del hongo.

El ajuste de los parámetros fue realizado y los errores totales obtenidos antes y después de la optimización se reportan en la **Tabla 21**.

Tabla 23. Parámetros cinéticos en monocultivos y consorcios de *T. versicolor*.

Parámetros	μ_{\max}	K_s	y_x	m	y_p	α	β	V_{\max}	K_{ME}	Error total-ajuste	Error total Sin ajuste
<i>T. versicolor</i> sin AR27	0.0001	0.2232	0.1000	0.5469	0.0246	0.4251	0.0440	NA	NA	3.5688	2.2031×10^9
<i>T. versicolor</i> con AR27	0.2	2.937	0.883	0.30	0.930	20.649	0.131	0.0070	10.589	84.48446	8.8302×10^1
Consorcio sin AR27	0.01	0.105	0.862	0.22	0.553	20.771	0.112	NA	NA	14.39218	8.7855×10^3
Consorcio con AR27	0.0220	0.2100	0.1250	0.2000	0.0986	0.2900	0.3440	0.1300	0.5200	20.83320	4.1467×10^{16}

En general los resultados muestran una tendencia a la disminución del error una vez que se ejecuta la optimización (**Tabla 22**). Por cada optimización el algoritmo realiza aproximadamente 10, 000, 000 cálculos. No hay que perder en mente que los datos iniciales son generados mejorados progresivos en el ajuste del modelo. Es decir, los valores de los

parámetros obtenidos en n ciclos de cálculo pueden utilizarse m veces hasta obtener un sistema cada vez más óptimo. Aquí se presentan los ajustes que realizan 100 ciclos por 3 subalimentaciones al programa de alimentación. El sistema puede mejorarse aún más. Los parámetros, aunque son diferentes a los que se generaron a partir de la linealización algebraica, concuerdan con la siguiente descripción de los sistemas. Un proceso de optimización semejante para la producción de lacasas y el diseño utilizando *T. versicolor* fue reportado por Tavares *et al.*, (2006).

En el caso de los cultivos fúngicos la presencia del AR27 no afectó significativamente ($p>0.05$) la μ_{\max} de los monocultivos y de los consorcios, sin embargo, el cultivo del consorcio con AR27 presentó la mayor ($p<0.05$) μ_{\max} en comparación con los monocultivos de la bacteria y el hongo con y sin AR27. La constante de saturación K_s para ninguno de los experimentos tuvo diferencia significativa ($p>0.05$) (**Tabla 20**). El rendimiento de Y_x fue mayor ($p<0.05$) para los cultivos de *T. versicolor* con AR27 (0.883 gl^{-1}) y menor ($p<0.05$) para *P. putida* sin AR27 (0.250 gl^{-1}). No hubo diferencia ($p>0.05$) en los rendimientos m para ninguno de los experimentos. El mayor ($p<0.05$) rendimiento Y_p (5761.4) se obtuvo con el consorcio sin AR27 en comparación con *T. versicolor* y el consorcio con AR27 y *T. versicolor* con AR27. Los valores de α para la producción de actividad lacasa asociada al crecimiento fueron diferentes significativamente ($p<0.05$) en los experimentos de monocultivos y consorcios con y sin AR27, siendo el consorcio sin AR27 con el que se obtuvo el mayor ($p<0.05$) valor (1466.771). Los valores de β para la producción de actividad lacasa no asociada al crecimiento no mostraron diferencia significativa ($p>0.05$) en ninguno de los experimentos evaluados. Finalmente se presentan en la **Tabla 21** las evidencias de que los valores de V_{\max} y K_M propios de la decoloración de AR27 no son diferentes ($p>0.05$) significativamente.

Los parámetros cinéticos de crecimiento, rendimientos, producción de actividad lacasa y decoloración, describieron el comportamiento del consorcio con mayor detalle. La μ_{\max} y Y_x del consorcio con AR27 fueron los mayores, sugiriendo que los microorganismos crecen en condiciones favorables cuando hay compuestos derivados de la decoloración, permitiendo el crecimiento de bacterias y de hongos con restricciones menores a las encontradas con los monocultivos. De esta manera el *T. versicolor* evita el contacto con

compuestos tóxicos derivados de la decoloración, mientras que *P. putida* los consume sin tener una supresión de su crecimiento debido a la presencia del AR27, porque este último se va descomponiendo paulatinamente. Nótese que el consorcio sin AR27 tiene menor μ_{\max} y Y_x , pero Y_p mayor que la del consorcio con AR27, es posible que la menor actividad lacasa detectada sea resultado de que las enzimas están participando en la decoloración del AR27 o de la transformación de otros compuestos procedentes del crecimiento en consorcio, y por lo mismo no son detectadas por el método espectrofotométrico utilizado. En general todos los parámetros obtenidos pueden emplearse en un esquema de modelación matemática.

Los parámetros estimados mediante las ecuaciones cinéticas permitieron una amplia descripción de los fenómenos relacionados con el crecimiento del consorcio de *T. versicolor* y *P. putida*, así como la producción de actividad lacasa. En general la velocidad máxima de crecimiento del hongo y de la bacteria disminuyó en presencia del colorante AR27. Considerando que el consorcio con AR27 tiene una velocidad máxima de crecimiento semejante a la de los monocultivos con y sin AR27, se puede decir que el colorante AR27 afectó principalmente el crecimiento de la bacteria y no el del hongo. Lo anterior se confirma en los monocultivos de *P. putida* a pH de 4.5, en donde la presencia del colorante AR27, disminuye 2.56 veces la velocidad máxima de crecimiento de la bacteria. Otro efecto de la presencia del colorante en los cultivos estudiados fue la disminución de la constante K_s , la cual tuvo menor valor en el consorcio con AR27. Debido a que la biomasa cuantificada en el experimento del consorcio con AR27 es una mezcla de masa bacteriana y fúngica, es probable que la afinidad se haya visto afectada en *P. putida* con glucosa.

Las velocidades de crecimiento del hongo en los monocultivos y en los consorcios fueron bajas, en comparación con los reportados para *T. versicolor* con sacarosa como fuente de carbono (Tišma *et al.*, 2010). Los parámetros cinéticos estimados fueron: $\mu_{\max\text{glucosa}} = 0.14\text{h}^{-1}$, $K_{s\text{ glucosa}} = 8.06\text{ g dm}^{-3}$, $\mu_{\max\text{fructosa}} = 0.37\text{ h}^{-1}$ y $K_{s\text{ fructosa}} = 5408\text{ g dm}^{-3}$. En cambio, las velocidades de crecimiento calculadas en el presente estudio, fueron semejantes a las que reportaron (Thiruchelvam y Ramsay, 2007) en sus estudios sobre el crecimiento de *Trametes versicolor* ATCC 20869 en glucosa, para la producción de lacasas a través de un

reactor agitado con barra magnetica. En la producción de 1385 UI⁻¹ de actividad lacasa, hubo una velocidad máxima específica de 0.039h⁻¹.

La producción de la actividad lacasa se encontró asociada al crecimiento. Los parámetros α y β de los consorcios con y sin AR27, dan evidencia de lo anterior, cabe mencionar que la biomasa cuantificada de los consorcios contiene bacterias de *P. putida* mismas que se incluyen al momento de determinar biomasa seca total, por lo que de cierto modo las bacterias contribuyen a que la producción de lacasas este asociada al crecimiento del *T. versicolor*. Caso contrario con lo que reportó (Saat *et al.*, 2013) quienes a través del modelo de Luedeking-Piret obtuvieron valores de α y β negativos, que indicaron que la producción de la enzimas podría ser no asociada al crecimiento, al evaluarse en dos tipos de matraces con y sin deflectores. Los valores de α y β para una agitación de 170 rpm a 25°C fueron -9.133 Ug⁻¹ y 12.817 Ug⁻¹dias⁻¹ con deflectores y -9.235 Ug⁻¹ y 9.690 Ug⁻¹dias⁻¹ sin deflectores.

Finalmente, el modelo basado en las ecuaciones de Michaelis-Menten fue desarrollado para simular la decoloración de los colorantes Reactivo Negro 5 (RB5), Reactivo Azul 114 (RB114), Reactivo Amarillo 15 (RY15), Reactivo Rojo 239 (RR239) y Reactivo Rojo 180 (RR180) mediante lacasas comerciales (Cristóvão *et al.*, 2009). Los valores para V_{max} fueron de 3.46 a 20 mgg⁻¹min⁻¹ mientras que para K_M fueron de 3.13 hasta 650 mgl⁻¹. Estos valores son elevados en comparación con los reportados en el presente trabajo, porque Cristóvão *et al.*, (2009) evalúan una concentración fija de lacasas, mientras que en el presente estudio, esa concentración varia debido a que se están produciendo al mismo tiempo en que están decolorando. En general, el conjunto de parámetros obtenidos en el presente estudio se pueden utilizar para optimizar su valor, generan certidumbre en la descripción del sistema *T. versicolor/ P. putida* e proporcionan información relevante para el diseño del sistema que podría incluirlos en el tratamiento de aguas residuales.

Capítulo 5

Conclusiones

Derivado de los dos objetivos del presente estudio y con base en los resultados se ha llegado a las siguientes conclusiones particulares:

5.1. Del objetivo particular 1:

- *Pseudomonas putida* tuvo limitado crecimiento en el medio de cultivo evaluado debido a condiciones abióticas como el pH y a la presencia del colorante AR27, esto sugiere que el colorante no pudo ser usado como fuente de carbono por la bacteria.
- La presencia de *Pseudomonas putida* en el consorcio favorece el crecimiento de *Trametes versicolor* y la producción de actividad lacasa. La máxima actividad lacasa encontrada en este estudio está dentro de los valores reportador para la producción de actividad lacasa con hongos inducidos con compuestos químicos.
- La presencia del *Trametes versicolor* favorece el desarrollo de *Pseudomonas putida* bajo las condiciones de cultivo estudiadas, las cuales son favorables para el hongo pero no para las bacterias. Las bacterias en crecimiento con el consorcio pueden abatir las desventajas impuestas por las características del medio de cultivo debido a la presencia del micelio de *Trametes versicolor* en cual parece proveerle de un soporte sobre el cual pueden crecer.
- La actividad lacasa producida por el consorcio es suficiente para disminuir la concentración de AR27 de 0.2 a un valor de 0.001 gl^{-1} en máximo tres días de cultivo.
- La degradación de AR27 genera compuestos aromáticos diferentes a benceno, anilina, ácido benzoico, catecol y naftaleno.

5.2. Del objetivo particular 2:

- Se propuso un modelo matemático estructurado determinista con las ecuaciones de Monod, Luedekin-Piret y Michaelis-Menten que describen el crecimiento, consumo de sustrato, generación de actividad lacasa y decoloración del AR27 del consorcio *T. versicolor* y *P. putida*.

- Los parámetros cinéticos del modelo matemático, obtenidos mediante el método algebraico, fueron de utilidad para la descripción del modelo teórico propuesto.
 - La optimización de los parámetros cinéticos a través del algoritmo propuesto en lenguaje Python redujo el error de correlación entre datos experimentales y datos del modelo.
 - Los parámetros obtenidos del modelo matemático son una buena base de información que puede ser utilizada en el diseño de un sistema que replique el consorcio aquí estudiado.
- Este es el primer estudio cinético reportado en la literatura sobre el consorcio conformado por *Pseudomonas putida* y *Trametes versicolor* en la decoloración de AR27.

5.3. Recomendaciones

El seguimiento a este estudio requiere de precisiones para evitar controversia en la experimentación.

1. El consorcio crece y se mantiene tanto en cultivos líquidos como en cultivos sólidos, la siguiente etapa de estudio podría referirse a diseñar la configuración mediante la cual se pueda utilizar la mezcla de microorganismos sin la necesidad de emplear los medios de cultivo en donde crecen. Los estudios sobre encapsulación de microorganismos en alginato de sodio son una buena opción.
2. El consorcio demostró un aumento sustancial en la producción de la actividad lacasa, sería conveniente identificar si el aumento en la actividad lacasa se deba al aumento en la cantidad de las lacasas o a la producción de isoformas de lacasas.
3. La interacción entre *Pseudomonas putida* y *Trametes versicolor* genera condiciones para que *Pseudomonas putida* produzcan sustancias que estimulan la producción de actividad lacasa por *Trametes versicolor*, en este sentido sería adecuado analizar qué tipo de sustancias son las que están provocando este estímulo en el hongo.

Capítulo 6

Referencias y Anexos

6.1. Referencias

7. Abuhamed, T., Bayraktar, E., Mehmetoglu, T. & Mehmetoglu, U. (2004). Kinetics model for growth of *Pseudomonas putida* F1 during benzene, toluene and phenol biodegradation. *Process Biochemistry*. 39: 983-988.
8. Afreen, S., Anwer, R., Singh, R.K. & Fatma, T. (2016). Extracellular laccase production and its optimization from *Arthrospira maxima* catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Saudi Journal of Biological Sciences*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.01.015>.
9. Alcalde, M. (2015). Engineering the ligninolytic enzyme consortium. *Trends in Biotechnology*. 33(3): 155-162.
10. Almeida, E.J. & Corso, C. R. (2014). Comparative study of toxicity of azo dye Procion Red MX-5B following biosorption and biodegradation treatments with the fungi *Aspergillus niger* and *Aspergillus terreus*. *Chemosphere*. 112: 317-322.
11. Aloy, O. (2004). Olga Aloy. Barcelona. http://olgaaloy.com/pag_cast/olgaaloy.htm. http://olgaaloy.com/pag_cast/urushi.htm.
12. Aravind, P., Selvaraj, H., Ferro, S. & Sundaram, M. (2016). An integrated (electro- and bio-oxidation) for remediation of industrial wastewater containing azo-dyes: understanding the degradation mechanism and toxicity assessment. *Journal of Hazardous Materials*. 318: 203-205.
13. Arslan-Alaton, I. & Alaton, I. (2006). Degradation of xenobiotics originating from the textile preparation, dyeing, and finishing industry using ozonation and advanced oxidation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 68: 98-107.
14. Asgher, M., Bhatti, H.N., Ashraf, M. & Legge, R.L. (2008). Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation*. (19): 771-783.
15. Aspland, J.R. (1998). Colorante: dyes. University of Clemson. Clemson, SC, USA. 313-334.
16. Ayed, L., Khelifi, E., Ben, J. H., Miladi, H., Cheref, A., Achour, S. y col. (2010). Response surface methodology for decolorization of azo Methyl Orange by bacterial consortium: Produced enzymes and metabolites characterization. *Chemical Engineering Journal*. 165: 200-208.
17. Bajaj, M., Gallert, C. & Winter, J. (2008). Biodegradation of high phenol containing synthetic wastewater by an aerobic fixed bed reactor. *Bioresource Technology*. 99: 8376-8381.

18. Baldrian, P. (2004). Increase of laccase activity during interspecific interaction of white-rot fungi. *FEMS Microbiology Ecology*. 50: 245-253.
19. Baldrian, P. (2005). Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*. 30: 215-242.
20. Barsing, P., Tiwari, A., Joshi, T. & Garg, S. (2011). Application of a novel bacterial consortium for mineralization of sulphonated aromatic amines. *Bioresource Technology*. 102: 765-771.
21. Basu, A., Apte, S. & Phale, P. (2006). Preferential Utilization of Aromatic over Glucose by *Pseudomonas putida* CSV86. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(3): 2226-2230.
22. Bayramoglu, M., Kobya, M., Can, O.T. & Sozbir, M. (2004). Operating cost of electrocoagulation of textile dye wastewater. *Separation and Purification Technology*. 37: 117-125.
23. Baran, R., Brodie, E.L., Mayberry-lewis, J., Hummel, E., Nunes Da Rocha, U., Chakraborty, R., Bowen, B. P., Karaoz, U., Cadillo-quiros, H., Garcia-pichel, F., & Northen, T.R. (2015). Exometabolite Niche Partitioning Among Sympatric Soil Bacteria. *Nat. Commun.* 6: 1–9. DOI: [dx.doi.org/10.1038/ncomms9289](https://doi.org/10.1038/ncomms9289).
24. Behnajady, M.A., Modirshahla, N., Daneshvar, N., & Rabbani, M. (2007). Photocatalytic degradation of C.I. Acid Red 27 by immobilized ZnO on glass plates in continuous-mode. *Journal of Hazardous Materials*. 257-263.
25. Bergsten-Torralba, L.R., Nishikawa, M.M., Baptista, D.F., Magalhães, D.P., da Silva, M. (2009). Decolorization of different textile dyes by *Penicillium simplicissimum* and toxicity evaluation after fungal treatment. *Brazilian Journal of Microbiology*. 40: 808-817.
26. Bertrand, B., Martínez-Morales, F., Tinoco-Valencia, R., Rojas, S., Acosta-Urdapilleta, L. & Trejo-Hernández, M.R. (2015). Biochemical and molecular characterization of laccase isoforms produced by the white-rot fungus *Trametes versicolor* under submerged culture conditions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 122: 339-347.
27. Bidhendi, G.R., Torabian, A., Ehsani, H. & Razmkhah, N. (2006). Evaluation of industrial dyeing wastewater treatment with coagulants and polyelectrolyte as a coagulant aid. *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering*. 4(1): 29-36.
28. Blánquez, P., Casas, N., Font, X., Gabarrell, X., Sarrá, M., & Caminal, G. (2004). Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*. *Water Research*. 38: 2166-2172.

29. Bourbonnais, R., & Paice, M. (1990). Oxidation of non-phenolic substrates. *FEMS*. 267: 99-102
30. Bourbonnais, R., Paice, M.G., Freiermuth, B., Bodie, E. & Borneman, S. (1997). Reactivities of Various Mediators and Laccases with Kraft Pulp and Lignin Model Compounds. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(12): 4627-4632.
31. Boyter, H.A. (2007). Environmental legislation USA. In I. o. Textile, *In Environmental aspects of textile dyeing edited by*. USA: Christie R.M. 30-43.
32. Brian, I. (2012). Mathematical Modelling in Systems Biology: An Introduction. *Applied Mathematics*. University of Waterloo. 1-396.
33. Bumpus, J. (2004). Biodegradation of Azo Dyes by Fungi. In: Fungal Biotechnology in Agricultural Food and Environmental Applications. Arora, D.K. (Ed.). Marcel Dekker Inc., New York, USA. 457-469.
34. Cañas, A.I. & Camarero, S. (2010). Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnology Advances*. 28: 694-705.
35. Casas N., Blánquez P., Vicent T. & Sarrá M. (2013) Mathematical Model for dye decoloration and laccase production by *Trametes versicolor* in fluidized bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*. 80: 45-52.
36. Carabajal, M., Levin, L., Albertó, E. & Lechner, B. (2012). Effect of co-cultivation of two *Pleurotus* species on lignocellulolytic enzyme production and mushroom fructification. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 66: 71-76.
37. Castanera, R., Pérez, G., Omarini, A., Alfaro, M., Pisabarro, A.G., & Faraco, V. (2012). Transcriptional and enzymatic profiling of *Pleurotus ostreatus* laccase gene in submerged and solid-state fermentation cultures. *Applied and Environmental Microbiology*. 78(11): 4037-4045.
38. Castaño, J.D., Cruz, C. & Torres, E. (2015). Optimization of the production, purification and characterization of a laccase from the native fungus *Xylaria sp.* *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 4: 710-716.
39. Cattoor, T. (2007). European legislation relating to textile dyeing. In T. Institute, *In Environmental aspects of textile dyeing*. Centexbel Belgium: Christie R. M. 1-29.
40. Chan, G.F., Rashid, N.A., Chua, L.S., Abllah, N., Nasiri, R. & Ikubar, M.R. (2012). Communal microaerophilic-aerobic biodegradation of amaranth by novel NAR-2 bacterial consortium. *Bioresource Technology*. 105: 48-59.
41. Chapra, C.S. & Canale R.P. (2011). Métodos numéricos para ingenieros. McGrawHill/Interamericana. Editores S.A. de C.V. México, D.F. ISBN 978-607-15-0499-9.

42. Chen, B.Y., Chen, S.Y., Lin, M.Y. & Chang, J.S. (2006). Exploring bioaugmentation strategies for azo-dye decolorization using mixed consortium of *Pseudomonas luteola* and *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*. 1574-1581.
43. Cheng, Z., Sun, P., Jiang, Y., Zhang, L., & Chen, J. (2012). Kinetic analysis and bacterium metabolization of a-pirene by novel identified *Pseudomonas sp.* strain. *Journal of Environmental Science*. 24(10): 1806-1815.
44. Chung, K.T. & Cerniglia, C. (1992). Mutagenicity of azo dyes: Structure-activity relationships. *Mutation Research*. 227: 201-220.
45. Chung, T., Tseng, H. & Juang, R. (2003). Mass transfer affect and intermediate detection for phenol degradation in immobilized *Pseudomonas putida* system. *Process Biochemistry Journal*. 38: 1497-1507.
46. Couto, S.R. & Sanromán, M.Á. (2007). The effect of violuric acid on the decolourization of recalcitrant dyes by laccase from *Trametes hirsuta*. *Dyes and Pigments*. 74.
47. Cristopher, L.P., Yao, B.Y. & Ji, Y. (2014). Lignin biodegradation with laccase-mediator system. *Frontiers in Energy Research*. 2. DOI: 10.3389/fenrg.2014.00012.
48. Cristóvão, R.O., Tavares, A.P., Ribeiro, A.S., Loureiro, J.M., Boaventura, R.A., & Macedo, E.A. (2008). Kinetic modelling and simulation of laccase catalyzed degradation of reactive textile dyes. *Bioresource Technology*. 99: 4768-4774.
49. Cristóvão, R., Tavares, A., Ferreira, L., Loureiro, J., Boaventura, R. & Macedo, E. (2009). Modeling the discoloration of mixture of reactive textile dyes commercial laccase. *Bioresource Technology*. 1094-1099.
50. Crowe, J.D., & Olsson, S. (2001). Induction of lacasse activity in *Rhizoctonia solani* by Antagonistic *Pseudomonas fluorescens* Strains and a Range of Chemical Treatments. *American Society for Microbiology*. 67(5): 2088-2094.
51. Cui, D., Li, G., Zhao, D., Gu, X., Wang, C. & Zhao, M. (2012). Microbial community structures in mixed bacterial consortia for azo dye treatment under aerobic and anaerobic conditions. *Journal of hazardous Materials*. 185-192.
52. Daâssi, D., Belbahri, L., Vallat, A., Woodward, S., Nasri, M. & Mechichi, T. (2014). Enhanced reduction of phenol content and toxicity in olive mill wastewater by newly isolated strain of *Corioloopsis gallica*. *Environmental Science and Pollution Research*. 21: 1746-1758.
53. Daneshvar, N., Ayazloo, M., Khataee, A.R. & Pourhassan, M. (2007). Biological decolorization of dye solution containing Malachite Green by microalgae *Cosmarium sp.* *Bioresource Technology*. 98: 1176-1182.

54. Da Silva, M.C., da Luz, J.M., de Assunção L.S., Oliveira, P.V., Venetti, M.C., Bazzolli, D.M. & Kasuya, M.C. (2012). Enrichment of *Pleurotus ostreatus* mushrooms with selenium in coffee husks. *Food Chemistry*. 131: 558-563.
55. Delgadillo-López, A.E., González-Ramírez, C.A., Prieto-García, F., Villagómez-Ibarra, J.R. & Acevedo-Saldoval, O. (2011). Phytoremediation: an alternative to eliminate pollution. *Tropical and Subtropical*. 14: 597-612.
56. Diamantidis, G., Effosse, A., Potier, P. y Bally, R. (2000). Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium *Azospirillum lipoferum*. *Soil Biology and Biochemistry*. 32: 919-927.
57. Ding, M.Z., Song, H., Wang, E.X., Liu, Y. & Yuan, YJ. (2016). Design and construction of syntetic microbial consortia in China. *Syntetic and System Biotechnology*.
58. Dong, Y.C., Wang, W., Hu, Z.C., Fu, M.L. & Chen, Q.H. (2012). The synergistic effect on production of lignin-modifying enzymes through sumerged co-cultivation of *Phlebia radiata*, *Dichomitus squalens* and *Ceriporiopsis subvermispora* using agricultural residues. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. (35): 751-760.
59. Drumond, F.M., Junqueira, D. & Palma de Oleivera, D. (2011). Azo Dyes and Their Metabolites: Does the Discharge of the Azo Dye into Water Bodies Represent Human and Ecological Risk?. *Advances in Treating textile Effluent*. 27-48.
60. Dwivedi, U.N., Singh, P., Pandey, V. P. & Kumar, A. (2011). Structire-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 117-128.
61. Du, R., Yan, J., Li, S., Zhang, L., Zhang, S., Li, J., Zhao, G. & Qi, P. (2015). Cellulosic ethanol production by natural bacterial consortia in enhanced by *Pseudoxanthomonas taiwanensis*. *Biotechnology for Biofuels*. 8-10. DOI 10.1186/s13068-014-0186-7.
62. Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugar and Related Substances. *Analytical Chemistry*. 28: 350-356.
63. Elgendy, E.M., & Al-Zahram, N.A. (2015). Comparative study of natural and synthetic food additive dye "amaranth" through photochemical reactions. *International Journal os Science and Research*. 4(1): 827-832.
64. Elisashvili, V., Kachlishvili, E., Khardziani, T. & Agathos, S.N. (2010). Effect of aromatic compounds on the production of laccase and manganese peroxidase by white-rot basidiomycetes. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 37: 1091-1096.

65. El-Sheekh, M.M., Gharieb, M.M. & Abou-El-Souod, G. (2009). Biodegradation of dyes by some green algae and cyanobacteria. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 63: 699-704.
66. Farré, M. & Barceló, D. (2003). Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. *Trend in Analytical Chemistry*. 22(5): 299-310.
67. Fernández, M.C. (2012). Manual básico de MatLab. Servicios Informáticos U.C.M.
68. Fogler, H.S. (2008). Elementos de ingeniería de las reacciones químicas. Pearson Educación de México, S.A. de C.V. Cuarta Edición. México, D.F.
69. Font, X., Caminal, G., Gabarrel, X. & Vicent, T. (2006). Treatment of toxic industrial wastewater in fluidized and fixed-bed batch reactors with *Trametes versicolor*: influence of immobilisation. *Environmental Technology*. 845-854.
70. Forgacs, E., Cserháti, T. & Oras, G. (2004). Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. *Environmental International*. 30: 953-971.
71. Frasconi, M., Favero, G., Boer, H., Koivula, A. & Mazzei, F. (2010). Kinetic and biochemical properties of high and low redox potential laccases from fungal and plant origin. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1804: 899-908.
72. Fu, Y. & Viraraghavan, T. (2001). Fungal decolorization of dye wastewaters: A review. *Bioresource Technology*. 79: 251-262.
73. Gahlout, M., Gupte, S., & Gupte, A. (2013). Optimization of culture condition for enhanced decolorization and degradation of azo dye reactive violet 1 with concomitant production of ligninolytic enzymes by *Ganoderma cupreum* AG-1. *Biotechnology*. 3: 143-152. DOI: 10.1007/s13205-012-0079-z.
74. Garcés, L.F. & Peñuela, G.A. (2006). Cinética de degradación y mineralización del colorante Naranja Reactivo 84 en aguas. *Revista LASALLISTA de Investigación*. 2(2): 21-25.
75. Garg, S.K., Tripathi, M., Singh, S.K. & Tiwari, J. (2012). Bio decolorization of textile dye effluent by *Pseudomonas putida* SKG-1 (MTCC 10510) under the conditions optimized for monoazo dye orange II color removal in simulated minimal salt medium. *Biodeterioration y Biodegradation*. 74: 24-35.
76. Gavril, M. & Hodson, P.V. (2007). Chemical evidence for mechanism of biodecoloration of Amaranth by *Trametes versicolor*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23: 103-124.
77. Gavril, M., Hodson, P.V. & McLellan, J. (2007). Decoloration of Amaranth by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. Part I. Statistical analysis. *Canadian Journal of Microbiology*. 53: 313-326.

78. Ghosh, S., Chowdhury, R. & Bhattacharya, P. (2016). Mixed consortia in bioprocesses: role of microbial interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*. DOI: 10.1007/s00253-016-7448-1.
79. Gomare, S.S., Tamboli, D.P., Kagalkar, A.N. & Govindwar, S.P. (2009). Eco-friendly biodegradation of reactive textile dye Golden Yellow HER by *Brevibacillus laterosporus* MTCC 2298. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 63: 582-586.
80. Goszczynski, S., Paszczynski, A., Pasti-Grigsby, M.B., Crawford, R.L. & Crawford, D.L. (1994). New Pathway for Degradation of Sulfonated Azo Dyes by Microbial Peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. *Journal of Bacteriology*. 76(5): 1339-1347.
81. Hailei, W., Guangli, Y., Ping, L., Yanchang, G., Jun, L., & Guosheng, L. (2009). Overproduction of *Trametes versicolor* laccase by making glucose starvation using yeast. *Enzyme and Microbial Technology*. 45: 146-149.
82. Harkin, J.M. & Obst, J.R. (1973). Syringaldazine, an effective reagent for detecting laccase and peroxidase in fungi. *Experientia*. 29: 381-387.
83. Herrera-Campos, M. A., Lücking, R., Pérez-Pérez, R. E., Miranda-González, R., Sánchez, N., Barcenas-Peña, A., Carrizosa, A., Zambrano, A., Ryan B. D. & Nash, T. H. (2014). Biodiversidad de líquenes en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. Supl. 85, S82-S99.
84. Hoshida, H., Nakao, M., Kanazawa, H., Kubo, K., Hakukawa, T. & Morimasa, K. (2001). Isolation of five laccase gene sequences from the white-rot fungus *Trametes sanguinea* by PCR, and cloning, characterization and expression of the laccase cDNA in yeasts. *Journal of Bioscience and Engineering*. 92(4): 372-380.
85. Ikehata, K., Buchanan, I.D. & Smith, D.W. (2004). Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. *Journal of Environmental Management Eng Sci*. (3): 1-19.
86. Jadhav, S.U., Jadhav, U.U., Dawkar, V.V. & Govindwar, S.P. (2008). Biodegradation of Disperse Dye Brown 3REL by Microbial Consortium of *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360 and *Bacillus sp.* VUS. *Biotechnology. Bioprocess Engineering*. 13: 232-239.
87. Jaszek, M., Grzywnowicz, K., Malarczyk, E. & Leonowicz, A. (2006). Enhanced extracellular laccase activity as a part of the response system of white rot fungi: *Trametes versicolor* and *Abortiporus biennis* to paraquat-caused oxidative stress condition. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 85: 147-154.

88. Kabra, A.N., Khandare, R.V., & Govindwar, S.P. (2013). Development of a bioreactor for remediation of textile effluent and dye mixture: A plant-bacterial synergistic strategy. *Water research*. 47: 1035-1048.
89. Kadam, A.A., Telke, A.A., Jagtap, S.S. & Govindwar, S.P. (2011) Decolorization of adsorbed textile dyes by developed consortium of *Pseudomonas sp.* SUK1 and *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146 under solid state fermentation. *Journal of Hazardous Materials*. 189: 486-494.
90. Kalyani, D.C., Patil, P.S., Jadhav, J.P. & Govindwar, S.P. (2007) Biodegradation of reactive textile dye Red BLI by an isolated bacterium *Pseudomonas sp.* SUK1. *Bioresourse. Technology*. 99: 4635-4641.
91. Khandare, R.V., Kabra, A.N., Tamboli, D.P. & Govindwar, S.P. (2011). The role of *Aster amellus* Linn. in the degradation of sulfonated azo dye Remazol Red: A phytoremediation strategy. *Chemosphere*. 82: 1147-1154.
92. Khataee, A.R., Dehghan, G., Ebadi, A., Zarei, M. & Pourhassan, M. (2010). Biological treatment of a dye solution by Macroalgae *Chara sp.*: Effect of operational parameters, intermediates identification and artificial neural network modeling. *Bioresource Technology*. 2252-2258.
93. Kirk, T., Croan, S. & Tien, M. (1985) Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. *Enzyme Microbiology Technology*. 8: 27-32.
94. Kuhar, F., Castiglia, V., & Levin, L. (2015). Enhancement of laccase production and malachite green decolorization by co-culturing *Ganoderma Lucidum* and *Trametes versicolor* in solid-state fermentation. *International Biodeterioration and Biodegradation*. (104): 238-243.
95. Kulkarni, A.N., Kadam, A.A., Kachole, M.S. & Govindwar, S.P. (2014). *Lichen perlata*: A novel system for biodegradation and detoxification of disperse dye Solvent Red 24. *Journal of Hazardous Materials*. 276: 461-468.
96. Kumar, A., Kumar, S. & Kumar, S. (2005). Biodegradation kinetics, phenol, and catechol using *Pseudomonas putida* MTC1194. *Biochemistry Engineering*. 22: 151-159.
97. Kunz, S. & Becker, H. (1992). Bibenzyl glycosides from the liverwort *Ricciocarpos natans*. *Phytochemistry*. 31 (11): 3981-3983.
98. Kunz, S. & Becker, H. (1990). Sesquiterpenoids from the liverwort *Ricciocarpos natans*. *Phytochemistry*. 29 (8): 2565-2568.
99. Kurade, M.B., Waghmode, T.R., Kagalkar, A.N. & Govindwar, S.P. (2012). Decoloration of textile industry effluent containing disperse dye Scarlet RR by a newly developed bacterial-yeast consortium BL-GG. *Chemical Engineering Journal*. 184: 33-41.

100. Lade, H.S., Waghmode, T.R., Kadam, A.A. & Govindwar, S.P. (2012). Enhanced biodegradation and detoxification of disperse azo dye Rubine GFL and textile industry by defined fungal-bacterial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 72: 94-107.
101. Lezama, J.L. & Graizbord, B. (2010). Medio ambiente, los grandes problemas de México. El colegio de México. México, D.F. 429.
102. Liu, J., Cai, Y., Lioa, X., Huang, Q., Hao, Z. & Hu, M. (2013). Efficiency of laccase production in 65-L air-lift reactor for potential green industrial and environmental application. *Journal of Cleaner Production*. (39): 154-160.
103. Liu, Y., Ma, S., Wang, X., Xu, W., & Tang, J. (2014). *Cryptococcus albidus* encephalitis in newly diagnosed HIV-patient and literature review. *Medical Mycology Case Reports* 3: 8-10.
104. Lomascolo, A., Uzan-Boukhris, E., Herpoel-Gimbert, I., Sigoillot, J.-C. & Lesage-Meessen, L. (2011). Peculiarities of *Pycnoporus* species for applications in biotechnology. *Applied Microbiological Biotechnol.* 92: 1129-1149.
105. Lorenzo, M., Moldes, D., Couto, S.R. & Sanromán, A. (2002). Improving laccase production by employing different lignocellulosic waste in submerged cultures of *Trametes versicolor*. *Bioresource Technology*. 82: 109-113.
106. Lu, Z., Sun, X., Yang, Q., Li, H. & Li, C. (2009). Persistence and functions of a decolorizing fungal consortium in a non-sterile biofilm reactor. *Biochemical Engineering Journal*. 46: 73-78.
107. Luedeking, R. & Piret, E.L. (1959). A kinetic study of the lactic acid fermentation batch process at controlled pH. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*. 1: 393-412.
108. Lv, Y., Li, L., Chen, Y., tang, Z., & Hu, Y. (2016). Effects of glucose and biphenyl on aerobic cometabolism of polybrominated diphenyl ethers by *Pseudomonas putida*: Kinetics and degradation mechanism. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 108: 76-84.
109. Lyshenko, A.V., Zhukhlistova, N.E., Gabdoulkhakov, A.G., Zhukova, Y.N., Voelter, W., Zaitsev, V.N. & Mikhailov, A.M. (2006). Purification, crystallization and preliminary X-ray study of the fungal laccase from *Cerrena máxima*. *Acta Crystallographica Section F, Structure Biology and Crystallization Communications*. F62: 964-967.
110. Manavalan, T., Manavalan, A., Thangavelu, K.P., & Heese, K. (2013). Characterization of optimized production, purification and application of laccase from *Ganoderma lucidum*. *Biochemical Engineering Journal*. (70): 106-114.

111. Mann, J., Markham, J.L., Peiris, P., Spooner-Hart, R.N., Holford, P. & Nair, N. G. (2015). Use of olive mill wastewater as a suitable substrate for the production of laccase by *Cerrena consors*. *International Biodeterioration & Biodegradation*. (99): 138-145.
112. Mansour, H. B., Corroler, D., Barillier, D. y Ghedia, K. (2007). Evaluation of genotoxicity and pro-oxidant effect of azo dyes: Acids yellow 17, violet y and orange 52, and of their degradation products by *Pseudomonas putida* mt-2. *Food and Chemical Toxicology*. 45: 1670-1677.
113. Margot, J., Bennati-Granier, C., Maillard, J., Barry, D.A. & Holliger, C. (2013). Bacterias versus fungal laccase: potential for micropollutant degradation. *AMB Express* 3. 63: 1-14.
114. Martínez, M.A. & García, M. (2012). Recisión: Aplicaciones ambientales de microorganismos inmovilizados. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 2: 55-73.
115. Mata-Alvarez, J. & Mitchell, D.A. (1999). Mathematical modeling biotechnology. *Biotechnology*. 2: 1-38.
116. Mazzucotelli, C.A., Curruty, I., Kotlar, C.E., Moreira, M.R., Ponce, A.G. & Roura, S.I. (2014). Development of a Microbial Consortium for Dairy Wastewater Treatment. *Biotechnology Bioprocess Engineering*. 19, 221-230.
117. Meena, M.C. & Bansal, M.K. (2014). Acute Copper Sulfate Poisoning: Case Report and Review of Literature. *APJMT*. 3(3): 130-133.
118. Mishra, A. & Malik, A. (2014). Novel fungal consortium for bioremediation of metals and dyes from mixed waste stream. *Bioresource Technology*. 171: 217-226.
119. Monod J. (1949) The growth of the bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology*. 3: 371-394.
120. Monod J. (1950) La technique de culture continue theorie et applications. *Ann. L'institut Pasteur*. 79: 390-410.
121. Moscipan, M., Zarebska, M., & Kulesza, R. (2016). Application od chromatografic techniques for determination of azo dyes and theirs degradation products in consumer goods. *CHEMIK*, 70(3):135-143.
122. Muthukumarasamy, N.P. & Murugan, S. (2014). Production, purification and application of bacterial laccase: a review. *Biotechnology*. 13(5): 196-205.
123. Nadell, C.D., Foster, K.R. & Xavier, J.B. (2010). Emergence of spatial structure in cell groups and the evolution of cooperation. *PLOS computational biology*. 6(3). DOI:10.1371/journal.pcbi.1000716.
124. O'Neill, C., Hawkes, F.R., Hawkes, D.L., Lourenco, N.D., Pinheiro, H.M. & Delée, W. (1999). Colour in textile effluents- sources, measurements, discharge consents and

- simulation: a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 74: 1009-1018.
125. Oren, A., Gurevich, P., & Henis, Y. (1991). Reduction of nitrosubstituted aromatic compounds by the halophilic anaerobic eubacteria *Haloanaerobium praevalens* and *Sporohalobacter marismortui*. *Applied and Environmental Microbiology*. 57(11): 3367-3370.
126. Pandey, A., Singh, P., & Iyengar, L. (2007). Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 59: 73-84.
127. Parasechiv, D., Tudor, C. & Petrariu, R. (2015). The Textile Industry and Sustainable Development: A Holt-Winters Forecasting Investigation for the Eastern European Area. *Sustainability*. 7: 1280-1291.
128. Patel, H. & Gupte, A. (2016). Optimization of different culture conditions for enhanced laccase production and its purification from *Tricholoma giganteum* AGHP. *Bioresources and Bioprocessing*. 3(11): 1-10. DOI:10.3390/su7021280.
129. Phugare, S.S., Kalyani, D.C., Surwase, S.N. & Jadhav, J.P. (2011). Ecofriendly degradation, decolorization and detoxification of textile effluent by a developed bacterial consortium . *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 74: 1288-1296.
130. Pirt S.J. (1965). Maintenance energy of bacteria in growing cultures. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 163: 224-231.
131. Plum, A., Engewald, W., & Rehorek, A. (2003). Rapid qualitative pyrolysis GC-MS analysis of carcinogenic aromatic amines from dyed textiles. *Chromatographia Supplement*. 57: S-243-S-248.
132. Quisehuatl-Tepexicuapan, E., Ferrera-Cerrato, R., Silva-Rojas, H. V., Rodríguez-Zaragoza, S., Alarcón, A. & Almaraz-Suárez, J. J. (2014): Free-living culturable bacteria and protozoa from the rhizoplanes of three floating aquatic plant species, *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology: Official Journal of the Societa Botanica Italiana*, DOI: 10.1080/11263504.2014.989282
133. Ramasany, R., Ahmed, H. A. & Karthik, S. S. (2012). Development of microbial consortium for the biodegradation and biodecolorization of textile effluents. *Journal of Urban and Environmental Engineering*. 6(1): 36-41. DOI: 10.4090/juee.2012.v6n1.036041.
134. Ramírez-Cavazos, L.I., Junghanns, C., Nair, R., Cárdenas-Chávez, D.L., Hernández-Luna, C. & Agathos, S.N. (2014 a). Enhanced production of thermostable laccase from a native strain of *Pycnoporus sanguineus* using central composite design. *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed y Biotechnol)*. 15(4): 343-352.
135. Ramírez-Cavazos, L.I., Junghanns, C., Ornelas-Soto, N., Cárdenas-Chávez, D.L., Hernández-Luna, C. & Demarche, P. (2014 b). Purification and characterization of two

- thermostable laccase from *Pycnoporus sanguineus* and potential role in degradation of endocrine disrupting chemicals. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 108: 32-42.
136. Ramírez-Montoya, L.A., Hernández-Montoya, V., Montes-Morán, M.A., Jáuregui-Rincón, J. & Cervantes, F.J. (2015). Decoloration of dyes with different molecular properties using free and immobilized lacases from *Trametes versicolor*. *Journal of Molecular Liquids*. 30-37.
137. Rauf, M.A. & Ashraf, S.S. (2012). Survey of recent trends in biochemically assisted degradation of dyes. *Chemical Engineering Journal*. 209: 520-530.
138. Rehorek, A., & Plum, A. (2007). Characterization of sulfonated azo dyes and aromatic amines by pyrolysis gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 388: 1653-1662.
139. Revankar, M.S. & S.S. Lele, (2007). Synthetic dye decolorization by white rot fungus, *Ganoderma* sp. WR-1. *Bioresource Technology*. 98: 775-780.
140. Rice, J.R. (1983). *Numerical Methods, Software, and Analysis* (New York: McGraw-Hill).
141. Rivera-Hoyos, C.M., Morales-Álvarez, E.D., Poutou-Pinales, R.A., Pedroza-Rodríguez, A.M., Rodríguez-Vázquez, R. & Delgado-Boada, J.M. (2013). Fungal laccases. *Fungal Biology Reviews*. 27: 67-82.
142. Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R. & Nigam, P. (2000). Remediation of dyes in textile effluent: critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology*. (77): 247-255.
143. Rodríguez-Delgado, M., Orona-Navar, C., García-Morales, R., Hernandez-Luna, C., Parra, R. & Manlknecht, J. (2016). Biotransformation kinetics of pharmaceutical and industrial micropollutants in groundwater by laccase cocktail from *Pycnoporus sanguineus* CS43 fungi. *International Biodeterioration y Biodegradation*. 108: 34-41.
144. Romaní, A, Fischer, H., Mille-Lindblom, C. & Tranvik, L. (2006) Interaction of bacteria and fungi on decomposing litter: differential extracellular enzyme activities. *Ecology*. 87: 2559-2569.
145. Romero, S., Blánquez, P., Caminal, G., Font, X., Sarrá, M. & Gabarrell, X. (2006). Different approaches to improving the textile dye degradation capacity of *Trametes versicolor*. *Biochemical Engineering Journal*. 31: 42-47.
146. Ruiu, L. (2013). *Brevibacillus laterosporus*, a Pathogen of Invertebrates and a Broad-Spectrum Antimicrobial Species. *Insects*. 4: 478-492.
147. Ruiz, A. *Ricciocarpus natans* (Marchantiophyta) una hepática acuática en México. *ContactoS*. 70: 67-70.

148. Savin, I.I. & Butnaru, R. (2008). Wastewater characteristics in textile finishing mills. *Environmental Engineering and Management Journal*. 7(6): 278-285.
149. Saat, M., Annuar, M., Alias, Z., Chuan, L. & Chisti, Y. (2013) Modeling of growth and laccase production by *Pycnoporus sanguineus*. *Bioprocess Byosyst Engineering*. DOI: 10.1007/s00449-013-1046-8
150. Schmidt, H. & Jirstrand, M. (2006). System Biology Tollbox for MATLAB: a computational platform for research in system biology. *Bioinformatics Applications Note* 22(4): 514-516.
151. Schlosser, D., Grey, R. & Fritsche, W. (1997). Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor*. Distribution of extra and intracellular enzymes activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 47: 412-418.
152. Senthivelan, T., Kanagaraj, J. & Panda, R.C. (2016). Recent trends in fungal laccase for various industrial applications: an eco-friendly approach- a review. *Biotechnology and Biopocess Engineering*. 21: 19-38.
153. Shanthi, M., & Kuzhalosai, V. (2012). Photocatalytic degradation of an azo dye, Acid Red 27, in aqueous solution using nano ZnO. *Indian Journal of Chemistry*. 428-434.
154. Shraddha, Shekher, R., Sehgal, S., Kamthania, M., & Kumar, A. (2011). Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Enxyme Research*. ID 217861. 1-11.
155. Singh, R.L., Singh, P.K. & Singh, R.P. (2015). Enzymatic decolorization and dedradation of azo dyes- A review. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 104: 21-31.
156. Singhal, A., Choudhary, G. & Thakur, I.S. (2009). Optimization of growth media for enhanced production of laccase by *Cryptococcus albidus* and its application for bioremediation of chemicals. *Canadian Journal of Civil Engineering*. 36: 1253-1264.
157. Singhal, A., Choudhary, G. & Thakur, I.S. (2012). Characterization of laccase activity produced by *Cryptococcus albidus*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. 42: 113-124.
158. Skarping, G., & Renman, L. (1983). Trace analysis amines and isocyanates using glass capillary gas chromatography and selective detection. II Determination of aromatic amines as perfluorofatty acid amines usind nitrogen-selective detection. *Journal of Chromatography*. 270: 207-218.
159. Slokar, S.P. & Marechal, M.L. (1998). Methods of Decoloration of Textile Wastewaters. *Dyes and Pigments*. 37(4): 335-356.

160. Solís, M., Solís, A., Inés, P.H., Manjarrez, N. & Flores, M. (2012). Microbial decolourization of azo dyes: A review. *Process Biochemistry*. 47: 1723-1748.
161. Songulashuili, G., Flahaut, S., Demarez, M., Tricot, C., Bauvoris, C. & Debaste, F. (2016). High yield production in seven days of *Coriolopsis gallica* 1184 laccase at 50 L scale; enzyme purification and molecular characterization. *Fungal Biology*. 120: 481-488.
162. Štítnický B. (2008-2017). Español.ADAPTOGENOS.com. Recuperado de: <http://es.adaptogens.com/c-532.asp>.
163. Tavares, A.P.M., Coelho, M.A.Z., Agapito, M.S.M., Coutinho, J.A.P. & Xavier, A.M.R.B. (2006). Optimization and Modeling of Laccase Production by *Trametes versicolor* in a Bioreactor Using Statistical Experimental Design. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 234: 233-248.
164. Thiruchelvam, A.T., & Ramsay, J.A. (2007). Growth and laccase production kinetics of *Trametes versicolor* in stirred tank reactor. *Applied Microbiology Biotechnology*. 74: 547-554.
165. Tišma, M., Sudar, M. & Vasic'-Rac'ki, Đ. (2010). Mathematical model for *Trametes versicolor* growth in submerged cultivation. *Bioprocess Biosyst Engineering*. 33: 749-758.
166. Toh, Y.C., Yen, J., Obbard, J.P. & Ting, Y.P. (2003). Decoloration of azo dyes by white rot fungi (WRF) isolated in Singapore. *Enzyme and Microbial Technology*. (30): 569-575.
167. Tonin, F., Melis, R., Cordes, A., Sanchez-Amat, A., Pollegioni, L. & Rosini, E. (2016). Comparison of different microbial laccases as tool for industrial uses. *New Biotechnology* 33(3): 387-398.
168. Trovaslet, M., Enaud, E., Guiavarch, Y., Corbisier, A.-M. & Vanhulle, S. (2007). Potential of a *Pycnoporus sanguineus* laccase in bioremediation of a wastewater and kinetic activation in the presence of an anthraquinonic acid dye. *Enzyme and Microbial Technology*. 41: 368-376.
169. Universidad de Salamanca. (2014). *Pseudomonas-putida-lupa-* [imagen]. Repositorio de IMAGEN. Salamanca, España. Recuperado de <http://retina.usal.es>.
170. Valls, C., Colom, J.F., Baffert, C., Gimbert, I., Roncero, M.B. & Sigoillot, J.C., (2010). Comparing the efficiency of the laccase-NHA and laccase-HBT system in eucalyptus pulp bleaching. *Biochemistry Engineering Journal*. 49: 401-407.
171. Wang, F., Chen, G. & Liu, C.Z. (2013). Immobilization of *Trametes versicolor* cultures for improving laccase production in bubble column reactor intensified by sonication. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 40: 141-150.

172. Wang, H., Peng, L., Ding, Z., Wu, J. & Shi, G. (2015). Stimulated laccase production of *Pleurotus feulae* JM301 fungus by *Rhodotorula mucilaginosa* yeast in co-culture. *Process Biochemistry*. (50): 901-905.
173. Wang, Y. Q., Zhang, H. M. & Tang, B. P. (2010). The interaction of C.I. acid red 27 with human hemoglobin in solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 100: 76-83.
174. Weng, S.S., Ku, K.L.& Lai, H.T. (2012). The implication of mediators for enhancement of laccase oxidation of sulfonamide antibiotics. *Bioresource Technology*. 113: 259-164.
175. Wesenberg, D., Kyriakides, I. & Agathos, S.N. (2003). White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances*. 22: 161-187.
176. Yan, J., Chen, Y., Niu, J., Chen, D. & Chagan, I. (2015). Laccase produced by thermotolerant strain of *Trametes trogii* LK13. *Brazilian Journal of Microbiology*. 46 (1): 59-65.
177. Yoshida, H. (1883). LXIII.- Chemistry of lacquer (Urushi). Part I. Communication from the Chemical Society of Tokio. *Journal Chemical Society Trans*. 43: 472-486.
178. Yuan, X., Tian, G., Zhao, Y., Chao, L., Wang, H. & Ng, T.B. (2016). Biochemical characteristics of three laccase isoform from the Basidiomycete *Pleurotus nebrodensis*. *Molecules*. 21(2): 203. DOI: doi.org/10.3390/molecules21020203.
179. Zeyer, J., Kocher, H.P. & Timmis, K.N. (1986). Influence of para-Substituents on the Oxidative Metabolism of *O*-Nitrophenols by *Pseudomonas putida* B2. *Applied and Environmental Microbiology*. 52(2): 334-339.
180. Zhang, H., Hong, Y.Z., Xiao, Y.Z., Yuan, J., Tu, X.M. & Zhang, X.Q. (2006). Efficient production of laccases by *Trametes* sp. AH28-2 in cocultivation with a *Trichoderma* strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*. (73): 89-94.
181. Zhang, B., Xu, X. & Zhu, L. (2017). Structure and function of the microbial consortia of activated sludge in typical municipal wastewater treatment plants in winter. *Scientific Reports*. DOI:10.1038/s41598-017-17743-x.
182. Zhu, C., Bao, G. & Huang, S. (2016). Optimization of laccase production in the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* (ACCC52857) induced through yeast extract and copper. *Biotechnology y biotechnological equipment*. 30(2): 270-276.

6.2. Sumario de ecuaciones

$\frac{dy}{dx} = f(x, y)$ Ecuación 1 67

$y(i+1) = y(i) + \Phi h$ Ecuación 2 67

$\Phi = f(x(i), y(i))$ Ecuación 3..... 68

$y(i+1) = y(i) + f(x(i), y(i))h$ Ecuación 4 68

$y(i)' = f(x(i), y(i))$ Ecuación 5 69

$y^0(i+1) = y(i) + f(x(i), y(i))h$ Ecuación 6 69

$y'(i+1) = f(x(i+1), y^0(i+1))$ Ecuación 7 69

$\bar{y} = \frac{y'(i) + y'(i+1)}{2} = \frac{f(x(i), y(i)) + f(x(i+1), y^0(i+1))}{2}$ Ecuación 8..... 70

$y(i + 1) = y(i) + \frac{f(x(i), y(i)) + f(x(i+1), y^0(i+1))}{2} h$ Ecuación 9 70

$y(i+1) = y(i) + \Phi(x(i), y(i), h) h$ Ecuación 10..... 70

$\Phi = a_1k_1 + a_2k_2 + \dots + a_nk_n$ Ecuación 11 70

$y(i + 1) = y(i) + \frac{1}{6}(k_1 + 4k_2 + k_3)h$ Ecuación 12..... 72

$y(i + 1) = y(i) + \frac{1}{6}(k_1 + 2k_2 + 2k_3 + k_4)h$ Ecuación 13..... 73

$\frac{dC(i)}{dt} = r(i)C(i)$ Ecuación 14..... 92

$\frac{\partial C_{x1}}{\partial t} = \left(\frac{\mu_{\max x1} \cdot C_1}{K_{s, x1} + C_1} \right) \cdot (C_{x1}) - kdC_{x1}$ Ecuación 15 95

$\frac{\partial C_{x1}}{\partial t} = \left(\frac{\mu_{\max x1} \cdot C_1}{K_{s, x1} + C_1} \right) \cdot (C_{x1})$ Ecuación 16..... 95

$-\frac{\partial C_1}{\partial t} = \left[\left(\frac{1}{Y_{C_{x1}C_1}} \left(\frac{\partial C_{x1}}{\partial t} \right) \right) \right] + mC_{x1} + \left[\left(\frac{1}{Y_{C_{p1}C_1}} \left(\frac{\partial C_{p1}}{\partial t} \right) \right) \right]$ Ecuación 17 95

$\frac{\partial C_{p1}}{\partial t} = \alpha_{x1} \frac{\partial C_{x1}}{\partial t} + \beta_{x1} \cdot C_{x1}$ Ecuación 18 96

$-\frac{\partial C_2}{\partial t} = \left(\frac{V_{\max} \cdot C_2}{K_{MEC_2} + C_2} \right) * C_{p1} * V_t$ Ecuación 19 97

$\frac{\partial C_2}{\partial t} = - \left(\frac{V_{\max} \cdot C_2}{K_{MEC_2} + C_2} \right) * C_{p1}$ Ecuación 20..... 97

$\frac{\partial C_{x2}}{\partial t} = \left(\frac{\mu_{\max, x2}(C_1) \cdot C_1}{K_{s, x2}(C_1) + C_1} \right) (C_{x2})$ Ecuación 21	98
$\frac{\partial C_{x2}}{\partial t} = \left(\frac{\mu_{\max, x2}(C_{p2}) \cdot C_{p2}}{(K_{s, x2}(C_{p2}) + C_{p2} + C_{p2}K_I)} \right) (C_{x2})$ Ecuación 22.....	99
$-\frac{\partial C_1}{\partial t} = \left[\left(\frac{1}{Y_{C_{x2}C_1}} \left(\frac{\partial C_{x2}}{\partial t} \right) \right) \right] + mC_{x2}$ Ecuación 23	99
$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_{\max}} \left(\frac{1}{C_1} \right) + \frac{1}{\mu_{\max}}$ Ecuación 24.....	100
$\frac{1}{V} = \frac{K_{ME}}{V_{\max}} \left(\frac{1}{C_2} \right) + \frac{1}{V_{\max}}$ Ecuación 25.....	101
$\frac{d(\bar{x})}{d(t)} = \left(\frac{\mu_{\max} \bar{s} s_0 t_0 \bar{x}}{K_s + \bar{s} s_0} \right)$ Ecuación 26	104
$\frac{d(\bar{s})}{d(t)} = - \left[y_x \left(\frac{\mu_{\max} \bar{s} s_0 t_0^2 \bar{x}}{(K_s s_0 + \bar{s} s_0^2)} \right) + \frac{m \bar{x} x_0 t_0}{s_0} \right]$ Ecuación 27.....	104
$\frac{d(\bar{p})}{d(t)} = \left[\alpha \left(\frac{\mu_{\max} \bar{s} s_0 t_0^2 \bar{x}}{K_s p_0 + \bar{s} s_0 p_0} \right) + \frac{\beta \bar{x} x_0 t_0}{p_0} \right]$ Ecuación 28.....	104
$\frac{d(\bar{s})}{d(t)} = - \left[y_x \left(\frac{\mu_{\max} \bar{s} s_0 t_0^2 \bar{x}}{(K_s s_0 + \bar{s} s_0^2)} \right) + \frac{m \bar{x} x_0 t_0}{s_0} + y_p \left[\alpha \left(\frac{\mu_{\max} \bar{s} s_0 t_0^2 \bar{x}}{K_s p_0 + \bar{s} s_0^2 p_0} \right) + \frac{\beta \bar{x} x_0 t_0^2}{p_0 s_0} \right] \right]$ Ecuación 29.....	104
$\frac{d(\bar{A})}{d(t)} = \left(\frac{V_{\max} \bar{A} (Clac) t_0}{K_M + \bar{A} A_0} \right)$ Ecuación 30.....	105

6.3. Sumario de códigos de programación

Código 1. Algoritmo para la solución de un sistema de ecuaciones diferenciales mediante el método de Runge-Kutta de cuarto orden.....	174
Código 2. Algoritmo para la solución de un sistema de ecuaciones diferenciales mediante el método de Runge-Kutta de cuarto orden con funciones para generar comparación de datos experimentales con modelos y la optimización de los parámetros.....	176

6.4. Anexos 1: códigos de programación

Código 1. Algoritmo para la solución de un sistema de ecuaciones diferenciales mediante el método de Runge-Kutta de cuarto orden.

```
% PROGRAMA PARA RESOLVER UN SISTEMA DE ECUACIONES DIFERENCIALES
% A TRAVÉS DEL UN MÉTODO NÚMÉRICO BASADO EN LA TEORIA DE RUNGE KUTTA DE
% CUARTO ORDEN
% EL MODELO MATEMÁTICO REPRESENTA EL CRECIMIENTO DE DOS MICROORGANISMOS,
% LA PRODUCCIÓN DE
% UNA ENZIMA Y LA DECOLORACIÓN DE UN COMPUESTO CONTAMINANTE

clear % LIMPIA EL WORKSPACE
clc % LIMPIA EL COMMAND WINDOW

%DECLARACIÓN DE LAS CONDICIONES INICIALES
biomasa = 0.1;
sustrato = 4;
producto=0;
colorante=200;
tiempoinicial=0;
tiempofinal = 200;

%ELECCIÓN DE TAMAÑO DE PASO
dx = 1;
n = (tiempofinal-tiempoinicial)/dx;

% INICIALIZACIÓN DE LAS VARIABLES DEPENDIENTES E INDEPENDIENTES
x(1) = tiempoinicial;
y1(1) = biomasa;
y2(1)=sustrato;
y3(1)=producto;
y4(1)=colorante;

%DECLARACIÓN DE LAS CONSTANTES DEL MODELO MATEMÁTICO
mmax=0.1;
ks=2.1;
yredx=1/0.2;
alfa=2;
beta=10;
vmax=20;
km=0.13;

% DESIGNACIÓN DEL SISTEMA DE ECUACIONES DIFERENCIALES
edo=inline('((mmax*y2)/(ks+y2))*y1');
edo1=inline('-(yredx*((mmax*y2)/(ks+y2))*y1)*y2');
edo2=inline('(alfa*((mmax*y2)/(ks+y2))*y1)+beta*y1');
edo3=inline('-(km+y4)/(vmax*y4)');

% SOLUCIÓN DEL METODO DE RUNGE KUTTA CUARTO ORDEN
for i = 1:n
    x(i+1)=x(i)+dx;

    k11=edo(y1(i),y2(i),mmax,ks);
```

```
k12=edo1 (y1 (i) , y2 (i) , yredx, mmax, ks) ;
k13=edo2 (y1 (i) , y2 (i) , mmax, ks, alfa, beta) ;
k14=edo3 (y4 (i) , vmax, km) ;

yk21 (i) =y1 (i) +0.5*k11*dx;
yk22 (i) =y2 (i) +0.5*k12*dx;
yk24 (i) =y4 (i) +0.5*k14*dx;
k21=edo (yk21 (i) , yk22 (i) , mmax, ks) ;
k22=edo1 (yk21 (i) , yk22 (i) , yredx, mmax, ks) ;
k23=edo2 (yk21 (i) , yk22 (i) , mmax, ks, alfa, beta) ;
k24=edo3 (yk24 (i) , vmax, km) ;

yk31 (i) =y1 (i) +0.5*k21*dx;
yk32 (i) =y2 (i) +0.5*k22*dx;
yk34 (i) =y4 (i) +0.5*k24*dx;
k31=edo (yk31 (i) , yk32 (i) , mmax, ks) ;
k32=edo1 (yk31 (i) , yk32 (i) , yredx, mmax, ks) ;
k33=edo2 (yk31 (i) , yk32 (i) , mmax, ks, alfa, beta) ;
k34=edo3 (yk34 (i) , vmax, km) ;

yk41 (i) =y1 (i) +k31*dx;
yk42 (i) =y2 (i) +k32*dx;
yk44 (i) =y4 (i) +k34*dx;
k41=edo (yk41 (i) , yk42 (i) , mmax, ks) ;
k42=edo1 (yk41 (i) , yk42 (i) , yredx, mmax, ks) ;
k43=edo2 (yk41 (i) , yk42 (i) , mmax, ks, alfa, beta) ;
k44=edo3 (yk44 (i) , vmax, km) ;

y1 (i+1) = y1 (i) + 1/6* ((k11+2*k21+2*k31+k41)) *dx;
y2 (i+1) = y2 (i) + 1/6* ((k12+2*k22+2*k32+k42)) *dx;
y3 (i+1) = y3 (i) + 1/6* ((k13+2*k23+2*k33+k43)) *dx;
y4 (i+1) = y4 (i) + 1/6* ((k14+2*k24+2*k34+k44)) *dx;
end

% GENERACIÓN DE GRÁFICAS
figure
subplot (2,2,1) , plot (x, y1)
xlabel ('tiempo (min) ');
ylabel ('biomasa (g/L) ');
subplot (2,2,2) , plot (x, y2)
xlabel ('tiempo (min) ');
ylabel ('glucosa (g/L) ');
subplot (2,2,3) , plot (x, y3)
xlabel ('tiempo (min) ');
ylabel ('actividad lacasa (U/L) ');
subplot (2,2,4) , plot (x, y4)
xlabel ('tiempo (min) ');
ylabel ('decoloración (mg/L) ');
axis ([0, tiempofinal, -1, colorante]);
figure(gcf)

% FIN DEL PROGRAMA
```


Código 2. Algoritmo para la solución de un sistema de ecuaciones diferenciales mediante el método de Runge-Kutta de cuarto orden con funciones para generar comparación de datos experimentales con modelos y la optimización de los parámetros.

Solución a sistema de ecuaciones diferenciales para *P. putida* sin AR27
In[25]:

```
# Se importan los datos de un archivo cvs con los valores
experimentales
import matplotlib.pyplot as plt
import numpy as np
import pandas as pd
```

```
df = pd.read_csv("datos.csv")
```

```
print(df)
```

```
# In[26]:
```

```
#Generación de datos a partir de los valores experimentales
t = df["tiempo"]
b = df["biomasa"]
s = df["glucosa"]
```

```
plt.plot(t, b, "o", color="red")
plt.plot(t, s, "o", color="blue")
```

```
plt.show()
```

```
# In[27]:
```

```
# Grafica de los errores obtenidos a partir de la desviación estándar
de los datos experimentales
```

```
e = df["error"]
e1 = df["error.1"]
```

```
plt.errorbar(t, b, yerr=e, elinewidth=1, linestyle="")
plt.errorbar(t, s, yerr=e1, elinewidth=1, linestyle="")
```

```
plt.savefig("error.png")
```

```
# In[28]:
```

```
# Se importan librerías de utilidad para las operaciones que se
realizan en el algoritmo
import matplotlib.pyplot as plt
```

```
import numpy as np

# En la solución numérica es importante realizar cambios internos
respecto a las ecuaciones diferenciales que van a resolverse, además
de indicar los valores iniciales.

# In[29]:

# Definición de una función que resuelve a través de Runge-Kutta de
4to orden un sistema de ecuaciones diferenciales
# de primer orden (sistema bacteriano que contempla el crecimiento y
el consumo de sustrato)

# La función recibe los parámetros del sistema de ecuaciones y
resuelve bajo condiciones iniciales
def model_1(mmax, ks, m, yredx):
    biomasa = 0.004
    sustrato = 4.
    tiempoinicial = 0.
    tiempofinal = 24.

    #ELECCIÓN DE TAMAÑO DE PASO
    dx = 0.5
    n = int((tiempofinal - tiempoinicial) / dx)

    #INICIALIZACIÓN DE LAS VARIABLES DEPENDIENTES E INDEPENDIENTES
    # Asignación de ceros en el vector correspondiente
    x = np.zeros(n + 1)
    y1 = np.zeros(n + 1)
    y2 = np.zeros(n + 1)

    # Asignación de los valores iniciales en la posición inicial del
vector
    x[0] = tiempoinicial
    y1[0] = biomasa
    y2[0] = sustrato

    #DESIGNACIÓN DEL SISTEMA DE ECUACIONES DIFERENCIALES

    edo = lambda y1_, y2_: ((mmax * y2_) / (ks + y2_))

    edo1 = lambda y1_, y2_: -(yredx * (((mmax * y2_) / (ks + y2_))) +
m * y1_)

    #SOLUCIÓN DEL METODO DE RUNGE KUTTA CUARTO ORDEN
    yk21 = np.zeros(n)
    yk22 = np.zeros(n)
    yk31 = np.zeros(n)
    yk32 = np.zeros(n)
    yk41 = np.zeros(n)
    yk42 = np.zeros(n)
```

```
for i in range(0, n):
    x[i + 1] = x[i] + dx

    # Calculo de los valores de K para la solución numérica
    k11 = edo(y1[i], y2[i])
    k12 = edo1(y1[i], y2[i])

    yk21[i] = y1[i] + 0.5 * k11 * dx
    yk22[i] = y2[i] + 0.5 * k12 * dx

    k21 = edo(yk21[i], yk22[i])
    k22 = edo1(yk21[i], yk22[i])

    yk31[i] = y1[i] + 0.5 * k21 * dx
    yk32[i] = y2[i] + 0.5 * k22 * dx

    k31 = edo(yk31[i], yk32[i])
    k32 = edo1(yk31[i], yk32[i])

    yk41[i] = y1[i] + k31 * dx
    yk42[i] = y2[i] + k32 * dx

    k41 = edo(yk41[i], yk42[i])
    k42 = edo1(yk41[i], yk42[i])

    # Calculo del valor de paso adelante de la función
    y1[i + 1] = y1[i] + (1. / 6.) * ((k11 + 2 * k21 + 2 * k31 +
k41)) * dx
    y2[i + 1] = y2[i] + (1. / 6.) * ((k12 + 2 * k22 + 2 * k32 +
k42)) * dx

    return (x, y1, y2)

# Se define la función `mse` la cual calcula el error cuadrático
entre los datos experimentales `(xe, ye)` y los datos generados por el
modelo `(xm, ym)`. Este apartado del algoritmo no requiere de
ajustes incluso si el sistema de ecuaciones diferenciales cambia.

# In[30]:

def mse(xe, ye, xm, ym):
    # Buscamos los índices `a` y `b` más cercanos tal que `x[a] <= s
<= x[b]`
    def f(s):
        a = 0
        b = 1
        m = len(xm)
        for i in range(1, m):
            if xm[i] < s:
                a = i - 1
                b = i
    # Interpolación
```

```
    return (ym[b] + ym[a]) / 2.  
# yp - ym interpolada  
yp = [f(s) for s in xe]  
n = len(yp)  
# Calcula el error entre `ye` y `yp`  
s2 = sum([(ye[i] - yp[i]) ** 2 for i in range(n)])  
ds = (s2 / (n - 1)) ** 0.5  
return s2
```

En la siguiente etapa del algoritmo se incluyen las instrucciones para el optimizador de los parámetros. Esta función recibe los parámetros de acuerdo a los modelos matemáticos evaluados. # cada ecuación requiere de un error, en este caso son dos las ecuaciones diferenciales a evaluar, por lo que son dos los errores a calcular.

```
# In[31]:
```

```
import random
```

```
def model_1_optimizador(mmax0, ks0, m0, yredx0, best_g):  
    mmax = mmax0  
    ks = ks0  
    yredx = yredx0  
    m = m0  
  
    # Se calculan los datos del modelo  
    x, y1, y2 = model_1(mmax, ks, m, yredx)  
  
    # Se calculan los errores experimentales contra los del modelo  
    eb = mse(t, b, x, y1)  
    es = mse(t, s, x, y2)  
  
    # Los mejores x, y1, y2 para 1000 ciclos de optimización  
    best_eb = eb  
    best_es = es  
    best_x = x  
    best_y1 = y1  
    best_y2 = y2  
    # la función perturbador aumenta o disminuye los valores de las  
    variables que se alimenten, en relación a un valor máximo  
    # un valor mínimo y un tamaño de paso  
    def perturbar(p, low, high, k=0.005):  
        p = p + (2 * random.random() - 1) * (k + random.random() *  
0.05)  
        if p <= low:  
            p = low  
        elif p >= high:  
            p = high  
        return p  
    # Se realizan 1000 calculos iterativos para la optimización de los  
    parámetros
```

```
for i in range(1000):
    immax = perturbar(mmax, 0.001, 1.)
    iks = perturbar(ks, 0.001, 4.)
    im = perturbar(m, 0.001, 1.)
    iyredx = perturbar(yredx, 0.001, 2.)

    x, y1, y2 = model_1(immax, iks, im, iyredx)

    eb = mse(t, b, x, y1)
    es = mse(t, s, x, y2)

    if (es + eb) < best_g:
        best_y1 = y1
        best_y2 = y2
        mmax = immax
        ks = iks
        m = im
        yredx = iyredx
        if es < best_es:
            best_es = es
        if eb < best_eb:
            best_eb = eb
        best_g = best_es + best_eb

print("error_s = {}".format(es))
print("error_b = {}".format(eb))
print("error = {}".format(es + eb))
print("mmax = {}".format(mmax))
print("ks = {}".format(ks))
print("m = {}".format(m))
print("yredx = {}".format(yredx))
print("-" * 80)

return (best_g, x, y1, y2, mmax, ks, m, yredx)
```

```
# In[32]:
```

```
#DECLARACIÓN DE LAS CONSTANTES DEL MODELO MATEMÁTICO
# En este apartado se alimentan los datos principales sobre
parámetros
error = 4.796520375705327
mmax = 0.2998127557239845
ks = 3.008549856120551
m = 0.044061741251006085
yredx = 1.532187329677956

#x, y1, y2 = model_1(mmax, ks, m, yredx)

best_g = 10e100
best_x = None
best_y1 = None
best_y2 = None
```

```
best_mmax = mmax
best_ks = ks
best_m = m
best_yredx = yredx

#número de ciclos en los cuales obtendrá los mejores parámetros (si
por cada ciclo se optimiza usando 1000 valores, en realidad
# Utiliza 10000 cálculos iterativos)
for i in range(10):
    ibest_g, x, y1, y2, mmax, ks, m, yredx = model_1_optimizador(mmax,
ks, m, yredx, best_g)
    if ibest_g < best_g:
        best_g = ibest_g
        best_x = x
        best_y1 = y1
        best_y2 = y2
        best_mmax = mmax
        best_ks = ks
        best_m = m
        best_yredx = yredx

x = best_x
y1 = best_y1
y2 = best_y2
mmax = best_mmax
ks = best_ks
m = best_m
yredx = best_yredx

print("*-" * 40)
print("error = {}".format(best_g))
print("mmax = {}".format(mmax))
print("ks = {}".format(ks))
print("m = {}".format(m))
print("yredx = {}".format(yredx))

p1 = plt.plot(x, y1, color="red")
p1e = plt.plot(t, b, "o", color="red")
p2 = plt.plot(x, y2, color="blue")
p2e = plt.plot(t, s, "o", color="blue")

plt.errorbar(t, b, yerr=e, elinewidth=2, color="red", linestyle="")
plt.errorbar(t, s, yerr=e1, elinewidth=2, color="blue", linestyle="")

plt.title("Bacterias sin AR27")
plt.xlabel("tiempo (h)")
plt.ylabel("Sustrato (g1-1) | Biomasa (g1-1)")
plt.legend((p1[0], p2[0]), ('Modelo Biomasa', 'Modelo Sustrato'),
loc=0)

plt.savefig("model_1")
#Fin del algoritmo
```

6.5. Anexos 2: publicaciones

6.5.1. Publicaciones relacionadas con la presente tesis

1. Revista Iberoamericana de Ciencias www.reibci.org ISSN 2334-2501

Consortios biológicos diseñados para la producción de lacasas y eliminación de colorantes

Roberto González¹, Roberto Villagómez¹, Alfredo Madariaga², Javier Castro¹ y Cesar González^{1*}
Área Académica de Química, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del estado de Hidalgo, Ciudad del conocimiento, carretera Tulancingo-Pachuca Km 4.5, Col. Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, C.P. 42184, México.¹
Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Rancho universitario Av. Universitaria Km 1, Ex. Hda. Aquetzalpa AP 32, Tulancingo, Hidalgo, C.P. 43600, México.²
Autor de correspondencia: ccr_gonzalez@yahoo.com

Abstract— Biological consortiums designed for the production of laccases and the treatment with dyes are analyzed in this review. To avoid low yields in discoloration and laccase production, a frequent problem in monocultures during the treatment of textile effluents, consortium systems are suggested. Reports in literature provide evidence about of consortiums advantages in decolorization of a wide range of toxic dyes and in enzymatic production, however there are few reports related to the design of consortiums that consider the coupling of the degradation properties and the interspecific relationships between organisms. The consortia designed could innovate the treatments available for textile effluents.

Keyword— *designed consortium, textile effluents, biological induction, azo dyes, decoloration, degradation.*

Resumen— Los consorcios biológicos diseñados para la producción de lacasas y el tratamiento con colorantes se analizan en esta revisión. Para evitar los bajos rendimientos en la decoloración y la producción de lacasas, un problema frecuente en monocultivos durante el tratamiento de efluentes textiles, se sugieren sistemas en consorcio. Los reportes en literatura dan evidencia de las ventajas de los consorcios en la decoloración de una amplia gama de colorantes tóxicos y en la producción enzimática, sin embargo son escasos los reportes relacionados con el diseño de consorcios que consideren el acoplamiento de las propiedades degradativas y las relaciones interespecificas entre los organismos. Los consorcios diseñados podrían innovar los tratamientos disponibles para efluentes textiles.

Palabras claves— *consorcios, efluentes textiles, simbiosis, decoloración, degradación*

2. Enviado a la Journal of Environmental Science and Health, Part A, con correcciones mayores.

Artículo (enviado): González, R.*; Villagómez, R.; Madariaga, A.; Castro, J.; González, C. Increase in laccase activity in a *Trametes versicolor* and *Pseudomonas putida* consortium during acid red 27 decolorization. *JESHA*. **2018**. 0053.

Journal of Environmental Science and Health, Part A
Increase in laccase activity in a *Trametes versicolor* and *Pseudomonas putida*
consortium during acid red 27 decolorization
–Manuscript Draft–

Full Title:	Increase in laccase activity in a <i>Trametes versicolor</i> and <i>Pseudomonas putida</i> consortium during acid red 27 decolorization
Manuscript Number:	JESHA-2018-0053
Article Type:	Original Research
Keywords:	Design consortiums; laccase enzymatic activity; Fungus/bacteria interaction; Overexpression
Manuscript Classifications:	Decontamination; Environmental microbiology; Environmental modeling; Remediation; Sludge and sewage waste treatment
Abstract:	This study evaluated laccase enzymatic activity (LEA) in consortium formed by <i>Trametes versicolor</i> and <i>Pseudomonas putida</i> during acid red 27 (AR27) decolorization, and to characterize consortium in terms of kinetic growth parameters, LEA and glucose consumption. Microorganism monocultures and consortium cultures were grown at 30 °C and at a pH of 4.5, either in presence or not of AR27, under constant agitation at 130 rpm. Biomass, LEA and glucose and AR27 concentration were periodically measured. The results were adjusted to the kinetic equations of Monod, Luedeking-Piret, and Michaelis-Menten. The effect of the initial concentration of the bacterial inoculum on LEA also was evaluated. Initial inoculum concentrations of 0.0765 g/L (fungal mass) and 0.0276 g/L (bacterial mass) at a pH of 4.5 led to a LEA yield of 1653 U/L, which decreased to 851 U/L in the presence of AR27. A LEA production of 3066 U/L even in the presence of AR27 was obtained by increasing bacterial inoculum concentration to 0.0828 g/L. As shown by the parameters μ_{max} , K_s , y_x , m , y_p , α , β , V_{max} , and K_M from kinetic models, the presence of AR27 and <i>P. putida</i> increased LEA. These results support the usefulness of the consortium in remediation textile effluents.
Order of Authors:	José González, M.S. Alfredo Madariaga, PhD Roberto Villagómez, PhD Javier Castro, PhD César Gonzalez, PhD

Fin...

