



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

**CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

TESIS

**BIORREMEDIACIÓN DE VINAZAS DE LA INDUSTRIA TEQUILERA Y
MEZCALERA MEDIANTE TRATAMIENTO FISICOQUÍMICO Y BIOLÓGICO**

PRESENTA

JOSÉ LUIS RETES PRUNEDA

**PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

TUTOR

DR. JUAN JÁUREGUI RINCÓN

COMITÉ TUTORIAL

**DR. GUSTAVO DÁVILA VÁZQUEZ
DRA. ILIANA ERNESTINA MEDINA RAMÍREZ**

AGUASCALIENTES, AGS., 28 DE MARZO DE 2014



Centro de Ciencias Básicas

M. en C. JOSÉ LUIS RETES PRUNEDA
ALUMNO(A) DEL DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E

Estimado(a) alumno(a) Retes:

Por medio de este conducto me permito comunicar a usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **“BIORREMEDIACIÓN DE VINAZAS DE LA INDUSTRIA TEQUILERA Y MEZCALERA MEDIANTE TRATAMIENTO FISICOQUÍMICO Y BIOLÓGICO”**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

A T E N T A M E N T E
Aguascalientes, Ags., 27 de marzo de 2014-03-27
“SE LUMEN PROFERRE”
EL DECANO

M. En C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS

c.e.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.e.p.- Jefatura de Departamento de Ingeniería Bioquímica
c.ep.- Consejero Académico
c.e.p.- Interesado(a)
JJRG,mjda



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M.C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **JOSÉ LUIS RETES PRUNEDA** con ID **24739** quien realizó la tesis titulada: **BIORREMEDIACIÓN DE VINAZAS DE LA INDUSTRIA TEQUILERA Y MEZCALERA MEDIANTE TRATAMIENTO FÍSICOQUÍMICO Y BIOLÓGICO**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que el pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 26 de marzo de 2014.

Dr. Juan Jáuregui Rincón

Tutor de Tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Ingeniería Bioquímica
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M.C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **JOSÉ LUIS RETES PRUNEDA** con ID 24739 quien realizó la tesis titulada: **BIORREMEDIACIÓN DE VINAZAS DE LA INDUSTRIA TEQUILERA Y MEZCALERA MEDIANTE TRATAMIENTO FÍSICOQUÍMICO Y BIOLÓGICO**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que el pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 26 de marzo de 2014.

Dr. Gustavo Dávila Vázquez
Co-Tutor de Tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Ingeniería Bioquímica
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M.C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como asesor designado del estudiante **JOSÉ LUIS RETES PRUNEDA** con ID **24739** quien realizó la tesis titulada: **BIORREMEDIACIÓN DE VINAZAS DE LA INDUSTRIA TEQUILERA Y MEZCALERA MEDIANTE TRATAMIENTO FÍSICOQUÍMICO Y BIOLÓGICO**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que el pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

“Se Lumen Proferre”

Aguascalientes, Ags., a 26 de marzo de 2014.

Dra. Iliana E. Medina Ramírez
Asesora de Tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Ingeniería Bioquímica
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme vivir esta experiencia profesional.

A mi esposa, Sandra, y a mis hijos José Enrique y Daniela Liliana por estar conmigo en todo momento durante esta etapa. Ustedes son mi motivación. Gracias de todo corazón.

A mis padres, José Luis y Ana Luisa, a mis hermanos, Iván y Ana Ekaterina.

A mis suegros, Enrique y Lidia, por el apoyo que nos brindan a mi familia y a mí.

A mi tutor, el Dr. Juan Jáuregui Rincón, y a mi comité tutorial, que estuvo conformado por el Dr. Gustavo Dávila Vázquez y la Dra. Iliana Medina Ramírez. Gracias por todo su apoyo, sus enseñanzas y su guía.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por su apoyo económico con la beca de estudios de posgrado del PNPC, y para participar y asistir a Congresos.

A mis compañeras y amigas del Laboratorio de Estudios Ambientales de la UAA, la Dra. Samantha Ramos y la M.C. Romelia Martínez. Muchas gracias por todo su apoyo.

Al IBQ. Gustavo Franco por su apoyo en el laboratorio.

Al Dr. Roberto Rico Martínez por su apoyo en el curso de Redacción Científica.

Al Dr. Juan Antonio Lozano Álvarez y la Dra. Norma Angélica Chávez Vela de la UAA, por sus recomendaciones y apoyo,

Al Dr. Felipe Alatraste Mondragón del IPICYT por contactarme con la empresa Real de Magueyes S.A. de C.V. y también por sus recomendaciones y apoyo.

A la Dra. Ma. Consolación Martínez Saldaña de la UAA, por su apoyo.

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Al CIATEJ y a la empresa Real de Magueyes S.A. de C.V. por facilitarme las vinazas necesarias para este trabajo.

A todos quienes me brindaron su ayuda y amistad, muchas gracias.

DEDICATORIAS

A Sandy, mi esposa, quien me ha dado mucho de lo bueno de mi vida y de sí misma, por su amor y su fe en mí. Con todo mi amor, te dedico este trabajo.

A mi hijo José Enrique, nuestro primer milagro y regalo de Dios.

A mi hija Daniela Liliana, nuestro segundo milagro y regalo de Dios.

A mi padre, José Luis y a mi madre, Ana Luisa, por todo lo que me han brindado.

A mi hermano Iván y a mi hermana Ana Ekaterina, que son parte importante de mí.

A la memoria de mi abuela Isabel y de mis abuelos Antonio y Arturo.

A mi abuela Rosa.

A Dios, por permitirme conocer parte de sus maravillas, y por escucharme.

A toda la familia Retes, a toda la familia Pruneda, y a la familia López Alcántar.

A todos ellos dedico con cariño este esfuerzo que se cristalizó en un doctorado. Siempre los tendré conmigo.

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	1
INDICE DE TABLAS	6
INDICE DE FIGURAS	7
ACRONIMOS	10
RESUMEN	13
ABSTRACT	15
INTRODUCCIÓN	17
1. ALGINATOS	27
1.1 ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS ALGINATOS	27
1.2 FORMACIÓN DE GELES DE ALGINATO	28
1.3 MÉTODOS EMPLEADOS PARA FORMACIÓN DE GELES DE ALGINATO	30
2. HONGOS LIGNINOLÍTICOS	32
2.1 ENZIMAS PRODUCIDAS POR HONGOS LIGNINOLÍTICOS	33
2.1.1 LIGNINO PEROXIDASA	35
2.1.2 MANGANESO PEROXIDASA	36
2.1.3 LACASA	36
2.1.4 PEROXIDASAS VERSÁTILES	37
2.1.5 OTRAS ENZIMAS QUE PARTICIPAN EN LA DEGRADACIÓN DE LIGNINA	37
2.2 ESTUDIOS PREVIOS DE BIORREMEDIACIÓN DE VINAZAS CON HONGOS LIGNINOLÍTICOS	37
3. HIPÓTESIS	40

4. OBJETIVOS.....	40
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	40
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	40
5. METODOLOGÍA.....	41
5.1. OBTENCIÓN DE VINAZAS.....	41
5.1.1 VINAZA TEQUILERA.....	41
5.1.2 VINAZA MEZCALERA.....	41
5.2 CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE VINAZAS TEQUILERA Y MEZCALERA.....	41
5.3 TRATAMIENTO FISCOQUIMICO A VINAZAS USANDO ALGINATO DE SODIO.....	42
5.4 DETERMINACIÓN DE LA DBO₅.....	43
5.5 DETERMINACIÓN DE LA DQO.....	44
5.6 DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS TOTALES.....	44
5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	44
5.8 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE CRECIMIENTO DE 20 CEPAS DE HONGOS LIGNINOLÍTICOS EN UN MEDIO COMPUESTO DE VINAZA TEQUILERAY AGAR.....	44
5.9 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA LIGNINOLÍTICA DE LAS CEPAS <i>P. ostreatus</i> 7992 Y <i>T. trogii</i> 8154.....	45
5.10 BIORREMEDIACIÓN DE VINAZA CRUDA EMPLEANDO HONGOS LIGNINOLÍTICOS.....	47
5.11 APLICACIÓN SECUENCIAL DEL TRATAMIENTO FISCOQUÍMICO Y DE BIORREMEDIACIÓN A VINAZA.....	47
5.11.1 PREPARACIÓN DE INÓCULOS.....	48
5.11.2 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LOS EXPERIMENTOS.....	48
5.11.3 INOCULACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.....	49

5.12 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE FENOLES EN MUESTRAS DE VINAZA CRUDA Y DESPUÉS DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS 51

6. RESULTADOS 52

6.1 CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE LA VINAZA TEQUILERA..... 52

6.2 TRATAMIENTO FISCOQUÍMICO A VINAZA TEQUILERA CRUDA 53

6.3 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE CRECIMIENTO DE 20 CEPAS DE HONGOS LIGNINOLÍTICOS EN UN MEDIO COMPUESTO DE VINAZA TEQUILERA Y AGAR 55

6.4 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA LIGNINOLÍTICA DE LAS CEPAS *P. ostreatus* 7992 Y *T. trogii* 8154 EN VINAZA (MEDIO LÍQUIDO). 58

6.5 BIORREMEDIACIÓN DE VINAZA TEQUILERA CRUDA EMPLEANDO HONGOS LIGNINOLÍTICOS 61

6.6 APLICACIÓN SECUENCIAL DEL TRATAMIENTO FISCOQUÍMICO Y DE BIORREMEDIACIÓN A VINAZA TEQUILERA..... 62

6.7 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE FENOLES EN MUESTRAS DE VINAZA TEQUILERA CRUDA Y EN MUESTRAS OBTENIDAS DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS..... 66

6.8 CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE LA VINAZA MEZCALERA..... 67

6.9 TRATAMIENTO FISCOQUÍMICO A VINAZA MEZCALERA CRUDA..... 69

6.10 BIORREMEDIACIÓN DE VINAZA MEZCALERA CRUDA EMPLEANDO HONGOS LIGNINOLÍTICOS 70

6.11 APLICACIÓN SECUENCIAL DEL TRATAMIENTO FISCOQUÍMICO Y DE BIORREMEDIACIÓN A VINAZA MEZCALERA 72

6.12 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE FENOLES EN LAS MUESTRAS DE VINAZA MEZCALERA CRUDA, Y EN MUESTRAS OBTENIDAS EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS 75

7. DISCUSION 76

7.1 CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE LA VINAZA TEQUILERA..... 76

7.2 TRATAMIENTO FISCOQUÍMICO CON ALGINATO A VINAZA TEQUILERA CRUDA 77

7.3 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE CRECIMIENTO DE 20 CEPAS DE HONGOS LIGNINOLÍTICOS EN UN MEDIO COMPUESTO DE VINAZA TEQUILERA Y AGAR 79

7.4 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA LIGNINOLÍTICA DE LAS CEPAS *P. ostreatus* 7992 Y *T. trogii* 8154 EN VINAZA TEQUILERA (MEDIO LÍQUIDO)..... 81

7.5 BIORREMEDIACIÓN DE VINAZA TEQUILERA CRUDA EMPLEANDO HONGOS LIGNINOLÍTICOS 82

7.6 APLICACIÓN SECUENCIAL DE TRATAMIENTO FISCOQUÍMICO Y BIORREMEDIACIÓN A VINAZA TEQUILERA 85

7.7 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE FENOLES EN LAS MUESTRAS DE VINAZA TEQUILERA CRUDA, Y EN MUESTRAS OBTENIDAS EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS 88

7.8 CARACTERIZACIÓN FISCOQUIMICA DE LA VINAZA MEZCALERA..... 89

7.9 TRATAMIENTO FISCOQUÍMICO CON ALGINATO A VINAZA MEZCALERA 90

7.10 BIORREMEDIACIÓN DE VINAZA MEZCALERA CRUDA EMPLEANDO HONGOS LIGNINOLÍTICOS 91

7.11 APLICACIÓN SECUENCIAL DE TRATAMIENTO FISCOQUÍMICO Y BIORREMEDIACIÓN A VINAZA MEZCALERA 92

7.12 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE FENOLES EN MUESTRAS DE VINAZA MEZCALERA CRUDA, Y EN MUESTRAS DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS..... 94

CONCLUSIONES 96
GLOSARIO..... 97
BIBLIOGRAFIA 101
ANEXOS..... 108



INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización de la vinaza tequilera	52
Tabla 2. Resultados del tratamiento fisicoquímico a vinaza tequilera (n=2).....	53
Tabla 3. Crecimiento y decoloración del medio de cultivo de 20 cepas de hongos ligninolíticos en medio vinaza-agar, después de 6 semanas de cultivo	55
Tabla 4. Resumen de los mejores resultados obtenidos en cada tipo de tratamiento aplicado a vinazas tequileras	64
Tabla 5. Resultados de la cuantificación de fenoles en muestras de vinaza cruda y después de los distintos tratamientos	67
Tabla 6. Resultados de la caracterización de la muestra de vinaza mezcalera	68
Tabla 7. Resultados del tratamiento fisicoquímico a vinaza mezcalera (n=2)	70
Tabla 8. Resumen de los mejores resultados obtenidos en cada tipo de tratamiento aplicado a vinazas mezcaleras.....	73
Tabla 9. Resultados de la cuantificación de fenoles en muestras de vinaza cruda y con distintos tratamientos.....	75

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. (a) Estructura del monómero de $\beta(1 \rightarrow 4)$ -D-manuronato; (b) estructura del monómero de $\alpha(1 \rightarrow 4)$ -L-guluronato; (c) fracción de la estructura de una cadena polimérica de alginato de sodio, conformada por la unión de monómeros de manuronato (M) y guluronato (G).....	28
Figura 2. Modelo de la “caja de huevos” de la reacción del Ca^{+2} para formar un gel de alginato de calcio.....	29
Figura 3. Hongos ligninolíticos localizados en los bosques de los estados de Chiapas (izquierda) y Aguascalientes (derecha), México.....	32
Figura 4. Procesos de degradación de lignina por hongos ligninolíticos.....	34
Figura 5. Ajuste del pH de la vinaza mezcalera previo al tratamiento con alginato para remoción de sólidos.....	43
Figura 6. Agitación para mezclar el alginato en vinaza mezcalera previo a su gelificación.....	43
Figura 7. Preparación de inóculos de hongos ligninolíticos en medio líquido GMY para biorremediar vinaza tequilera.....	48
Figura 8. Cultivo de pellets de <i>T. troglia</i> listos para ser inoculados a vinazas.....	49
Figura 9. Matracas con medios de cultivo de acuerdo al diseño experimental 2^3 , previo a su inoculación con hongos para biorremediación de vinaza mezcalera tratada con alginato.....	50
Figura 10. Matracas con medios de cultivo de acuerdo al diseño experimental 2^3 , inoculados para biorremediación de vinaza mezcalera tratada con alginato.....	50
Figura 11. Sólidos removidos con el tratamiento fisicoquímico a vinaza tequilera...54	
Figura 12. Decoloración de medio semisólido agar-vinaza 100%, después de 4 semanas de cultivo con hongos ligninolíticos. en el sentido de las manecillas del reloj, se tienen las cepas <i>B. adusta</i> 8258; <i>B. adusta</i> 7308; <i>P. ostreatus</i> 7912; <i>P.</i>	

ostreatus 7992; *P. ostreatus* 7982; *T. trogii* 8154; al centro, control agar-vinaza 100% sin hongos 56

Figura 13. Cinética de crecimiento de las cepas *B. adusta* 7308, *P. ostreatus* 7992 y *T. trogii* 8154 en cajas Petri con medio agar-vinaza tequilera 100%.....57

Figura 14. Crecimiento de *B. adusta* 7308 en caja petri con medio agar-vinaza, después de 13 días de cultivo..... 57

Figura 15. Crecimiento de *P. ostreatus* 7992 en caja petri con medio agar-vinaza después de 13 días de cultivo 58

Figura 16. Crecimiento de *T. trogii* 8154 en caja petri con medio agar-vinaza después de 13 días de cultivo 58

Figura 17 A. Actividades de la lacasa de *P. ostreatus* 7992 y *T. trogii* 8154, durante 21 días de incubación (n=3)..... 59

Figura 17 B. Actividades de lip de *P. ostreatus* 7992 y *T. trogii* 8154, durante 21 días de incubación (n=3)..... 59

Figura 17 C. Actividades de la mnp de *P. ostreatus* 7992 y *T. trogii* 8154, durante 21 días de incubación (n=3). 60

Figura 18. Valores de DBO₅ (a) y DQO (b) expresados en mg/L en la vinaza cruda después de 21 días de biorremediación con hongos ligninolíticos (p>0.05, n=3)..... 61

Figura 19. Biorremediación a vinaza tequilera previamente tratada con alginato (VTA), dentro de la cámara controlada y en agitación orbital..... 63

Figura 20. Valores de DBO₅ (a) y DQO (b) expresados en mg/L en la vinaza tratada con alginato (VTA) y biorremediada con hongos ligninolíticos durante 21 días (p>0.05, n=3) 63

Figura 21. Aspecto de la vinaza después de 21 días de tratamiento con *T. trogii* 8154 (zquierda) y *P. ostreatus* (derecha), ambos en 75% de vinaza tratada con 3 g/L de alginato. 65

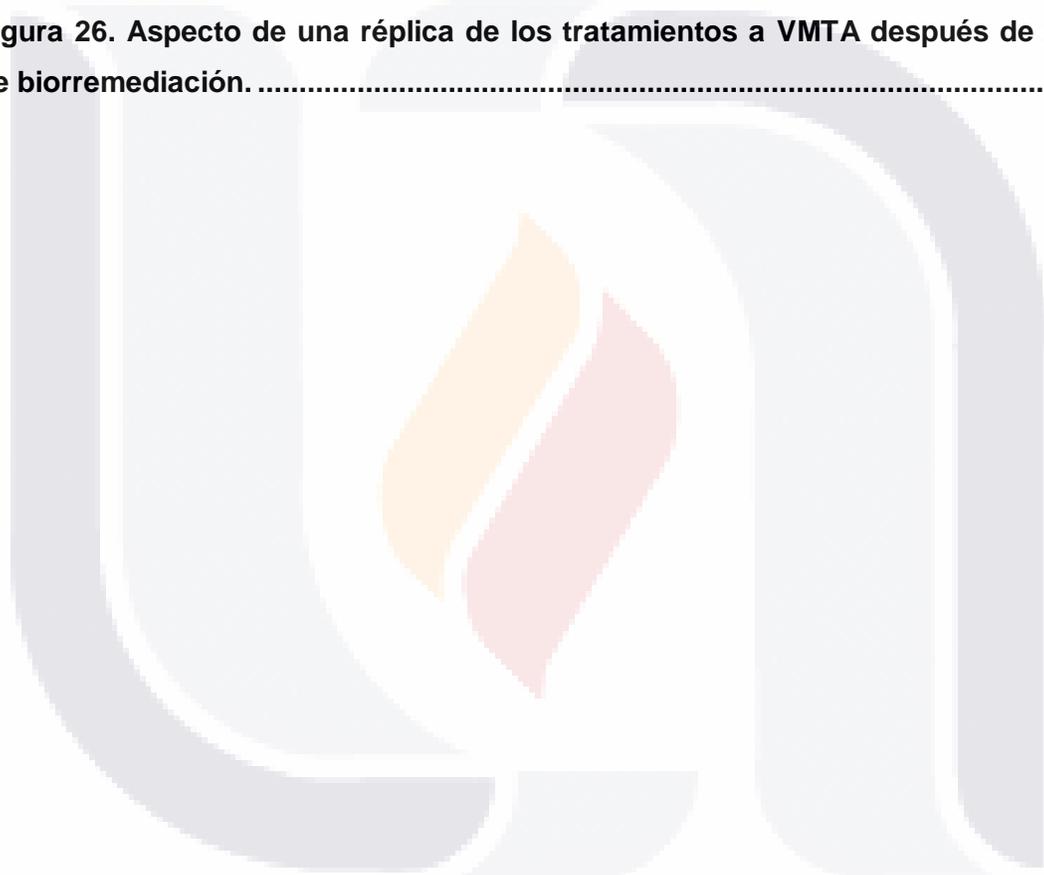
Figura 22. Cambios en los valores de DQO y DBO₅ expresados en mg/L, a través de los tratamientos fisicoquímico y de biorremediación, y la aplicación secuencial de ambos tratamientos 66

Figura 23. Valores de DBO₅ (a) y DQO (b) expresados en mg/L en la vinaza cruda después de 21 días de biorremediación con hongos ligninolíticos (p>0.05, n=3)..... 72

Figura 24. Valores de DBO₅ (a) y DQO (b) (mg/L) en la vinaza con tratamiento fisicoquímico y biorremediación con hongos ligninolíticos durante 21 días (p>0.05, n=3)... 73

Figura 25. Disminución de la DQO y DBO₅ (mg/L) con tratamiento fisicoquímico, biorremediación y ambos tratamientos aplicados en serie.. 74

Figura 26. Aspecto de una réplica de los tratamientos a VMTA después de 21 días de biorremediación. 74

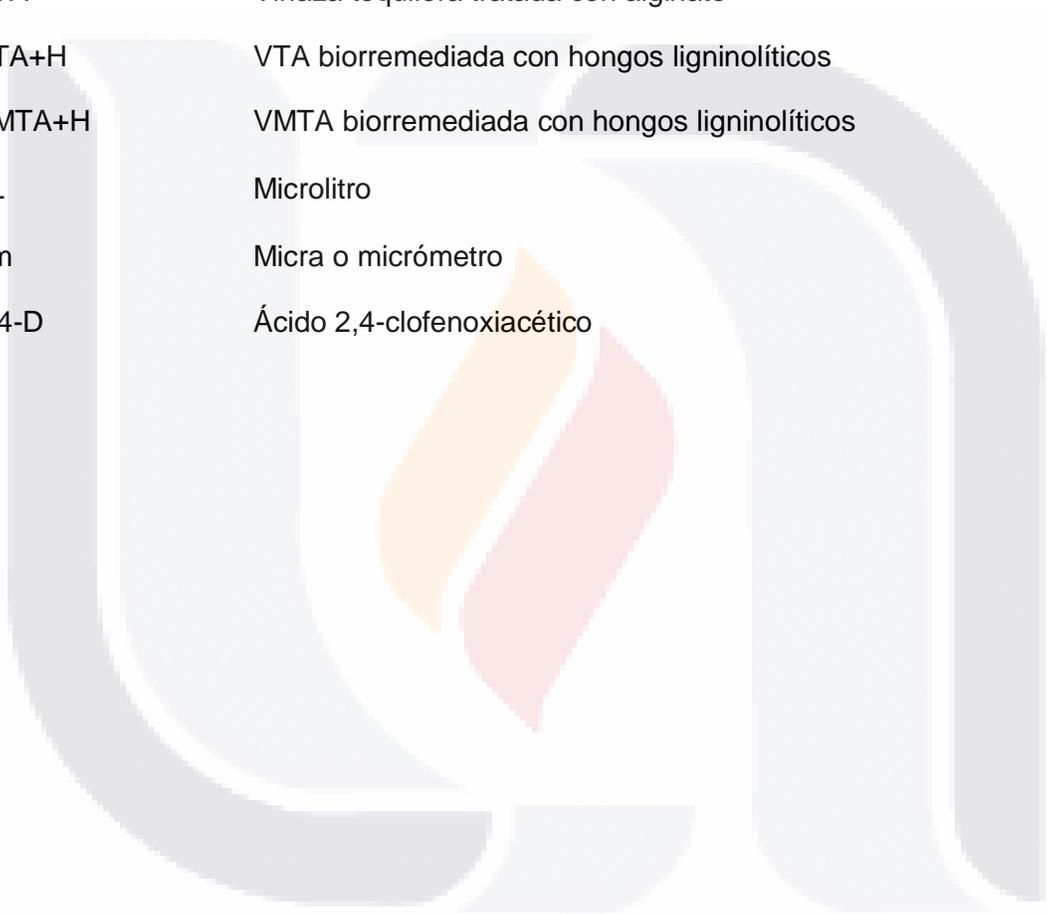


ACRÓNIMOS

AAO	Aril alcohol oxidasa
Alc. Vol.	Alcohol en Volumen
ANOVA	Analysis of variance (análisis de la varianza)
B1	Biorremediación de vinaza (75% en el caso de VC. 75% en el de VMC) con la cepa <i>P. ostreatus</i>
B2	Biorremediación de vinaza (50% en el caso de VC, 75% en el de VMC) con la cepa <i>T. trogii</i>
C50VC	Control de vinaza cruda al 50%
C75VC	Control de vinaza cruda al 75%
CIATEJ	Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.
cm	Centímetro
CNIT	Cámara Nacional de la Industria del Tequila
COMERCAM	Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal
CONAGUA	Comisión Nacional del Agua
CVMTA	Control con 100% de VMTA
CVMTA75%	Control con 75% de VMTA
DBO ₅	Demanda bioquímica de oxígeno a cinco días
DDT	1,1,1-tricloro-2,2-di (clorofenil) etano
DMS	Diferencia mínima significativa
DQO	Demanda química de oxígeno
DY54	Disperse Yellow 54 (colorante amarillo disperso 54)
FAD	Flotación por aire disuelto (en inglés DAF, dissolved air flotation)
g	Gramo
GLOX	Glioxal oxidasa

GMY	Glucose, malt, yeast extract (medio de glucosa, malta y extracto de levadura)
HL	Hongos ligninolíticos
kDa	Kilodaltones
L	Litro
LiP	Lignino peroxidasa
M	Moles
mg	Miligramo
mM	Milimolar
MnP	Manganeso peroxidasa
NADPH	Nicotinamida dinucleótido fosfato en su forma reducida
nm	Nanómetro
PDA	Medio de cultivo papa-dextrosa-agar
PAM	Poliacrilamida
pH	Potencial de hidrógeno
PHA's	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
pKa	Logaritmo negativo de la constante de disociación ácida
p/v	Relación peso/volumen
PROFEPA	Procuraduría Federal de Protección al Ambiente
RB5	Reactive black 5 (colorante negro reactivo 5)
rpm	Revoluciones por minuto
SECOFI	Secretaría de Comercio y Fomento Industrial
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
SS	Sólidos sedimentables
ST	Sólidos totales
TNT	Trinitrotolueno

UI	Unidades enzimáticas
VC	Vinaza tequilera cruda
VMC	Vinaza mezcalera cruda
VPs	Peroxidasas versátiles
VMTA	Vinaza mezcalera tratada con alginato
VTA	Vinaza tequilera tratada con alginato
VTA+H	VTA biorremediada con hongos ligninolíticos
VMTA+H	VMTA biorremediada con hongos ligninolíticos
μL	Microlitro
μm	Micra o micrómetro
2,4-D	Ácido 2,4-clofenoxiacético



RESUMEN

Desde hace muchos años, el hombre ha impactado negativamente el medio ambiente. La contaminación del agua por actividades industriales, genera aguas residuales que son vertidas a suelos, drenajes, ríos, arroyos, lagos y al mar, pueden contener alta concentración de materia orgánica como colorantes, compuestos orgánicos halogenados, detergentes, melanoidinas, lignina y sus derivados, metales, sales y ácidos; muchos de estos compuestos son recalcitrantes a los tratamientos biológicos convencionales y causan toxicidad a los seres vivos. En México las industrias tequilera y mezcalera producen efluentes altamente contaminantes denominados vinazas, que requieren tratamientos adecuados para evitar que impacten negativamente al ambiente, ya que por sus características, como pH de 3-4, elevado contenido de sólidos, alta demanda bioquímica de oxígeno y demanda química de oxígeno, y presencia de compuestos orgánicos recalcitrantes, suelen ser muy dañinas para los suelos y cuerpos de agua donde son vertidas.

El objetivo de este trabajo es proponer una alternativa de tratamiento para vinazas tequileras y mezcaleras, más eficiente y con potencial aplicación a nivel industrial, para que las descargas de este tipo de aguas residuales industriales cumplan con la regulación ambiental mexicana. Las vinazas tequileras y mezcaleras se caracterizan por su alto contenido de sólidos, elevados valores de demanda bioquímica de oxígeno (DBO_5) y de demanda química de oxígeno (DQO), bajo pH y un color café intenso; por lo que su descarga sin ningún tratamiento impacta severamente al ambiente. Tratamientos fisicoquímicos y biológicos, así como una combinación de ambos, fueron evaluados para depurar vinazas tequileras y mezcaleras. El uso de alginato de sodio para el tratamiento fisicoquímico de vinaza tequilera cruda, logró remover 37% de los sólidos totales, 70.6% y 14.2% de la DBO_5 y la DQO respectivamente, y 60.3% de fenoles. Se evaluó el crecimiento de veinte cepas de hongos ligninolíticos o de la podredumbre blanca de la madera, en un medio sólido con agar y vinaza tequilera. Se seleccionaron las cepas *Pleurotus ostreatus* 7992 y *Trametes trogii* 8154 por su capacidad de crecer en dicho medio. Se comprobó que en cultivos de ambas cepas de hongos en medio líquido, hubo producción de enzimas ligninolíticas. Con ambas cepas de hongos ligninolíticos para tratar vinaza tequilera cruda, se logró reducir la DBO_5 y la DQO en 88% y 89.7% respectivamente, y un 88.9% de fenoles con *T. trogii* 8154 y 89.2% con *P. ostreatus* 7992.

Con la aplicación secuencial del tratamiento fisicoquímico y el biológico, se logró remover un 93% de la DBO₅ y la DQO. Por otra parte, el tratamiento fisicoquímico de vinaza mezcalera cruda usando alginato, removió 42.4% de los sólidos totales, 18.43% de DBO₅, 40.7% de DQO y 56.9% de fenoles. La biorremediación de vinaza mezcalera cruda con *P. ostreatus* 7992 removió un 61.4% de la DBO₅, 67.3% de la DQO y 71.9% de fenoles; mientras que con *T. trogii* 8154 se logró remover 62.6% de la DBO₅, 67.9% de la DQO y 73.48% de fenoles. La aplicación secuencial de ambos tratamientos a vinaza mezcalera alcanzó remociones del 91.4% de la DBO₅, 80% de la DQO y 82.6% de fenoles al emplear a *P. ostreatus* 7992; y 92.5% de la DBO₅, 82.8% de la DQO y 85.1% de fenoles empleando a *T. trogii* 8154.

Los resultados demuestran que el alginato, las cepas *P. ostreatus* 7992 y *T. trogii* 8154 tienen potencial para el tratamiento de vinazas a escala industrial, aunque deben considerarse futuras investigaciones principalmente sobre el proceso de biorremediación con *P. ostreatus* 7992 y *T. trogii* 8154 en condiciones de aireación, el diseño de equipo para realizar estos tratamientos a escala piloto y un análisis de costo-beneficio para implementarlos a nivel industrial.

ABSTRACT

Industrial activities give rise to pollution in municipal sewage systems, soils and superficial waters. Industrial wastewaters causes adverse impacts to environment if no treatment is applied to them prior to its discharge because they may have high organic content, which include dyes, lignin, melanoidins, phenolic compounds; and also inorganic compounds such as acids, salts and metal ions. Some of these compounds are recalcitrant to conventional wastewater treatments and are toxic to cells. The wastewaters generated in alcohol distilleries are an example of this environmental issue. In Mexico, production of tequila 100% agave in 2011 was 155.3 million liters (40% Alc. Vol.), which generates approximately 1,130 million liters of liquid residue from fermented and distilled agave must known as vinasses. Mezcal vinasses are other very high pollutant liquid residues from mezcal distilleries.

The goal of this research is to find a more effective treatment for tequila and mezcal vinasses, with potential industrial application in order to comply with the Mexican environmental regulations. Tequila and mezcal vinasses are characterized by their high content of solids, high values of biochemical oxygen demand (BOD₅), chemical oxygen demand (COD), low pH and intense colour; thus, disposal of untreated vinasses severely impacts the environment. Physicochemical and biological treatments, and a combination of both, were probed on the remediation of tequila and mezcal vinasses. The use of alginate for the physicochemical treatment of raw tequila vinasses reduced BOD₅ and COD values 70.6% and 14.2% respectively, and 60.3% of phenols. Twenty white-rot fungi strains were tested in tequila vinasses-based solid media. *Pleurotus ostreatus* 7992 and *Trametes trogii* 8154 were selected due their ability to grow on tequila vinasses-based solid media. Ligninolytic enzymes production was observed in liquid cultures of both fungi. Using the selected white-rot fungi for raw tequila vinasses bioremediation, both COD and BOD₅ were reduced 88% and 89.7% respectively. Applying sequential physicochemical and biological treatments, BOD₅ and COD were reduced 93%, and 88.9% of phenols with *T. trogii* 8154 and 89.2% with *P. ostreatus* 7992. The physicochemical treatment of raw mezcal vinasse using alginate, removed 42.4% of total solids, 18.43% of BOD₅, 40.7% of COD and 56.9% of phenols. Bioremediation of raw mezcal vinasse with *P. ostreatus* 7992 removed 61.4% of BOD₅, 67.3% of COD and 71.9% of phenols; whereas *T. trogii* 8154 removed 62.6% of BOD₅, 67.9% of COD and 73.48% of phenols. Sequential application of both treatments to

mezcal vinasse reached removals of 91.4% of BOD₅, 80% of COD and 82.6% of phenols with *P. ostreatus* 7992; and 92.5% of BOD₅, 82.8% of COD and 85.1% of phenols with *T. trogii* 8154.

Results demonstrate that sodium alginate, *P. ostreatus* 7992 and *T. trogii* 8154 have potential for industrial treatment of TVs; nevertheless, for improve the treatments studied here it is necessary future research concerning mainly on aerated bioremediation process employing the strains *P. ostreatus* 7992 and *T. trogii* 8154, the design of equipment to carry out these treatments at pilot scale, and an analysis of cost-benefit for scale-up to industrial application.



INTRODUCCIÓN

Desde hace muchos años, el hombre ha impactado negativamente el medio ambiente en todos sus niveles. El agua ha sido uno de los recursos más afectados, y se ha convertido en una limitante para la sobrevivencia y la sostenibilidad. La contaminación del agua por actividades industriales, genera aguas residuales que son vertidas a drenajes, ríos, arroyos, lagos y al mar. Estos efluentes contaminados, dependiendo del proceso que los genera, pueden contener alta concentración de materia orgánica, la cual puede incluir: colorantes, compuestos orgánicos halogenados, detergentes, taninos, melanoidinas, lignina y sus compuestos derivados, así como elementos y compuestos inorgánicos como: metales, sales y ácidos; algunos de estos compuestos mencionados son recalcitrantes a los tratamientos biológicos convencionales y pueden causar toxicidad a los seres vivos. De no recibir un tratamiento adecuado, estas aguas residuales alteran negativamente la calidad de los cuerpos de agua y suelos donde son vertidos, impactando la vida acuática y terrestre, y reduciendo la disponibilidad de ambos recursos para un aprovechamiento sustentable (Ferreira et al. 2010, Rodríguez et al. 2003, García-García et al. 1997).

Entre las industrias que producen efluentes altamente contaminantes se encuentra la industria textil, cuyas aguas residuales contienen elevada concentración de materia orgánica que incluye colorantes y residuos de fibras textiles; la industria del papel, que genera aguas residuales con residuos de cloro y lignina; los rastros, que generan aguas residuales con presencia de sangre, grasas, residuos de piel y órganos; y la industria de las destilerías de alcohol y bebidas alcohólicas, que generan aguas residuales denominadas vinazas con abundante contenido de materia orgánica y compuestos coloreados (Ferreira et al. 2010, Rodríguez et al. 2003, García-García et al. 1997). Entre las destilerías, en México destaca la industria tequilera, con una demanda que actualmente está en crecimiento y que genera una gran cantidad de vinazas que requieren tratamientos adecuados para evitar que impacten negativamente al ambiente (López-López et al. 2010); y además la industria mezcalera, que también tiene una demanda en crecimiento y que en 2010 alcanzó la producción de 1'532,172 litros de mezcal certificado a granel (45% Alc. Vol.) (COMERCAM 2011).

El Tequila

El tequila es una bebida alcohólica destilada tradicional producida en una región de México que comprende el territorio del Estado de Jalisco y parte del territorio de los Estados de Michoacán, Nayarit, Guanajuato y Tamaulipas, la cual tiene la certificación de “**Denominación de Origen Tequila**”, reconocida en México y en el extranjero. Conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-004-SCFI-1994 (SECOFI 1994), el tequila es producido a partir de una sola variedad de agave, el *Agave tequilana* Weber variedad azul, planta originaria de México, que requiere de 7 a 10 años para madurar y estar lista para ser procesada. El tequila tiene una tradición de más de 200 años, y tuvo su origen probablemente desde la época prehispánica.

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-1994 (SECOFI 1994), el tequila se define como “bebida alcohólica regional obtenida por destilación y rectificación de mostos, preparados directa y originalmente del material extraído, dentro de las instalaciones de la fábrica, derivado de la molienda de las cabezas maduras previa o posteriormente hidrolizadas o cocidas, y sometidas a fermentación alcohólica con levaduras, cultivadas o no, siendo susceptible de ser enriquecido por otros azúcares hasta una proporción no mayor de un 49%, en la inteligencia de que no están permitidas las mezclas en frío. El tequila es un líquido que, de acuerdo a su tipo, es incoloro o amarillento cuando es madurado en recipientes de madera de roble o encino, o cuando se aboque sin madurarlo.

De esta Norma derivan entonces dos categorías de tequila que se producen en la zona de la Denominación de Origen, las cuales dependen del porcentaje de azúcares provenientes del agave que se emplean para su preparación, y son el **Tequila 100% de agave** y el **Tequila** (CRT 2004, SECOFI 1994).

El **Tequila 100% de agave** o **Tequila 100% puro de agave**, es el producto obtenido de la destilación y rectificación de mostos, preparados directa y originalmente del material extraído, dentro de las instalaciones de la fábrica, derivado de la molienda de las cabezas maduras previa o posteriormente hidrolizadas o cocidas, y sometidos a fermentación alcohólica con levaduras, cultivadas o no, y debe ser embotellado en la fábrica de origen del propio fabricante, la cual debe estar ubicada dentro del territorio de la Denominación de Origen (CRT 2004, SECOFI 1994).

Por otra parte, el **Tequila** es el producto obtenido de la destilación y rectificación de mostos, en cuya formulación se ha agregado una proporción hasta no mayor de 49% de azúcares reductores distintos a los de la molienda, dentro de las instalaciones de la fábrica, de las cabezas maduras previa o posteriormente hidrolizadas o cocidas, y sometidos a fermentación alcohólica con levaduras, cultivadas o no, en la inteligencia de que no están permitidas las mezclas en frío (CRT 2004, SECOFI 1994).

Actualmente la industria tequilera tiene gran importancia económica, ya que de la cadena de producción agave-tequila dependen más de 300,000 personas (CRT 2004).

Vinazas tequileras

Los procesos para la producción del tequila generan otros subproductos como el bagazo del agave y la **vinaza**, ésta última es el residuo líquido del mosto que ha sido fermentado y sometido al proceso de destilación. Las vinazas de la industria tequilera tienen características que las convierten en un agua residual compleja, con un contenido de materia orgánica muy alto y por ende muy contaminante. Una vinaza tequilera en general tiene las siguientes características: pH ácido (3.5 – 4), Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅) en un intervalo de 20,000 - 50,000 mg/L, Demanda Química de Oxígeno (DQO) en un intervalo de 40,000 - 80,000 mg/L, Sólidos Totales (ST) entre 35,000 – 50,000 mg/L, contiene fibras de agave, azúcares residuales, levaduras agotadas, ácidos, esterres, alcoholes superiores, altas concentraciones de sales de calcio, magnesio, fósforo y nitrógeno; gran cantidad de compuestos fenólicos, metales como: hierro, cobre y zinc; y son descargadas a temperaturas de alrededor de 90 °C (Carvajal-Zarrabal et al. 2013, López-López et al. 2010, Villa-Mejía et al. 2006, Meza Pérez et al. 1996). Se sabe que por cada litro de tequila producido, se generan 10 – 12 L de vinazas (López-López et al. 2010, Villa-Mejía et al. 2006).

Las vinazas del tequila son aguas residuales difíciles de biorremediar por los tratamientos biológicos convencionales, debido a la presencia de compuestos orgánicos recalcitrantes derivados de la lignina como compuestos poliaromáticos, compuestos fenólicos y polifenoles, así como taninos y ácidos húmicos (Edwards y Amirtharajah 1985, Narkis y Rebhun 1975), y tienen un color oscuro debido a la presencia de melanoidinas (Iñiguez-Covarrubias y Peraza-Luna 2007).

Panorama general de los tratamientos aplicados a las vinazas en la industria tequilera

Actualmente, las vinazas tequileras producidas en micro y pequeñas destilerías reciben únicamente un pretratamiento, el cual consiste en elevar el pH a ≥ 6 y bajar la temperatura a $< 40^{\circ}\text{C}$. En algunas destilerías pequeñas y medianas, el tratamiento de las vinazas tequileras incluye además el composteo de un 20% de las mismas, para enriquecer los suelos agrícolas. Estos dos sistemas de tratamiento no disminuyen la carga orgánica contenida en las vinazas. En otras destilerías que cuentan con espacio suficiente, se lleva a cabo un tratamiento consistente en elevar el pH a ≥ 6 y bajar la temperatura a $< 40^{\circ}\text{C}$, para después sedimentar las vinazas tequileras en una laguna de oxidación durante largos tiempos de retención. Este sistema elimina un 30% de la DBO_5 de las vinazas.

Recientemente, en dos destilerías medianas se tratan las vinazas tequileras integrando un sistema fisicoquímico de coagulación-floculación, un sistema biológico aerobio y un sistema avanzado de oxidación con ozono. Este tratamiento tiene eficiencia de 100% en la remoción de Sólidos Sedimentables (SS), un 85% en la remoción de materia orgánica como DBO_5 y DQO, además de remover también el color. Sin embargo, este tratamiento presenta la desventaja de tener un costo muy elevado (López-López et al. 2010).

En otras dos tequileras, se tiene implementado un sistema de tratamiento para las vinazas que integra una sedimentación para eliminar sólidos suspendidos, la neutralización del pH, un proceso biológico anaerobio de alta carga orgánica, seguida de una separación de sólidos mediante un sistema de flotación por aire disuelto (FAD, en inglés DAF, Dissolved Air Flotation) y finalmente un proceso biológico aerobio. Este sistema de tratamiento tiene una eficiencia de más del 90% en remoción de materia orgánica como DBO_5 , y 90% como DQO. Sin embargo, el efluente de este sistema aún presenta elevada coloración residual y también es de elevado costo (López-López et al. 2010).

Tratamientos fisicoquímicos que han sido evaluados para el tratamiento de vinazas tequileras

En investigaciones previas han sido evaluados distintos tratamientos fisicoquímicos para las vinazas tequileras. Meza-Pérez et al. (1996) emplearon a nivel laboratorio una

combinación de dos coagulantes, $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ y FeCl_3 (1.5 y 1.0 g/L respectivamente) a pH 6, para tratar el efluente de vinaza tequilera proveniente de un reactor anaeróbico, logrando remociones de 41% de la DQO y 82% del color. Linerio-Gil y Guzmán-Carrillo (2004) emplearon 5 mg/L de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ más 1.5 mg/L de un polímero comercial no especificado para un proceso de coagulación-floculación de vinazas tequileras, previamente sedimentadas. Este proceso logró remover 25% de la DQO. Íñiguez-Covarrubias y Peraza-Luna (2007) evaluaron en vinazas tequileras, a nivel piloto, un tratamiento de coagulación-floculación empleando poliacrilamida (PAM) un polímero catiónico; la vinaza tenía valores iniciales de ST de 21,883 mg/L y DQO de 43,541 mg/L. Adicionando a la vinaza 200 mg/L de PAM obtuvieron eficiencias de remoción de 25.6% de ST y 38.6% de la DQO.

La evaporación de vinazas es otra alternativa que ha sido estudiada y que actualmente está siendo aplicada a nivel industrial. Con este método, la vinaza es calentada en evaporadores de efecto múltiple (evaporadores en serie) para ser concentrada. La vinaza concentrada puede ser incinerada en calderas para producir vapor para el proceso de evaporación de más vinazas; otras alternativas de empleo son utilizarlas para producir composta junto con el bagazo de agave; como fertilizante líquido previamente diluido o como aditivo para alimentación animal. Este método reduce en más de 50% el volumen de las vinazas, pero requiere de una elevada inversión inicial.

La filtración de vinazas también ha sido estudiada y aplicada en las destilerías del sector vinícola. Pérez y Tello (2002) emplearon la filtración con la finalidad eliminar el color de la vinaza de vinícolas y para recuperar compuestos con valor agregado como polifenoles con actividad antioxidante, pigmentos como antocianinas, y proteínas. Utilizando en serie membranas de microfiltración con tamaño de poro de 1.2 a 0.2 μm , membranas de ultrafiltración con diámetro de poro de 50 – 20 nm, y membranas de nanofiltración con diámetro de poro de 5 kDa, lograron remover el 100% de los compuestos polifenólicos presentes, 85% del color, y 92.7% de la DQO, tomando en cuenta que las vinazas de la industria vinícola en general tienen una DQO de 14,000 mg/L en promedio.

Tratamientos biológicos que han sido evaluados para el tratamiento de vinazas tequileras

Se han empleado tratamientos biológicos en vinazas tequileras, como sistemas anaerobios, aerobios y una combinación en serie de éstos (López-López et al. 2010) como se comentó anteriormente. A nivel laboratorio, Méndez-Acosta et al. (2010) evaluaron el desempeño de un digestor anaerobio, el cual fue capaz de remover hasta 90-95 % de la materia orgánica expresada como DQO; además, este sistema generó biogás rico en metano. Este tipo de procesos anaerobios tienen ventajas técnicas y económicas sobre los procesos aerobios (López-López et al. 2010, Méndez-Acosta et al. 2010, Linerio-Gil y Guzmán-Carrillo 2004).

También se ha empleado la fitorremediación como tratamiento biológico para las vinazas, ya que es una tecnología de bajo costo para remover compuestos tóxicos incluyendo los metales pesados. Las plantas acuáticas tienen una excelente capacidad para reducir el nivel de metales tóxicos, DBO₅ y sólidos totales de las aguas residuales.

Los hongos son un grupo de organismos que también han sido utilizados para la degradación de la materia orgánica contenida en las vinazas, ya que son reconocidos por su aptitud para producir una gran variedad de proteínas extracelulares, ácidos orgánicos y otros metabolitos, y por su capacidad de adaptarse a distintos ambientes. Existen diversos reportes de cepas fúngicas que tienen la capacidad de biodegradar las vinazas. Entre esas cepas están *Aspergillus niger* (Miranda et al. 1996) y *A. fumigatus* (Ohmomo et al. 1987), las cuales han logrado una decoloración del 69-75% y una reducción de la DQO del 70-90%. También se han empleado hongos como *Penicillium* spp., y *P. decumbens* logrando una reducción del 50% en la DQO y color y 70% en la remoción de fenoles (Jiménez et al. 2003).

Por otra parte, a partir de la década de los 80's surgió la propuesta de utilizar a los hongos ligninolíticos como una alternativa para degradar compuestos coloreados en efluentes industriales y compuestos xenobióticos recalcitrantes (Rodríguez et al. 2003).

Madrigal et al. (2002) evaluaron vinazas tequileras como sustrato para crecimiento de dos cepas de los hongos ligninolíticos *Pleurotus ostreatus* y *Lentinula edodes*, empleando vinazas diluidas con agua destilada y combinadas con medio PDA (papa dextrosa agar) en cajas Petri, inoculadas con una de las dos cepas de cada hongo. Obtuvieron un

rendimiento promedio de biomasa de 14 y 10.2 mg/caja para las cepas de *P. ostreatus*, y de 2.8 y 2.6 mg/caja para las cepas de *L. edodes*.

Villa-Mejia et al. (2006) reportaron la producción de biomasa de las cepas *P. pulmonarius* y *P. colombinus*, empleando vinaza tequilera a 20, 60 y 100% de concentración, diluida con agua destilada, con un periodo de incubación de 45 días, obteniendo rendimientos de hasta 1.853 g y 1.348 g para *P. pulmonarius* y *P. colombinus* respectivamente, con muestras de 40 mL de vinaza al 100%.

Los hongos ligninolíticos destacan por su capacidad para degradar compuestos que otros microorganismos no pueden y que además en muchos casos les resultan tóxicos, como es el caso de los compuestos presentes en las vinazas. Por la importancia que tienen los hongos ligninolíticos y sus enzimas para aplicaciones biotecnológicas, en el **Capítulo 2** se aborda sobre ellos de forma específica.

El Mezcal

El mezcal es una bebida alcohólica destilada tradicional producida en una región de México que comprende el territorio de los Estados de Oaxaca, Guerrero, San Luis Potosí, Zacatecas, Durango y parte de los Estados de Guanajuato y Tamaulipas, la cual tiene la certificación de “**Denominación de Origen Mezcal**”, reconocida en México y también en el extranjero. El mezcal se obtiene principalmente a partir de cinco variedades de agave reconocidas por la Denominación de Origen y la Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994 (SECOFI 1997), las cuales son *Agave angustifolia* Haw, *Agave salmiana* Otto ex *salm SSP crassispina*, *Agave esperriima* Jacobi, *Agave potatorum* Zucc, *Agave weberi* Cela, y otras especies de agave siempre y cuando no sean utilizadas como materia prima para otras bebidas con denominación de origen dentro del mismo Estado, y que deben ser cultivados dentro del territorio de la denominación de origen. La industria mezcalera está incrementando su importancia económica en la actualidad, logrando en 2010 una exportación de 422,864 litros (55% Alc. Vol.) (COMERCAM, 2010).

Vinazas mezcaleras

La industria mezcalera genera de 8 a 15 litros de vinazas por cada litro de mezcal destilado, lo que suma aproximadamente 90 millones de litros de vinazas al año (Robles-González et al. 2012). Son aguas residuales que también tienen características que las hacen altamente contaminantes, contienen una gran variedad de materia orgánica que incluye ácido láctico, fenoles, polifenoles, melanoidinas, glicerolés así como materia inorgánica como sulfatos y fosfatos. Se ha establecido que la composición de las vinazas y sus características pueden variar, de acuerdo con la materia prima y el proceso empleado para la producción del destilado. Las vinazas mezcaleras en general se caracterizan por tener pH ácido (3.5 – 5); DBO₅ en un intervalo de 35,000 - 50,000 mg/L; DQO en un intervalo de 70,000 - 150,000 mg/L; contienen gran cantidad de sólidos disueltos, de los cuales hasta un 50% pueden ser azúcares reductores; poseen un color café oscuro debido a la presencia de melanoidinas (generadas por la reacción de Maillard) y suelen ser descargadas a temperaturas entre 50 – 80 °C (Robles-González et al. 2012). Además, son tóxicas para muchos microorganismos, característica que las convierte en residuos recalcitrantes a los tratamientos biológicos (Robles-González et al. 2012), por lo cual pueden ocasionar graves impactos ambientales negativos si son descargadas sin tratamiento previo. Este tema brinda un campo de oportunidades para la investigación de alternativas para el tratamiento de vinazas mezcaleras, que permitan su aprovechamiento o su descarga sin causar impactos negativos sobre el medio ambiente.

Panorama general de los tratamientos aplicados a las vinazas en la industria mezcalera

Existe escasa información disponible de los tratamientos aplicados en la actualidad a las vinazas mezcaleras, se sabe que la mayoría de estos residuos son descargados al suelo o composteados con el bagazo del agave y otros desechos agrícolas, y reincorporados a las tierras de cultivo o a las zonas donde crecen los agaves mezcaleros en forma silvestre.

Robles-González et al. (2010) reportó un proceso de ozonización seguido de un proceso biológico aerobio, para el tratamiento de vinaza mezcalera. Obtuvieron una remoción total en el tratamiento combinado de 87% de la DQO. Villalobos-Castillejos et al. (2009), realizaron la depuración de vinazas mezcaleras mediante un proceso anaerobio a nivel

matraz, en el que aplicaron una velocidad de carga orgánica de 952 mgO₂/L-día en el medio a tratar, el cual consistía de 10% de vinaza mezcalera (v/v) y 90% de agua residual sintética, y obtuvieron remociones de DQO de 80-82% a partir del día 40 hasta el día 100 del periodo de tratamiento.

Problemática ambiental generada por descargas de vinazas

Por cada litro de tequila o mezcal producido se generan en promedio de 8 a 15 litros de vinazas, lo cual genera una problemática ambiental si tenemos en cuenta que la producción de tequila en México en los últimos años ha tenido gran crecimiento, en 2013 fueron 211.4 millones de litros (40% Alc. Vol.) (CNIT 2013), lo que representa aproximadamente 2140 millones de litros de vinazas, mientras que la producción de vinazas mezcaleras es de alrededor de 90 millones de litros al año, a las que hay que agregar las producidas por las industrias del sotol, bacanora, ron y otros productos como el alcohol para uso farmacéutico que en total podrían sumar más de 4,000 millones de litros de vinazas al año, que en su gran mayoría no reciben un tratamiento adecuado previo a su descarga.

Las características fisicoquímicas de las vinazas es otro factor que contribuye a la grave problemática ambiental que genera su vertido, siendo un residuo altamente contaminante para el suelo, ya que por su pH ácido, le provocan acidificación, reducción de la actividad y diversidad de microorganismos benéficos para el suelo y esterilidad. Por otra parte la elevada carga orgánica presente en las vinazas resulta muy contaminante para los cuerpos de agua cuando son vertidas en ellos, lo cual genera deficiencias de oxígeno en el agua de dicho cuerpo receptor; además su intenso color oscuro bloquea en gran medida el paso de luz solar al medio acuático, reduciendo la tasa fotosintética y amenazando a la vida presente en dicho medio, contribuyendo a producir eutrofización de los cuerpos de agua.

En la actualidad, la industria tequilera descarga sus vinazas hacia arroyos, ríos, o al suelo en sus mismas tierras agrícolas, generando una fuerte problemática de contaminación de estos cuerpos receptores (López-López et al. 2010). La industria mezcalera, por su parte, descarga sus vinazas al suelo para fertirrigación y composteo. La problemática se debe a que las vinazas no reciben un tratamiento previo a su descarga o en el mejor de los casos el tratamiento que reciben no es el adecuado para lograr que las

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

vinazas descargadas por las destilerías cumplan con los límites máximos permisibles de los parámetros de calidad regulados en la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996 (SEMARNAT 1997) para descargas de agua residual vertidas a algún cuerpo receptor de competencia federal como ríos, arroyos, lagos, lagunas, mares y suelo. Para la DBO₅ esta norma establece un límite máximo permisible de 150 mg/L como promedio mensual para descargas a ríos cuyas aguas tienen uso en riego agrícola, y 75 mg/L para descargas a embalses naturales y artificiales cuyas aguas tienen uso en riego agrícola (SEMARNAT 1997). Cuando las vinazas son descargadas a un alcantarillado municipal, deben cumplir con los límites máximos de los parámetros estipulados en la NOM-002-SEMARNAT-1996 (SEMARNAT 1998), la cual para el caso de la DBO₅ se basa en los límites establecidos en la NOM-001-SEMARNAT-1996, o en las condiciones particulares de descarga que corresponde cumplir a la descarga municipal, o bien en las condiciones particulares de descarga que fije la autoridad competente (SEMARNAT 1998). En este sentido, de acuerdo a lo establecido en la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente (SEMARNAT 1988), la vigilancia, control y sanción de las descargas de agua residual vertidas a un cuerpo receptor de competencia federal corresponden a la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA) y la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA), correspondiendo estas atribuciones a las autoridades estatales y municipales cuando las descargas son vertidas a cuerpos receptores delegados a la competencia estatal y a alcantarillados municipales.

Las industrias tequilera y mezcalera deben lograr el tratamiento eficiente de las vinazas que generan y descargan, y aunque la calidad de las descargas de agua residual están reguladas a través de las Normas Oficiales Mexicanas NOM-001-SEMARNAT-1996 (SEMARNAT 1997) y NOM-002-SEMARNAT-1996 (SEMARNAT 1998), aún no se ha logrado que las descargas de vinazas cumplan con los requerimientos establecidos en dicha Normatividad. Al tratarse las vinazas pueden reutilizarse en calderas, lavado de patios, riego de áreas verdes y agrícolas, o para que sean vertidas conforme a la Norma Oficial Mexicana correspondiente de acuerdo al tipo de cuerpo receptor.

1. ALGINATOS

Los alginatos son polímeros orgánicos derivados del ácido algínico, producidos por algas pardas marinas (*Phaeophyceae*) (Li et al. 2007, Rodrigues y Lagoa 2006, FMC Biopolymer 2003) encontradas por todo el mundo. Los alginatos también son sintetizados por bacterias como *Pseudomonas aureginosa* y *Azotobacter vinelandii* como parte de sus procesos de infección y de enquistamiento, respectivamente (Rodrigues y Lagoa 2006, Gacesa 1998). Los alginatos fueron investigados a finales del Siglo XIX por el químico británico E.C. Stanford, aunque 50 años antes ya eran producidos comercialmente. Desde entonces, se ha descubierto bastante acerca de la versatilidad del alginato. Además del conocimiento de sus múltiples propiedades como espesante, estabilizante, formación de películas, y en especial su capacidad de gelificar, también se ha generado conocimiento acerca de cómo optimizar su obtención y los métodos de procesamiento para potenciar sus propiedades. Frecuentemente se emplean en gran variedad de productos cosméticos, tintas, fármacos, tabletas antirreflujo, y en geles odontológicos para hacer impresiones primarias.

1.1 Estructura química de los alginatos

El alginato de sodio es una sal del ácido algínico, es un polímero aniónico soluble en agua (FMC Biopolymer 2003, Tripathy et al. 2001), con una estructura lineal compuesta de dos tipos de bloques, denominados M y G (Figura 1) dos monómeros que son el ácido β -D-manurónico y el ácido α -L-gulurónico respectivamente, unidos por enlaces 1,4 (Donati y Paoletti 2009, Li et al. 2007, Díaz de Apodaca-Díaz et al. 2007, Rodrigues y Lagoa 2006, Navarro et al. 2004, FMC Biopolymer 2003, Draget 2000, Grant et al. 1973). La proporción, longitud y distribución de estos bloques estructurales determinan las propiedades químicas y físicas de las moléculas de alginato. Una mayor proporción de regiones G, le confiere a los alginatos mayor capacidad de gelificar, en tanto que mayores proporciones de regiones M y MG incrementan su flexibilidad (Figura 1).

Los alginatos se encuentran en las algas pardas principalmente en forma de sales de calcio, aunque también como sales de magnesio y sodio. Su composición química varía entre las especies de algas y la parte de las mismas de donde es extraído. Los alginatos

producidos por las bacterias *P. aureginosa* y *A. vinelandii* también tienen diferencias entre sí en su composición química, *P. aureginosa* produce alginato carente de regiones de poliguluronato, formando geles más flexibles. Por otra parte, *A. vinelandii* produce alginatos que contienen poliguluronato, lo que le confiere más resistencia estructural a la pared externa de sus quistes.

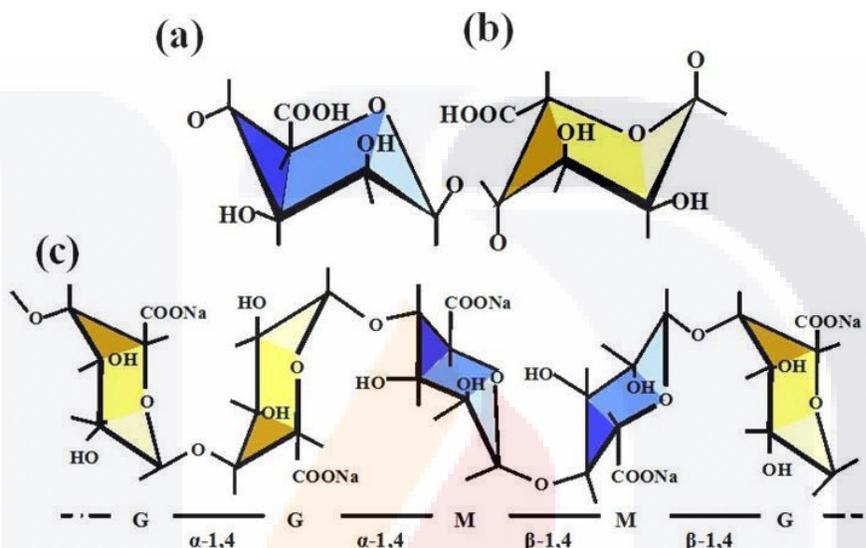


Figura 1. (a) Estructura del monómero de $\beta(1\rightarrow4)$ -D-manuronato; (b) Estructura del monómero de $\alpha(1\rightarrow4)$ -L-guluronato; (c) Fracción de la estructura de una cadena polimérica de alginato de sodio, conformada por la unión de monómeros de manuronato (M) y guluronato (G).

1.2 Formación de geles de alginato

La capacidad del alginato para formar geles es un área de gran oportunidad de estudio. Este potencial se manifiesta en el mecanismo mediante el cual se forma el gel. Los alginatos reaccionan con iones divalentes como el calcio y el magnesio, formando geles, mediante el mecanismo conocido como “modelo de caja de huevos” (Figura 2) (Donati y Paoletti 2009, Li et al. 2007, Díaz de Apodaca-Díaz et al. 2007, Rodrigues y Lagoa 2006, Navarro et al. 2004, FMC Biopolymer 2003, Draget 2000, Grant et al. 1973). Los iones divalentes son “atrapados” dentro de la geometría cóncava de las regiones de guluronato de la estructura del alginato (Navarro et al. 2004), produciendo moléculas diméricas y poliméricas de alginato que a su vez conforman un gel (Figura 2). Una vez formado dicho

gel, el agua y otras moléculas, quedan atrapadas físicamente dentro de la matriz del gel, por fuerzas capilares, aunque están libres para migrar por difusión dependiendo de su tamaño (FMC Biopolymer 2003). Esta propiedad hace al alginato ideal para múltiples aplicaciones, como un agente floculante y biosorbente para remover metales y pequeñas partículas sólidas de medios acuosos (Díaz de Apodaca-Díaz et al. 2007, Hashem y Elhmmali 2006, Navarro et al. 2004, Tripathy et al. 2001), para la encapsulación e inmovilización de células y productos de interés como enzimas (Sergio y Bustos 2009, Rodrigues y Lagoa 2006, FMC Biopolymer 2003), y la absorción de exudados de heridas con vendas con alginato entre otras (FMC Biopolymer 2003).

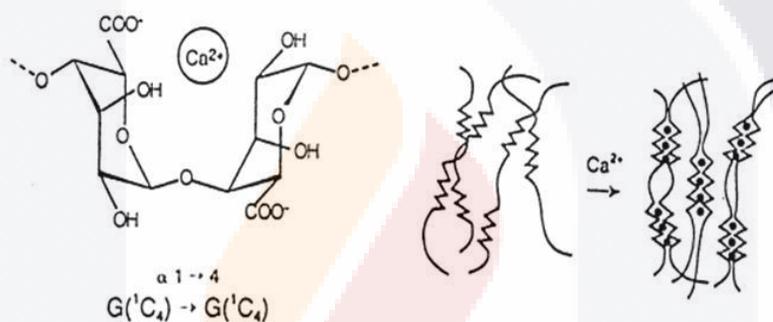


Figura 2. Modelo de la caja de huevos de la reacción del alginato con el Ca^{+2} , para formar un gel de alginato de calcio.

Otra propiedad de los alginatos es que son capaces de formar geles incluso en agua fría, sin necesidad de una etapa de calentamiento de la solución y su posterior enfriamiento para gelificar, como sucede con la mayoría de los demás biopolímeros que gelifican (Sergio y Bustos 2009, FMC Biopolymer 2003). En un sistema de gel de alginato, existen tres factores principales: el tipo de alginato, una sal de calcio y un agente secuestrante, los cuales controlan la estructura del sistema del gel y la velocidad a la que se forma. La hidratación y distribución uniforme del alginato son necesarias para que la formación del gel sea óptima (FMC Biopolymer 2003).

El valor de pH de una solución afecta la formación de geles de alginato (Donati y Paoletti 2009, Rodrigues y Lagoa 2006, FMC Biopolymer 2003, Draget 2000). El pK_a de las

unidades que conforman la estructura del alginato, es de 3.38 para el manuronato, y 3.65 para el guluronato (FMC Biopolymer 2003). Si el pH es igual o menor a 3.6, el alginato no gelifica bajo estas condiciones tan ácidas debido al pK_a del residuo guluronato, sin embargo, puede gelificar en condiciones ácidas en valores de pH superiores al pK_a del guluronato, así como en condiciones de pH neutro y alcalino.

Los iones divalentes del magnesio, fierro y cobre también reaccionan con el alginato para formar geles (Donati y Paoletti 2009, Díaz de Apodaca-Díaz et al. 2007, Rodrigues y Lagoa 2006, Draget 2000). Al estar presentes en una solución, reaccionan con el alginato cuando éste es agregado a la solución. Por ello es importante conocer si en la vinaza están presentes estos iones, de ser así, es necesario ligarlos a un compuesto secuestrante como citrato o fosfato, previo a la adición del alginato para evitar que gelifique antes de lo deseado (FMC Biopolymer 2003).

1.3 Métodos empleados para formación de geles de alginato

Para gelificar el alginato, existen dos métodos empleados con frecuencia, la solidificación por difusión y la solidificación interna. En el primer caso, una solución de alginato, o una mezcla que contenga alginato, a pH neutro, es gelificado al rociarla o introducirla en una solución de sal de calcio, básicamente el cloruro de calcio ($CaCl_2$). Los iones de calcio se difunden en la solución y reaccionan con las moléculas de alginato para formar un gel de alginato de calcio. Este método es adecuado para producir fibrillas, materiales pequeños o recubrimientos finos. Un ejemplo de su aplicación es la producción de fibras de alginato de calcio en vendajes para tratar heridas. En el método de gelificación interna, el calcio es agregado a la solución que contiene el alginato, bajo condiciones controladas. Este método emplea primero un secuestrante de iones divalentes que generalmente es citrato o fosfato, para ligar los iones divalentes libres en la solución a la cual en un segundo paso se le va a añadir y mezclar el alginato, finalmente se agrega una sal de calcio para que reaccione con el alginato y se forme el gel. Esta técnica es empleada en materiales para impresión dental (FMC Biopolymer 2003).

Lozano-Álvarez et al. (2009) evaluaron la capacidad de los biopolímeros xantana y alginato de sodio para remover de una solución acuosa el colorante amarillo disperso 54

(DY54). El sistema xantana-DY54 registró una remoción máxima de 96.9% del colorante a pH de 11.4, en tanto que el sistema alginato-DY54 alcanzó una remoción máxima de 83.9% del colorante a pH de 10.8, demostrando la capacidad de estos dos biopolímeros para remover colorantes dispersos en un medio acuoso.

En base a los resultados reportados por Lozano-Álvarez et al. (2009), se decidió evaluar en este trabajo el empleo del alginato de sodio para el tratamiento fisicoquímico de muestras de vinazas tequileras y mezcaleras, con el fin de remover la mayor cantidad posible de sólidos contenidos en ellas.



2. HONGOS LIGNINOLÍTICOS

Los hongos ligninolíticos o de la podredumbre blanca de la madera son un grupo de organismos ampliamente distribuidos en todo el mundo en ámbitos terrestres (Figura 3), incluyen especies pertenecientes a los Basidiomicetos, como *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Trametes trogii* y algunas especies pertenecientes a los Ascomicetos, como *Trichoderma reesei*. Son organismos heterótrofos (no realizan fotosíntesis) y se alimentan por absorción de nutrientes. Los hongos ligninolíticos poseen sistemas complejos de enzimas lignocelulolíticas que los hace capaces de degradar celulosa, hemicelulosa y lignina de la pared celular de las plantas. En 1976, ya se habían aislado más de 14,000 especies de hongos con esta capacidad, pero solo unas cuantas especies se estudiaron profundamente. En la naturaleza, la degradación eficiente de la lignina en el proceso de descomposición de la madera, es posible gracias a los hongos de la podredumbre blanca de la madera.



Figura 3. Hongos ligninolíticos localizados en los bosques de los Estados de Chiapas (izquierda) y Aguascalientes (derecha), México (Fotos por José Luis Retes Pruneda 2010).

El sistema enzimático ligninolítico extracelular no específico que poseen los hongos ligninolíticos es capaz de romper gran variedad de enlaces y de degradar una amplia gama de compuestos orgánicos (Hamman 2004, Rodríguez et al. 2003, Pointing 2001). Estos hongos producen oxidasas y peroxidasas extracelulares, enzimas productoras de peróxidos, celulasas y hemicelulasas, las cuales participan en la degradación de lignina,

celulosa y hemicelulosa respectivamente, y gran variedad de compuestos fenólicos y no fenólicos como los contenidos en las vinazas. Entre los géneros de hongos ligninolíticos más estudiados están *Bjerkandera*, *Phanerochaete*, *Pleurotus* y *Trametes*, los cuales han sido identificados con mayor potencial para el tratamiento de contaminantes (Hamman 2004).

En distintas investigaciones se ha encontrado evidencia de la capacidad de los hongos ligninolíticos para transformar y mineralizar compuestos orgánicos contaminantes con estructuras semejantes a la de la lignina. Entre estos compuestos se encuentran pesticidas organofosforados como el paration y el malation (Dávila y Vázquez-Duhalt 2006, Jáuregui et al. 2003), pesticidas organoclorados como el 1,1,1-tricloro-2,2-di (clorofenil) etano (DDT), el lindano y el ácido 2,4-clofenoxiacético (2,4-D) (Dávila y Vázquez-Duhalt 2006, Hamman 2004, Pointing 2001, Kirk et al. 1990); residuos de municiones como el trinitrotolueno (TNT) y la nitroglicerina (Pointing 2001); bifenilos policlorados (Dávila y Vázquez-Duhalt 2006, Kirk et al. 1990), hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH's por sus siglas en inglés) (Dávila y Vázquez-Duhalt 2006, Hamman 2004, Pointing 2001, Márquez-Rocha et al. 2000, Kirk et al. 1990), colorantes sintéticos azo (Faraco et al. 2009, Dias et al. 2003, Yesilada et al. 2002, Abadulla et al. 2000, Heinfling et al. 1997), preservadores de maderas (Pointing 2001), polímeros sintéticos como plásticos (Pointing 2001) y colorantes naturales como melanoidinas (Rodríguez et al. 2003).

2.1 Enzimas producidas por hongos ligninolíticos

Los hongos ligninolíticos secretan enzimas que degradan la lignina, denominadas en conjunto ligninasas, las cuales pueden ser clasificadas como fenol oxidasas (lacasas) o hemo peroxidasas (lignino peroxidasa o LiP, manganeso peroxidasa o MnP, y peroxidasas versátiles o VP). Las lacasas utilizan oxígeno molecular como aceptor de electrones, mientras que la hemo peroxidasas utilizan el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como co-sustrato. Los hongos ligninolíticos secretan una o más de estas enzimas en conjunto con otros compuestos necesarios para la degradación de la lignina (Figura 4).

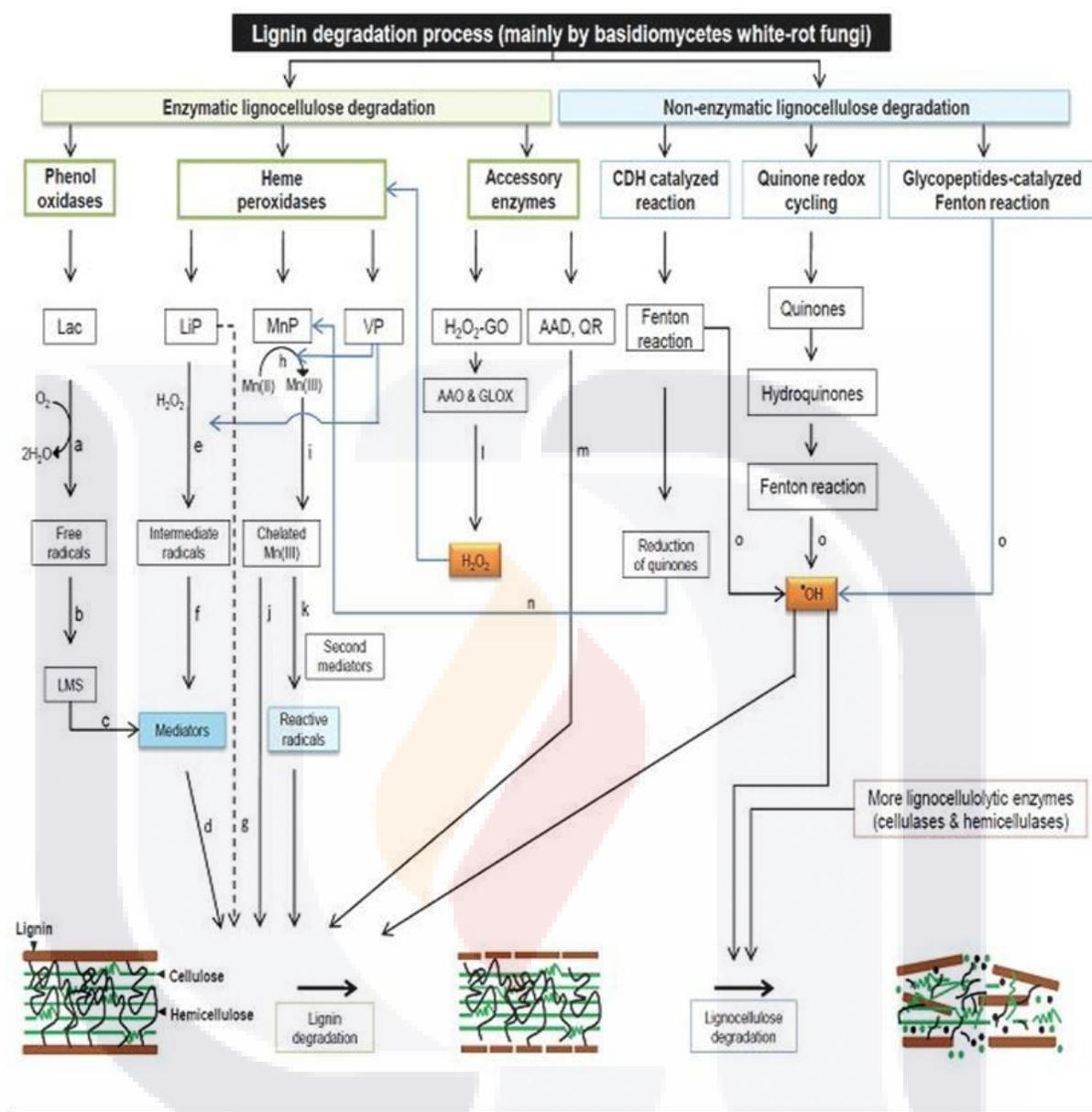


Figura 4. Procesos de degradación de lignina realizados por hongos ligninolíticos. Tomado de Dashtban et al. (2010).

Existen especies de hongos ligninolíticos que también producen celulasas y hemicelulasas, las cuales son enzimas hidrolíticas con las que degradan otros dos importantes componentes de la pared de las células vegetales: la celulosa y la hemicelulosa. La celulosa es el biopolímero más abundante sobre la Tierra. La hemicelulosa es uno de los biopolímeros más abundantes conocidos. Las celulasas

comprenden endoglucanasas y celobiohidrolasas, las primeras actúan en zonas endógenas de la celulosa y las segundas en zonas exógenas, y actúan de forma sinérgica, depolimerizándola hasta obtener los monómeros de pentosa y hexosa que la componen.

La proporción en la degradación de lignina-hemicelulosa-celulosa puede diferir en gran medida entre las especies de hongos y aún entre cepas de la misma especie. Las condiciones fisiológicas y los patrones de excreción de enzimas ligninolíticas, también difiere entre especies de hongos.

Además, los hongos ligninolíticos poseen el sistema enzimático citocromo P450, el cual es un sistema intracelular implicado en la degradación oxidativa de pesticidas organofosforados, en una reacción dependiente de NADPH. Esta degradación reduce la toxicidad de este grupo de pesticidas (Jáuregui et al. 2003).

2.1.1 Lignino peroxidasa

Las lignino peroxidasas [1,2-bis (3,4-dimetoxifenil) propano-1,3 diol:peróxido de hidrógeno oxidorreductasas, EC 1.11.1.14] fueron descubiertas en 1983 en *Phanerochaete chrysosporium*, y posteriormente fueron encontradas en otros hongos de la podredumbre blanca, como *Trametes versicolor*. Son glicoproteínas que contienen el grupo hemo y desempeñan una función central en la biodegradación de la lignina, componente de la pared celular vegetal. La lignino peroxidasa (LiP) cataliza la depolimerización oxidativa, dependiente del H₂O₂, de una variedad de compuestos no fenólicos de la lignina, como el diarilpropano, compuestos β-O-4 no fenólicos derivados de lignina, así como una amplia gama de compuestos fenólicos como el guayacol, el catecol y el ácido siríngico. La LiP oxida los sustratos mediante transferencias de electrones para formar radicales intermediarios, como radicales fenoxilos, los cuales realizan reacciones no enzimáticas para romper cadenas poliméricas, acoplamiento de radicales y polimerizaciones, demetilaciones y rearrreglos (Figura 4). A diferencia de otras peroxidasas como la MnP, la LiP es capaz de oxidar sustratos aromáticos no fenólicos sin requerir la participación de mediadores (Figura 4), debido a su alto potencial redox (Dashtban et al. 2010, Tien y Kirk 1988).

2.1.2 Manganese peroxidasa

Las manganese peroxidasas (Mn II: peróxido de hidrógeno oxidoreductasas, EC 1.11.1.13) son glicoproteínas extracelulares que contienen un grupo hemo. Fueron descubiertas en 1985 en *P. chrysosporium* y desde entonces han sido encontradas en otros Basidiomicetos como por ejemplo *Agaricus bisporus*. La manganese peroxidasa (MnP) cataliza la reducción dependiente de H_2O_2 , del Mn II (sustrato reductor) a Mn III, el cual es liberado de la superficie de la enzima en forma de complejo quelado con oxalato o malonato, ácidos orgánicos queladores secretados por los hongos ligninolíticos (Wariishi et al. 1992). Este complejo quelado de Mn III funciona como un mediador redox de sustratos fenólicos, que incluyen al mismo fenol, colorantes, aminas, subestructuras de la lignina, y dímeros. Para la oxidación de sustratos no fenólicos por el Mn III, primero deben formarse radicales reactivos en presencia de un segundo mediador (Figura 4), como radicales del ácido acético y radicales peróxidos. En ausencia de H_2O_2 , estos radicales pueden ser utilizados por el Mn III como fuente de peróxidos y así incrementar la eficiencia del hongo en la degradación de lignina (Figura 4) (Dashtban et al. 2010).

2.1.3 Lacasa

Las lacasas (bencenodiol:oxígeno oxidoreductasas, EC 1.10.3.2) son oxidoreductasas glicosiladas multicobre azules (Rodríguez-Rincón 2006), que usan el oxígeno molecular como aceptor de electrones para oxidar diversos compuestos aromáticos y no aromáticos a través de un mecanismo de reacción catalizado por radicales libres. Acoplan la reducción electrónica del oxígeno molecular a dos moléculas de agua (Figura 4), con la oxidación de una gran variedad de sustratos, como fenoles, arilaminas, anilinas, tioles y ligninas. Las reacciones de oxidación catalizadas por lacasas llevan a la formación de radicales libres que actúan como sustratos intermedios para la enzima, pero que también pueden abandonarla y catalizar sustratos de alto potencial redox, creando así rutas no enzimáticas de reacciones de polimerización oxidativa o depolimerización (Figura 4) (Dashtban et al. 2010). La lacasa es la principal enzima involucrada en la degradación de lignina. Fue descrita por primera vez en 1883, siendo una de las primeras enzimas conocidas. Suele ser más estable a pH de 5 – 6, y a temperaturas de hasta 45 °C (Hamman 2004).

2.1.4 Peroxidasas versátiles

Las peroxidasas versátiles, VPs, (EC 1.11.1.16) son glicoproteínas con propiedades híbridas, capaces de oxidar los sustratos típicos de otras peroxidasas de los Basidiomicetos, lo que las hace superiores a la LiP y a la MnP, pues oxidan con mayor eficiencia compuestos fenólicos en ausencia de alcohol veratrílico (VA) o de Mn II. Se ha encontrado que oxidan en forma eficiente compuestos con alto potencial redox como el colorante Negro reactivo 5 (RB5) así como una amplia variedad de fenoles, incluyendo hidroquinonas. Se ha sugerido que las VPs pueden oxidar compuestos de un amplio rango de potenciales redox, tanto altos como bajos, y esto es resultado de sus estructuras moleculares híbridas que proporcionan múltiples sitios de ligamiento para los sustratos. La VPs fueron descubiertas en 1999 en miembros del género *Pleurotus*, como *P. ostreatus*, y posteriormente han sido encontradas en más Basidiomicetos (Figura 4) (Dashtban et al. 2010).

2.1.5 Otras enzimas que participan en la degradación de lignina

Además de ligninasas, existen otras enzimas fúngicas extracelulares que actúan como enzimas accesorias involucradas en la degradación de lignina. Estas incluyen oxidasas generadoras de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual es proveído a las peroxidasas que lo requieren para activarse y cumplir sus funciones; también incluyen deshidrogenasas asociadas al micelio, que reducen compuestos derivados de lignina (Figura 4). Entre las oxidasas que generan H_2O_2 se encuentran la aril alcohol oxidasa (AAO), (EC 1.1.3.7), y la glioxal oxidasa (GLOX) (Dashtban et al. 2010).

2.2 Estudios previos de biorremediación de vinazas con hongos ligninolíticos

Además de los estudios mencionados en la **Introducción** respecto al empleo de hongos ligninolíticos para tratar vinazas tequileras, existen otros estudios realizados para tratar vinazas de otros orígenes. Rodríguez et al. (2003) evaluaron la decoloración de efluentes industriales provenientes de destilerías de alcohol de caña (vinaza) y del extracto líquido de la pulpa de café, empleando la cepa *Pleurotus spp.*, logrando eliminar el 39% del color en la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

vinaza de destilería y 44% en el extracto de pulpa de café. La remoción de la carga orgánica expresada como DQO fue de 55% en ambos efluentes.

Strong (2010) realizó un estudio para el tratamiento con hongos a vinazas de destilerías de la bebida alcohólica denominada Crema de Amarulla. Empleó las cepas *Trametes pubescens* MB 89, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Picnoporus cinnabarinus* y *Phanerochaete chrysosporium*, para biorremediar vinaza cruda (DQO inicial de 27,000 mg/L) a pH 5, durante 14 días a 28°C, sin adición de nutrientes, logrando eficiencias de remoción de DQO de 35-74%. Empleando a *Trametes pubescens* MB 89 para tratar seis concentraciones de vinazas (10, 20, 40, 60, 80 y 100%) diluidas con agua destilada, a pH 4.5, y las mismas condiciones del experimento anterior, logró eficiencias de remoción de DQO de 71-77% en las distintas concentraciones, y el color disminuyó entre 8-27% en las muestras con concentraciones de vinaza por debajo del 60%.

Ferreira et al. (2010) seleccionaron al hongo *Pleurotus sajor-caju* CCB020 para decolorar vinaza de caña de azúcar, logrando hasta 98% de decoloración en experimentos con vinaza sin diluir, durante un periodo de tratamiento de 15 días. Ensayos para determinar la actividad de lacasas y manganeso peroxidasas durante este periodo, demostraron que el hongo tuvo elevada producción de estas enzimas directamente involucradas en la degradación de compuestos coloreados presentes en las vinazas. La producción de hongos ligninolíticos empleando como medio de cultivo un residuo abundante y barato como la vinaza puede ser de gran utilidad para la obtención de enzimas que tienen diversas aplicaciones biotecnológicas. Ferreira et al. (2010) también observaron que *Pleurotus sajor-caju* CCB020 desarrolló una gran cantidad de biomasa en la vinaza sin diluir, lo que puede ser enfocado a la producción de alimento animal.

De esta manera, el tratamiento con hongos ligninolíticos se visualiza como una alternativa interesante, pues estos organismos han demostrado su capacidad de biodegradar los compuestos recalcitrantes presentes en las vinazas. En la medida que se realicen trabajos de investigación que aporten soluciones a esta problemática ambiental, las empresas productoras de tequila y mezcal podrán incorporar nuevas tecnologías que les permitan subsanar este pasivo ambiental que han tenido por muchos años.

Este trabajo se enfocó a evaluar la biorremediación de vinazas de la industria tequilera y mezcalera mediante un sistema que combina un tratamiento fisicoquímico aplicando

alginato y una biorremediación empleando hongos ligninolíticos para degradar la materia orgánica contenida en las vinazas, así como también evaluar ambos tratamientos por separado, y proponer así una alternativa de tratamiento con potencial aplicación a nivel industrial para reducir la contaminación generada por las descargas de vinazas.



3. HIPÓTESIS

A nivel laboratorio, la aplicación de un tratamiento fisicoquímico permitirá reducir los altos niveles de materia orgánica presentes en vinazas de la industria tequilera y mezcalera, para lograr efluentes más adecuados para ser biorremediados con cepas de hongos ligninolíticos, y remover así la mayor cantidad posible de contaminantes presentes en las vinazas.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar, a nivel laboratorio, la remoción de materia orgánica de vinazas tequileras y mezcaleras mediante tratamiento fisicoquímico y biológico, por separado y en serie para reducir la carga contaminante que presentan.

4.2 Objetivos particulares

- 1.- Aplicar a las vinazas tequilera y mezcalera un tratamiento fisicoquímico para remoción de sólidos suspendidos, fenoles, DBO₅ y DQO empleando alginato de sodio.
- 2.- Identificar al menos dos cepas de hongos ligninolíticos capaces de biodegradar la materia orgánica presente en las vinazas tequilera y mezcalera, para emplearlas en un tratamiento de biorremediación.
- 3.- Ensayar ambos tratamientos en forma separada y en serie, para reducir la DBO₅, DQO, sólidos suspendidos y el contenido de fenoles de las vinazas tequilera y mezcalera.

5. METODOLOGÍA

5.1. Obtención de vinazas.

5.1.1 Vinaza tequilera

La vinaza sin ningún tratamiento previo fue proporcionada por el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ), la cual provenía de la destilación de Tequila 100% Agave. Se recibieron 50 L de vinaza y se mantuvo en refrigeración a 4°C, separando 20 L para los ensayos.

5.1.2 Vinaza mezcalera

La vinaza mezcalera fue proporcionada por la empresa Real de Magueyes S.A. de C.V., cuya planta destiladora se encuentra en la comunidad de Laguna Seca, Municipio de Charcas, San Luis Potosí; en donde se recogió una muestra de 50 L. Esta vinaza provino de la destilación de mezcal 100% de *Agave salmiana*, cultivado en la región del altiplano potosino, y no tenía ningún tipo de tratamiento ni ajuste de pH. Se mantuvo en refrigeración a 4°C.

5.2 Caracterización fisicoquímica de vinazas tequilera y mezcalera.

La caracterización fisicoquímica de ambas vinazas es necesaria para conocer su calidad como efluente, para ello se determinaron los valores que presentan en parámetros fisicoquímicos de calidad de aguas residuales, que se encuentran estipulados en las normas oficiales mexicanas NOM-001-SEMARNAT-1996 y NOM-002-SEMARNAT-1996, como la DBO₅ y los ST, además de la DQO y el contenido de fenoles, siendo el punto de partida para determinar los porcentajes de remoción de DBO₅, DQO, ST y contenido de fenoles obtenidos con los tratamientos aplicados a las vinazas. Las determinaciones se

realizaron en base a las normas mexicanas NMX-AA-028-SCFI-2001, NMX-AA-030-SCFI-2001, NMX-AA-034-SCFI-2001 y NMX-AA-050-SCFI-2001/9.3, respectivamente.

5.3 Tratamiento fisicoquímico a vinazas usando alginato de sodio

Se aplicó un tratamiento fisicoquímico a ambas vinazas, tequilera y mezcalera, realizando experimentos implementados de acuerdo a un diseño experimental de 2 factores con 2 niveles (2^2), estableciendo como factores al alginato de sodio (con niveles de 0.5 y 3 g/L) y el pH (con niveles de 5 y 9). Estos niveles se consideraron tomando en cuenta el intervalo en que han sido estudiados otros coagulantes y floculantes, y cómo se emplean industrialmente. Similar criterio se tomó para los niveles de pH, considerando que el alginato es capaz de gelificar en el intervalo de pH de 5 a 12. Las respuestas a evaluar fueron la cantidad de sólidos removidos (g/L), remoción de DBO_5 (medido como % removido con respecto a la DBO_5 original de la vinaza), y la remoción de DQO (% removido con respecto a la DQO original de la vinaza). Los experimentos se realizaron por duplicado siguiendo los pasos que a continuación se describen:

1. Se tomó una alícuota de 2 L de vinaza para todos los experimentos.
2. En base al contenido de calcio de la vinaza, se calculó la cantidad de citrato de sodio requerida por litro de vinaza para secuestrar el calcio contenido en la misma, con el fin de solubilizar el alginato de sodio en la vinaza.
3. La vinaza sin diluir se dividió en 18 muestras de 100 mL cada una para las dos repeticiones de acuerdo al diseño experimental 2^2 , incluyendo cinco muestras por repetición para un punto central entre los valores de alginato a probar. Se les ajustó el pH al valor correspondiente conforme al diseño experimental, se añadió el citrato de sodio, y se volvió a ajustar el pH (Figura 5).
4. Se preparó una solución madre de alginato de sodio con una concentración de 15 g/L. Se adicionó a las muestras de vinaza la cantidad de alginato correspondiente conforme a los tratamientos del diseño experimental, agitando durante 3 minutos a 200 rpm (Figura 6).
5. Se adicionó a cada muestra 10 mL de CaCl_2 al 10%, agitando por 1 minuto.
6. Las muestras se dejaron reposar por 5 minutos, se filtraron al vacío empleando papel filtro previamente llevado a peso constante.

7. Los sólidos separados fueron secados a 105°C hasta peso constante.
8. Al filtrado (vinaza tequilera tratada con alginato, VTA; vinaza mezcalera tratada con alginato, VMTA) se le determinaron DBO₅ y DQO.



Figura 5. Ajuste del pH de la vinaza mezcalera previo al tratamiento con alginato para remoción de sólidos.



Figura 6. Agitación para mezclar el alginato en vinaza mezcalera previo a su gelificación.

5.4 Determinación de la DBO₅

Se realizó en base a la técnica que estipula la norma mexicana NMX-AA-028-SCFI-2001 Análisis de Agua. Determinación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno en Aguas Naturales, Residuales y Residuales Tratadas. Método de Prueba, descrita en el Anexo B.

5.5 Determinación de la DQO

Se realizó conforme a la técnica de refluo cerrado de la norma mexicana NMX-AA-030-SCFI-2001 Análisis de Agua. Determinación de la Demanda Química de Oxígeno en Aguas Naturales, Residuales y Residuales Tratadas. Método de Prueba, que está descrita en el Anexo C.

5.6 Determinación de sólidos totales

Se realizó en base a la técnica especificada en la norma mexicana NMX-AA-034-SCFI-2001 Análisis de Agua. Determinación de Sólidos y Sales Disueltas en Aguas Naturales, Residuales y Residuales Tratadas. Método de Prueba, descrita en el Anexo D.

5.7 Análisis estadístico de los datos

A los datos obtenidos experimentalmente se les realizó un análisis factorial de varianza (ANOVA por sus siglas en inglés), seguido de la prueba de diferencia mínima significativa (DMS ó LSD por sus siglas en inglés) (Montgomery 2002) empleando el software Statgraphics Centurion XVI (Statpoint Technologies Inc. 2011).

5.8 Evaluación de la capacidad de crecimiento de 20 cepas de hongos ligninolíticos en un medio compuesto de vinaza tequilera y agar

En esta parte del estudio se evaluó la capacidad de crecimiento de 20 cepas de hongos ligninolíticos (HL) sobre vinaza tequilera, las cepas fueron *Bjerkandera adusta* UAMH 8258, *B. adusta* UAMH 7308, *Corioloopsis gallica* UAMH 8269, *Ganoderma applanatum* UAMH 8168, *Phanerochaete chrysosporium* UAMH 3641, *P. chrysosporium* UAMH 3642, *P. chrysosporium* UAMH 4521, *P. chrysosporium* ATCC 24725, *Pleurotus chiapas*, *P. ostreatus* UAMH 7964, *P. ostreatus* UAMH 7972, *P. ostreatus* UAMH 7982, *P. ostreatus* UAMH 7992, *Sporotricum pulvulentum*, *Trametes hirsuta*, *T. hispida*, *T. trogii* UAMH 8154, *T. versicolor*, *T. versicolor* UAMH 8272 y *T. zonatus*. Los cultivos se realizaron en un medio semisólido estéril compuesto de vinaza al 100% y agar (20 g/L), pH 5.5, vertido en cajas Petri. Una vez solidificados y bajo condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar, estos medios fueron inoculados con un fragmento de medio cultivo (previamente

realizados en medio PDA) de 1 x 1 cm de una cepa de HL (una caja por cepa), y se incubaron a 28°C durante 12 días. Se evaluó diariamente la velocidad de crecimiento radial en cm/día de los cultivos, el crecimiento total y el cambio en el color del medio, con respecto a un medio control de vinaza-agar sin inóculo de hongos. Este experimento se realizó por triplicado.

5.9 Determinación de actividad enzimática ligninolítica de las cepas *P. ostreatus* 7992 y *T. trogii* 8154

Las actividades enzimáticas de la lacasa, la lignino peroxidasa y la manganoso peroxidasa fueron monitoreadas en cultivos de *P. ostreatus* 7992 y *T. trogii* 8154. Matraces Erlenmeyer conteniendo 100 mL de un medio compuesto por 75% de vinaza tequilera sin esterilizar y 25% de agua destilada, a pH 5.5, fueron inoculados con 10 g de pellets (peso fresco) de *P. ostreatus* 7992 ó *T. trogii* 8154. Los medios fueron incubados durante 21 días dentro de una cámara controlada a 28±2°C en obscuridad y rotación orbital de 120 rpm. Se tomaron alícuotas de cada matraz cada 3 días, las cuales se centrifugaron a 28700 rpm durante 10 minutos para obtener el sobrenadante de cada alícuota, en el cual se determinó la actividad de cada una de las tres enzimas mediante espectrofotometría, realizándose por triplicado.

La actividad de la lacasa fue determinada monitoreando la oxidación de la siringaldazina. Se empleó una mezcla de reacción compuesta de 1400 µL de buffer de acetatos 100 mM, pH 5, 100 µL de siringaldazina 0.80 mM en metanol, y 500 µL de extracto del cultivo. El blanco fue compuesto de 1900 µL de buffer de acetatos 100 mM, y 100 µL de siringaldazina 0.80 mM en metanol. La lectura de absorbancia de las muestras en el espectrofotómetro se realizó a una longitud de onda de 525 nm (Leonowicz y Grzywnowicz 1981).

Para determinar la actividad de la lignino peroxidasa se monitoreó la oxidación del alcohol veratrílico. Se utilizó una mezcla de reacción compuesta de 1200 µL de buffer de succinatos 40 mM, pH 4, 200 µL de alcohol veratrílico 40 mM en metanol, 100 µL de H₂O₂ al 0.03%, y 500 µL de extracto del cultivo. El blanco fue compuesto de 1700 µL de buffer de succinatos 40 mM, 200 µL de alcohol veratrílico 40 mM en metanol, y 100 µL de H₂O₂

al 0.03%. Se determinó la absorbancia de las muestras en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 310 nm (Tien y Kirk 1990).

La actividad de la manganeso peroxidasa se determinó siguiendo la oxidación del Mn^{+2} a Mn^{+3} (formación del complejo malonato- Mn^{+3}). Se empleó una mezcla de reacción compuesta de 1432 μ L de buffer de malonatos 50 mM, pH 4.5, con $MnSO_4$ 1 mM, 68 μ L de H_2O_2 al 0.01%, y 500 μ L de extracto del cultivo. El blanco fue preparado con 1700 μ L de buffer de malonatos 50 mM, pH 4.5, con $MnSO_4$ 1 mM, y 68 μ L de H_2O_2 al 0.01%. Se determinó la absorbancia de las muestras en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 270 nm (Giardina et al. 2000, Wariishi et al. 1992).

Todos los ensayos enzimáticos fueron realizados durante 1 minuto de reacción a una temperatura de 30°C. Las unidades de actividad enzimática por litro (UI/L) se definieron como la cantidad de enzima que oxida 1 μ mol de sustrato por minuto, por litro de extracto, bajo las condiciones en que se realizaron las determinaciones. Su cálculo se realizó de la siguiente manera:

Empleando la ecuación $A = \epsilon bC$,

Donde:

A, absorbancia (datos obtenidos con las lecturas en el espectrofotómetro)

ϵ , absortividad molar del sustrato de la enzima (65,000 $M^{-1} cm^{-1}$ para la siringaldazina; 9300 $M^{-1} cm^{-1}$ para el alcohol veratrílico y 11590 $M^{-1} cm^{-1}$ para el complejo malonato- Mn^{+3}).

b, diámetro de la celda (1 cm).

C, concentración del producto de la reacción enzimática (expresado en μ mol /mL, mol / L).

Despejando C, tenemos que $C = A / \epsilon b$, y de esta manera es posible calcular las unidades de actividad enzimática que se tienen en las muestras.

5.10 Biorremediación de vinaza cruda empleando hongos ligninolíticos

Se realizó el tratamiento de biorremediación a ambos tipos de vinazas, sin tratamiento fisicoquímico previo. A la vinaza cruda (VC en vinaza tequilera, VMC en vinaza mezcalera) se le ajustó el pH a 5.5, y se empleó un diseño experimental tipo factorial 2^3 , tres factores con dos niveles, siendo los factores la cepa de hongo empleada, la concentración del inóculo y la concentración de la vinaza cruda. Los niveles son las cepas *P. ostreatus* 7992 y *T. trogii* 8154, 5 y 10 % de inóculo (p/v) (10 y 15 % para el caso de la vinaza mezcalera), y 50 y 75% de vinaza cruda sin esterilizar, respectivamente. Los medios de cultivo fueron aforados con agua destilada sin esterilizarlos. Las respuestas a evaluar fueron las remociones de DBO_5 y de DQO de la vinaza. Los experimentos fueron realizados por triplicado en matraces con 100 mL de medio de cultivo, se incubaron en cámara controlada durante 21 días a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ con agitación orbital a 120 rpm. Al finalizar el periodo de cultivo, se tomaron las alícuotas de cada tratamiento para determinar los valores de DBO_5 y DQO, para lo cual previamente fueron centrifugadas a 17000 rpm durante 10 minutos y se empleó el sobrenadante para las determinaciones.

5.11 Aplicación secuencial del tratamiento fisicoquímico y de biorremediación a vinaza

La vinaza tratada con alginato (VTA en el caso de la vinaza tequilera y VMTA para la mezcalera) se sometió a un tratamiento de biorremediación usando las 2 cepas de HL previamente seleccionadas para tal fin. Se empleó un diseño experimental factorial 2^3 , tres factores con dos niveles, siendo los factores la cepa de hongo empleada para la biorremediación, el peso del inóculo y la concentración de la vinaza en el medio de cultivo. Los niveles son las cepas *P. ostreatus* 7992 y *T. trogii* 8154, 5 y 10 % de inóculo (p/v), y las concentraciones de 50 y 75% de vinaza en el medio de cultivo. Las respuestas a evaluar fueron la remoción de DBO_5 y DQO de la vinaza. Los experimentos fueron realizados por triplicado. Se aplicó el mismo procedimiento para VTA y VMTA, como se describe en el siguiente apartado.

5.11.1 Preparación de inóculos

1. Se tomaron fragmentos de los cultivos en cajas Petri con medio vinaza-agar de *P. ostreatus* 7992 y *T. trogii* 8154, de aproximadamente 1 cm x 1 cm.
2. El fragmento de cultivo de cada cepa, fue colocado separadamente en homogeneizadores omni mixer de 50 mL de capacidad, a cada una se le adicionaron 30 mL de medio líquido de glucosa-peptona de carne-extracto de levadura (GMY por sus siglas en inglés, glucose-meat-yeast extract) pH 5.5, estéril, se homogenizaron durante 1 minuto para obtener una suspensión de micelio fúngico. Cada cepa fue depositada por separado en matraces de 250 mL conteniendo otros 70 mL de medio líquido GMY estéril, para un total de 100 mL de GMY inoculado. Los matraces se taparon con hisopos de manta de cielo y algodón. Todo el procedimiento se realizó en campana de flujo laminar (Figura 7).
3. Los medios inoculados fueron puestos en la cámara de cultivo a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, en oscuridad, con agitación orbital a 120 rpm durante 7 días.



Figura 7. Preparación de inóculos de hongos ligninolíticos en medio líquido GMY para biorremediar vinaza tequilera.

5.11.2 Preparación de medios de cultivo para los experimentos

1. Se tomó una alícuota de 500 mL de VTA / VMTA sin esterilizar, y de acuerdo al diseño experimental, se dividió en 8 matraces de 250 mL, 4 conteniendo 75 mL de

VTA / VMTA y 4 conteniendo 50 mL de VTA / VMTA, y todos fueron aforados a 100 mL con agua destilada sin esterilizar. Los medios con VTA / VMTA fueron preparados por triplicado para realizar los experimentos de biorremediación.

2. Estos medios fueron ajustados a pH 5.5, no se esterilizaron, quedando listos para su inoculación.

5.11.3 Inoculación de los medios de cultivo

1. Los inóculos previamente preparados como se describió en el apartado 5.11.1 fueron filtrados por separado y lavados con agua destilada estéril, los pellets obtenidos de cada cepa se dividieron en porciones de 5 g de biomasa (5% p/v) y 10 g (10% p/v) para inocular la VTA. Para el caso de la VMTA, se dividieron en porciones de 10 g (10% p/v) y 15 g (15% p/v) (Figura 8).



Figura 8. Cultivo de pellets de *T. troglia* 8154 listos para ser inoculados a vinazas.

2. Las porciones de biomasa fueron colocadas en licuadoras metálicas de 50 mL, a cada una se le adicionaron 30 mL del medio con el porcentaje de VTA / VMTA que correspondiera de acuerdo al diseño experimental (Figura 9) y en forma aleatoria. Se licuaron durante 1 minuto para obtener la suspensión fúngica, y cada cepa fue depositada en matraces de 250 mL conteniendo los restantes 70 mL del medio con VTA / VMTA correspondiente, para un total de 100 mL de medio inoculado por

matraz. Los matraces se taparon con hisopos de manta de cielo y algodón. Todo el procedimiento fue realizado en campana de flujo laminar.

3. Los medios inoculados (Figura 10) fueron colocados en la cámara de cultivo a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, en oscuridad, con agitación orbital a 120 rpm durante 21 días.
4. Al término del periodo de cultivo, los matraces se retiraron de la cámara y se dejaron reposar 1 hora. Se tomaron alícuotas de 1.5 mL de cada matraz para realizar las determinaciones de DQO y DBO_5 en la VTA y VMTA biorremediada con hongos ligninolíticos (VTA+H, en el caso de la vinaza tequilera, VMTA+H para vinaza mezcalera) como se indicó en los apartados 5.4 y 5.5 respectivamente. El análisis estadístico se realizó como se indicó en el apartado 5.7.



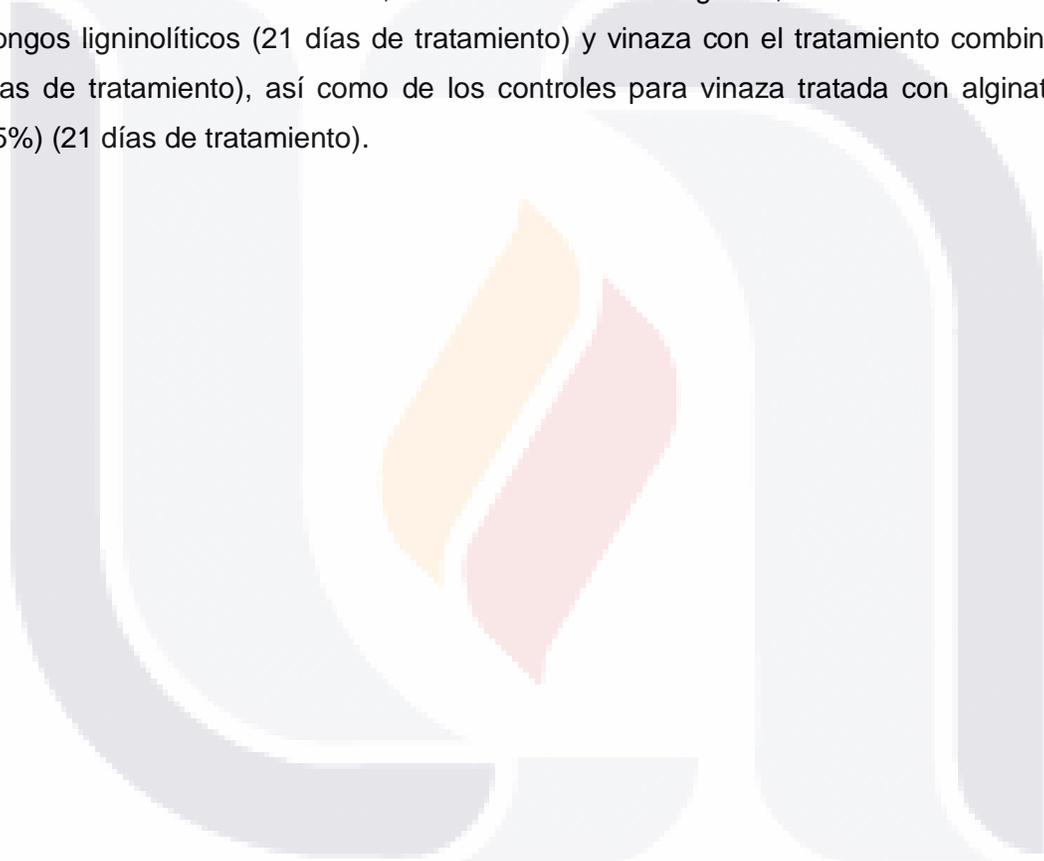
Figura 9. Matraces con medios de cultivo de acuerdo al diseño experimental 2^3 , previo a su inoculación con hongos para biorremediación de vinaza mezcalera tratada con alginato.



Figura 10. Matraces con medios de cultivo de acuerdo al diseño experimental 2^3 , inoculados para biorremediación de vinaza mezcalera tratada con alginato.

5.12 Determinación de la concentración de fenoles en muestras de vinaza cruda y después de los diferentes tratamientos

Se realizó para ambos tipos de vinaza, por medio del método directo espectrofotométrico de la norma mexicana NMX-AA-050-SCFI-2001 (**Anexo E**), utilizando una curva patrón de **fenol** en concentraciones de 1, 2, 3, 5, 10, 15 y 20 µg/mL (muestras estándar), obtenida mediante lecturas de absorbancia de estas muestras a una longitud de onda de 510 nm. Posteriormente, se realizaron las lecturas de absorbancia a 510 nm de las diluciones de las muestras de vinaza cruda, vinaza tratada con alginato, vinaza biorremediada con hongos ligninolíticos (21 días de tratamiento) y vinaza con el tratamiento combinado (21 días de tratamiento), así como de los controles para vinaza tratada con alginato (50 y 75%) (21 días de tratamiento).



6. RESULTADOS

6.1 Caracterización fisicoquímica de la vinaza tequilera

La caracterización de la vinaza tequilera fue realizada en las instalaciones del CIATEJ, la Tabla 1 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 1. Caracterización de la vinaza tequilera (CIATEJ 2009).

Determinación	Resultado
Calcio	226.0 ppm
Magnesio	104.0 ppm
Potasio	233.0 ppm
Cobre	2.16 ppm
Zinc	<0.05 ppm
Fierro	14,1 ppm
Níquel	<0.02 ppm
Alcalinidad total	<0.01 mg/L como CaCO ₃
Acidez total	0.52 mg/L como CaCO ₃
Azúcares reductores totales	3.00 % en peso
pH	3.92 U.P.
Demanda bioquímica de oxígeno total	32 875.2 mg/L
Demanda química de oxígeno total	57 531.6 mg/L
Sólidos totales	62 145.5 mg/L
Sólidos suspendidos totales	8 324.0 mg/L
Sólidos disueltos totales	53 817.5 mg/L
Sólidos sedimentables	450.0 mg/L
Fosfatos totales	33.72 mg/L
Nitrógeno amoniacal	2.8 mg/L
Nitrógeno orgánico	7.0 mg/L
Nitrógeno total	9.8 mg/L

En la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA) se realizaron determinaciones iniciales de DBO₅, DQO (método de reflujo cerrado) y ST, ya que todas las determinaciones posteriores de estos parámetros fueron realizadas en la misma UAA. Los resultados fueron una **DBO₅ de 82,000 mg/L**, una **DQO de 100,000 mg/L** y **62.10 g/L de ST**. El parámetro DQO fue determinado en el CIATEJ por el método de reflujo abierto, el resultado corresponde al presentado en la Tabla 1.

6.2 Tratamiento fisicoquímico a vinaza tequilera cruda

Una vez desarrollados los experimentos de acuerdo al diseño experimental factorial 2², los resultados obtenidos (Tabla 2) para las respuestas evaluadas mostraron diferencias significativas entre los tratamientos.

Tabla 2. Resultados del tratamiento fisicoquímico a vinaza tequilera (n=2).

Alginato g/L	pH	^a Sólidos removidos g/100 mL	% Sólidos removidos	^b DBO ₅ mg/L	% DBO ₅ removida ± SD	^c DQO mg/L	% DQO removida ± SD
0.5	5	1.345	21.64 ± 0.40	29529.5	63.99 ± 1.86	96900	3.10 ± 0.10
0.5	9	1.680	27.03 ± 3.21	31044.0	62.15 ± 2.47	95350	4.65 ± 2.05
3.0	5	1.635	26.30 ± 1.04	26499.5	67.69 ± 1.83	88600	11.40 ± 1.40
3.0	9	2.100	33.80 ± 2.65	24286.5	70.38 ± 0.41	84050	15.95 ± 1.35
^d 1.75	^d 7	1.640	26.38 ± 1.99	24936.0	69.59 ± 1.56	85526	14.74 ± 2.33

^a Valores de sólidos removidos una vez sustraída la cantidad de alginato añadida.

^b DBO₅ inicial de la vinaza cruda = 82000 mg/L

^c DQO inicial de la vinaza cruda = 100000 mg/L

^d Valores de alginato y pH en el punto medio de su respectivo límite inferior y superior

De acuerdo al análisis de varianza de los datos, tanto el pH como la concentración del alginato tuvieron efecto significativo ($p < 0.05$) sobre la remoción de sólidos. Las interacciones entre las variables experimentales no tuvieron efecto significativo ($p < 0.05$) sobre la remoción de sólidos. La temperatura y la concentración de sólidos también influyen la solubilidad y viscosidad de soluciones acuosas de alginato (FMC Biopolimer 2003, Draget 2000). En este sentido, se estandarizó una temperatura de 25°C para todas las muestras experimentales. El análisis estadístico muestra que la concentración de alginato tiene efecto significativo ($p < 0.05$) sobre la remoción de DBO₅, la cual se incrementa si la eficiencia de remoción de sólidos también incrementa. El pH no tuvo efecto significativo ($p < 0.05$) sobre la remoción de DBO₅. Las interacciones entre las variables experimentales tampoco tuvieron efecto significativo ($p < 0.05$) sobre la remoción de DBO₅. Por otra parte el análisis estadístico mostró que la concentración de alginato tuvo efecto

significativo ($p < 0.05$) sobre la remoción de DQO, aunque los valores de DQO en la vinaza tratada con alginato permanecieron elevados después de dicho tratamiento, debido a la presencia de grandes cantidades de contaminantes recalcitrantes que permanecieron en solución. El pH no tuvo efecto significativo ($p < 0.05$) sobre la remoción de DQO, aunque se observó que a un pH alcalino se incrementó la remoción de DQO y de DBO_5 . Como se presenta en la Tabla 2, los mejores resultados en el tratamiento fisicoquímico fueron obtenidos añadiendo **3 g/L** de alginato a vinaza a **pH 9**, alcanzando una remoción del 33.8% de los sólidos, 16% de la DQO y 70.4% de la DBO_5 de la vinaza. En la Figura 11 se muestra el aspecto del gel de alginato con los sólidos removidos y parcialmente secos, resultante de un tratamiento a vinaza con 3 g/L de alginato a pH 9.



Figura 11. Sólidos removidos con el tratamiento fisicoquímico a vinaza tequilera.

Los resultados demuestran que los efectos significativos sobre la remoción de sólidos fueron debido a: (a) el pH alcalino que permite mejorar la solubilidad del alginato para potenciar la interacción con los iones de calcio que se añaden posteriormente y optimizar la formación del gel. Además, el pH alcalino también incrementa la carga negativa en las moléculas de alginato favoreciendo la interacción con los sólidos; y (b) la concentración de alginato, que al aumentarla, incrementa el número de moléculas disponibles para interactuar con los iones de calcio para formar el gel, reduciendo el tamaño de los poros del gel y favoreciendo que mayores cantidades de sólidos sean atrapados y retenidos de acuerdo a su tamaño de molécula y a las fuerzas capilares (FMC Biopolimer 2003).

6.3 Evaluación de la capacidad de crecimiento de 20 cepas de hongos ligninolíticos en un medio compuesto de vinaza tequilera y agar

Este experimento para determinar cuáles cepas son capaces de desarrollarse en un medio como la vinaza tequilera sin diluir y solidificada con agar, tuvo resultados distintos entre las 20 cepas evaluadas (Tabla 3), en función de la superficie que cada cepa cubrió con el desarrollo de su micelio sobre el medio en la caja Petri y la decoloración realizada en dicho medio (Figura 12).

Tabla 3. Crecimiento y decoloración del medio de cultivo de 20 cepas de hongos ligninolíticos en medio vinaza-agar, después de 6 semanas de cultivo.

Cepa	% de crecimiento en la caja Petri	Decoloración del medio (% del área de la caja)
<i>Bjerkandera adusta</i> UAMH 8258	100	< 50
<i>B. adusta</i> UAMH 7308	100	50
<i>Pleurotus chiapas</i>	-	-
<i>P. ostreatus</i> UAMH 7964	-	-
<i>P. ostreatus</i> UAMH 7972	100	< 50
<i>P. ostreatus</i> UAMH 7992	100	100
<i>P. ostreatus</i> UAMH 7982	100	< 50
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> UAMH 3641	40	< 50
<i>P. chrysosporium</i> UAMH 3642	-	-
<i>P. chrysosporium</i> UAMH 4521	20	-
<i>P. chrysosporium</i> ATCC 24725	20	-
<i>Trametes versicolor</i> UAMH 8272	-	-
<i>T. versicolor</i>	-	-
<i>Coriolopsis gallica</i> UAMH 8260	25	< 50
<i>Ganoderma applanatum</i>	-	-
<i>Sporotricum pulvulentum</i>	20	-
<i>Trametes hispida</i>	-	-
<i>T. zonatus</i>	10	-
<i>T. hirsuta</i>	-	-
<i>T. trogii</i> UAMH 8154	100	100



Figura 12. Decoloración de medio semisólido agar-vinaza 100%, después de 4 semanas de cultivo con hongos ligninolíticos. En el sentido de las manecillas del reloj, se tienen las cepas *B. adusta* 8258; *B. adusta* 7308; *P. ostreatus* 7912; *P. ostreatus* 7992; *P. ostreatus* 7982; *T. trogii* 8154; al centro, control agar-vinaza 100% sin hongos.

Después de 21 días de cultivo, se observó que 8 cepas de HL no crecieron en el medio ensayado (Tabla 3). Otras cepas tuvieron un crecimiento moderado, cubriendo menos del 50% de la superficie de la caja Petri, y seis cepas tuvieron un buen desarrollo cubriendo el 100% de la superficie de la caja (Tabla 3). Por otra parte, el grado de decoloración que las cepas realizaron al medio de cultivo también fue muy distinto entre las cepas evaluadas, la mayoría no decoloró el medio (Tabla 3), en tanto que *Bjerkandera adusta* 7308, *Pleurotus ostreatus* 7992 y *Trametes trogii* 8154, decoloraron el 50% o hasta el 100% del medio de cultivo (Tabla 3), por lo que este fue otro factor determinante para la selección de las cepas.

A partir de estos resultados, se seleccionaron las cepas *Bjerkandera adusta* 7308, *Pleurotus ostreatus* 7992 y *Trametes trogii* 8154 para un ensayo de cinética de crecimiento (Figura 13) y decoloración en medio compuesto de vinaza tequilera 100% + agar (20 g/L), en el que se colectaron diariamente los datos del diámetro radial del micelio durante 13 días.

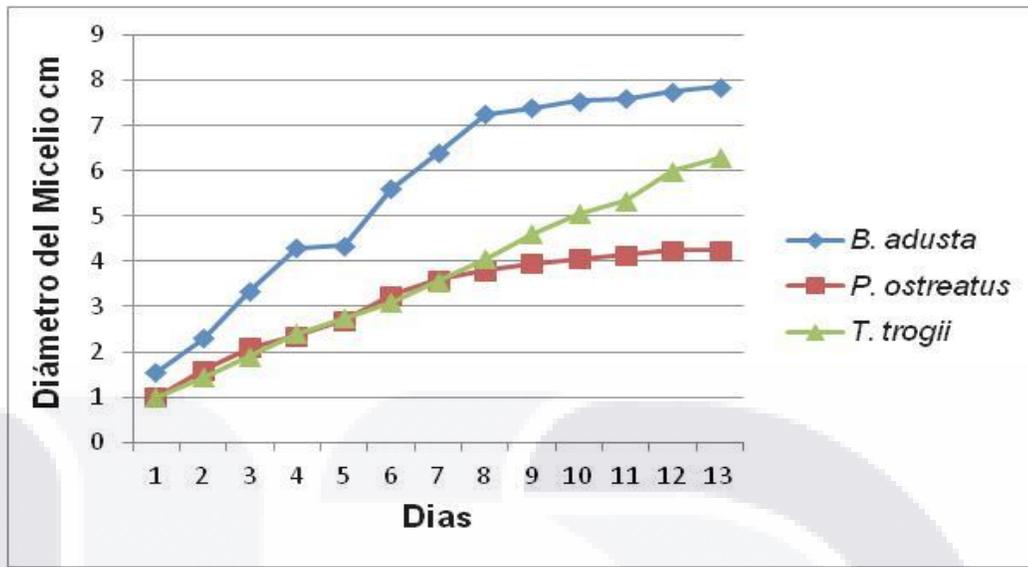


Figura 13. Cinética de crecimiento de *Bjerkandera adusta* 7308, *Pleurotus ostreatus* 7992 y *Trametes trogii* 8154 en cajas Petri con medio agar-vinaza tequilera 100%.

La velocidad de crecimiento fue de 0.50 cm²/día para *B. adusta* (Figura 14) 0.34 cm²/día para *P. ostreatus* (Figura 15) y 0.19 cm²/día para *T. trogii* (Figura 16). La decoloración fue mayor con *T. trogii* > *P. ostreatus* > *B. adusta*. Aunque las tres cepas son potencialmente capaces de biodegradar las vinazas tequileras, con fundamento en este último resultado, se seleccionó a *Pleurotus ostreatus* 7992 y *Trametes trogii* 8154 para los experimentos de biorremediación de vinazas.



Figura 14. Crecimiento de *B. adusta* 7308 en caja Petri con medio agar-vinaza, después de 13 días de cultivo.



Figura 15. Crecimiento de *P. ostreatus* 7992 en caja Petri con medio agar-vinaza, después de 13 días de cultivo.



Figura 16. Crecimiento de *T. trogii* 8154 en caja Petri con medio agar-vinaza, después de 13 días de cultivo.

6.4 Determinación de actividad enzimática ligninolítica de las cepas *P. ostreatus* 7992 y *T. trogii* 8154 en vinaza (medio líquido)

En estos experimentos se obtuvieron diferentes perfiles enzimáticos entre *P. ostreatus* 7992 y *T. trogii* 8154 (Figura 17 A, B, C), mostrando que bajo las condiciones en que se realizaron los experimentos, ambas cepas tuvieron producción de las tres enzimas evaluadas: lacasa, LiP y MnP. Cuantitativamente, la actividad de la lacasa fue notablemente mayor en *T. trogii* 8154 con respecto a *P. ostreatus* 7992 (380 UI/L y 120 UI/L respectivamente) (Figura 17 A), mientras que la actividad de la LiP fue mayor en *P. ostreatus* 7992 que en *T. trogii* 8154 (185 UI/L y 95 UI/L respectivamente) (Figura 17 B). Por otra parte, la actividad de la MnP fue similar en ambas cepas, 740 UI/L en *T. trogii* 8154 y 730 UI/L en *P. ostreatus* 7992 (Figura 17 C).

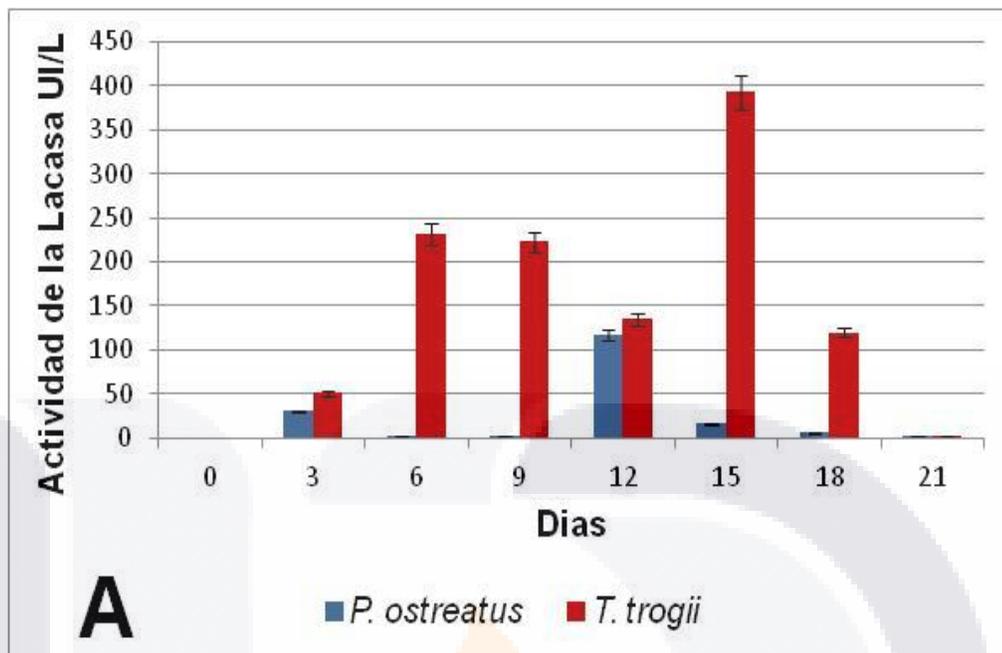


Figura 17 A. Actividades de la lacasa de *P. ostreatus* 7992 y *T. trogii* 8154, durante 21 días de incubación (n=3).

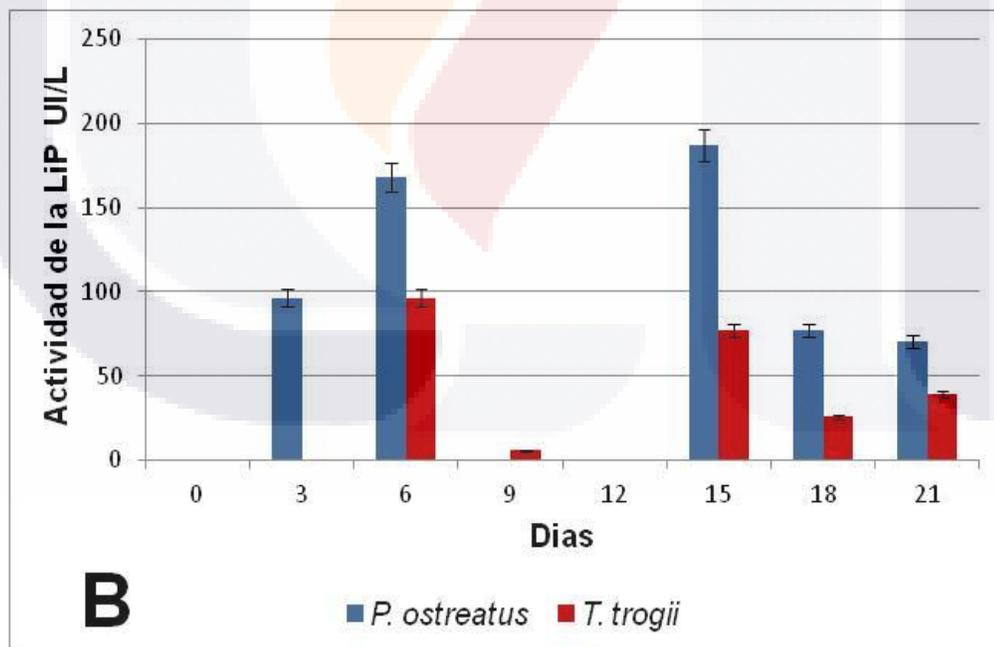


Figura 17 B. Actividades de LiP de *P. ostreatus* 7992 y *T. trogii* 8154, durante 21 días de incubación (n=3).

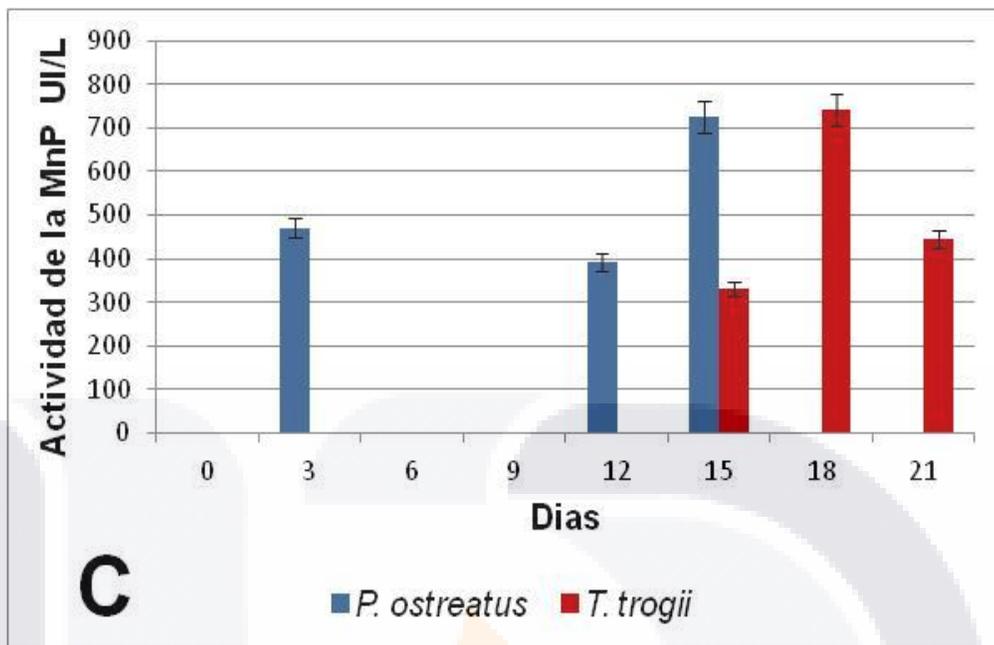


Figura 17 C. Actividades de la MnP de *P. ostreatus* 7992 y *T. trogii* 8154, durante 21 días de incubación (n=3).

La más elevada actividad enzimática en ambos hongos fue observada entre los días 15 y 18, cuando tuvieron excreción al medio líquido de las tres enzimas y en mayor cantidad, así como entre los días 3 y 6 cuando los hongos excretaron las tres enzimas pero en menores concentraciones. Esto puede deberse a que en los primeros días de cultivo, el medio líquido tiene suficientes nutrientes de fácil acceso para los hongos, como azúcares residuales del proceso de fermentación. Cuando estos nutrientes fueron agotados, los hongos empezaron a sintetizar y excretar sus enzimas ligninolíticas para hidrolizar y/o degradar compuestos más complejos presentes en la vinaza, con la consecuente remoción y mineralización de estos compuestos contaminantes. Este hecho puede inferirse ya que se observó que la biomasa de los cultivos no adquirió el color de la vinaza, por lo que no hubo únicamente absorción y acumulación de la materia orgánica coloreada en la biomasa de ambas cepas de hongos.

6.5 Biorremediación de vinaza tequilera cruda empleando hongos ligninolíticos

En los experimentos de biorremediación, *P. ostreatus* 7992 y *T. trogii* 8154 no tuvieron diferencias significativas en la remoción de DBO₅ de la vinaza cruda (VC) en los tratamientos 2, 3 y 4 (Figura 18 A, B), mientras que en la remoción de DQO sí tuvieron diferencia significativa en sus respuestas (Figura 18 A, B). Después de 21 días de tratamiento, los valores de DBO₅ y de DQO de la VC disminuyeron con todos los tratamientos fúngicos evaluados (Figura 18 A, B). *P. ostreatus* 7992 alcanzó remociones de 87.6% de la DQO y 89.7% de la DBO₅, en el medio de cultivo con 75% de vinaza y 10 g de biomasa inoculada. En el caso de *T. trogii* 8154, se obtuvo el mejor resultado en el medio de cultivo con 75% de vinaza y 10 g de biomasa del hongo, logrando remover 88.7% de la DQO y 89.7% de la DBO₅.

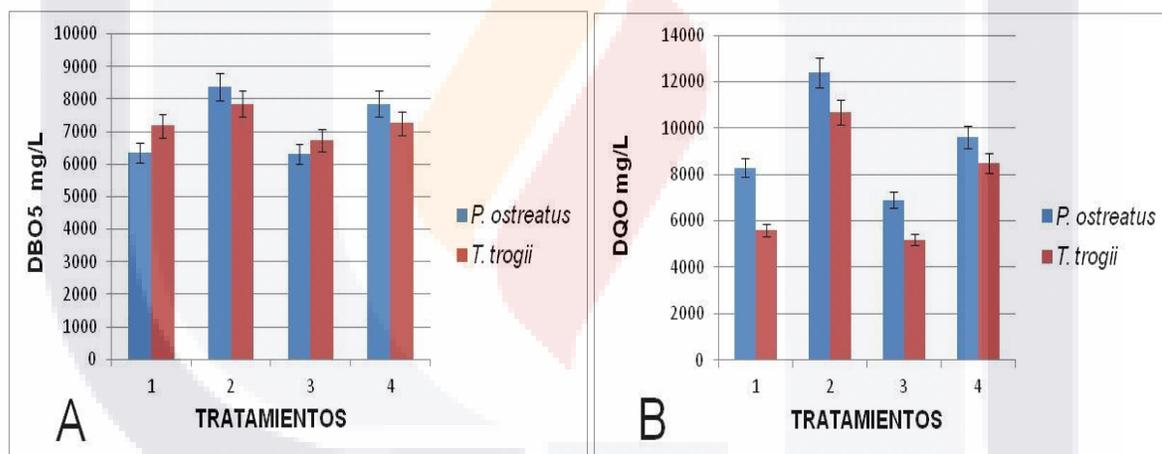


Figura 18. Valores de DBO₅ (A) y DQO (B) expresados en mg/L en la vinaza cruda (VC) después de 21 días de biorremediación con hongos ligninolíticos (p<0.05, n=3). Tratamiento 1: 50% VC + 5 g de biomasa fúngica. Tratamiento 2: 75% VC + 5 g de biomasa fúngica. Tratamiento 3: 50% VC + 10 g de biomasa fúngica. Tratamiento 4: 75% VC + 10 g de biomasa fúngica. Peso de la biomasa fúngica reportado como peso fresco. VC: DBO₅, 82000 mg/L; DQO, 100000 mg/L.

El análisis estadístico mostró que la concentración de vinaza en el medio de cultivo líquido tuvo un efecto significativo (p<0.0005) sobre la remoción de DBO₅, y de acuerdo con la prueba de DMS, la concentración de 75% de vinaza tuvo la media más alta (p<0.0001) con respecto a la concentración de 50%. La cepa de hongo y el peso del

inóculo no tuvieron efecto significativo ($p < 0.05$) sobre la remoción de DBO_5 , sin embargo estos dos factores sí tuvieron efecto significativo sobre la remoción de DQO ($p < 0.0005$). La prueba de DMS mostró que *T. trogii* 8154 tuvo una media más alta ($p < 0.0001$) con respecto a *P. ostreatus* 7992 en la remoción de DBO_5 , mientras que el peso del inóculo de 10 g tuvo una media mayor ($p < 0.0001$) que la de un peso de inóculo de 5 g. También hubo un efecto significativo ($p < 0.0001$) sobre la remoción de DQO debido a interacciones entre la cepa de hongo y la concentración de vinaza en el medio de cultivo líquido. Esta información nos indica que el mejor tratamiento para biorremediar la vinaza cruda fue empleando una concentración de vinaza de 75%, inoculándola con 10 g de biomasa de *T. trogii* 8154, logrando las mayores remociones de DQO y DBO_5 .

Los resultados sugieren que las altas concentraciones de contaminantes presentes en la vinaza estimularon la activación del sistema enzimático ligninolítico de ambas cepas de hongos, dando lugar a una alta eficiencia en la degradación de materia orgánica, además el bajo contenido de nitrógeno de la muestra de vinaza tequilera es otro factor que puede potenciar la activación de estas enzimas debido a un estrés por falta de nitrógeno (Ferreira et al. 2010, Strong 2010, Minussi et al. 2007, Hamman 2004, Kahraman y Gurdal 2002, Pointing 2001). De esta manera, se probó que *P. ostreatus* 7992 y *T. trogii* 8154 son capaces de degradar vinazas tequileras aún a altas concentraciones (75%) en cultivos líquidos, lo cual da soporte a la idea de la potencial aplicación de estas cepas para biorremediar las vinazas de la industria tequilera.

6.6 Aplicación secuencial del tratamiento fisicoquímico y de biorremediación a vinaza tequilera

Una vez desarrollados los experimentos de acuerdo al diseño experimental factorial 2^3 (Figura 19), se evaluó la respuesta de *P. ostreatus* 7992 y *T. trogii* 8154 para la degradación de vinaza tequilera tratada (VTA) previamente con 3 g/L de alginato a pH 9. Ambas cepas exhibieron una respuesta similar ya que los valores de DBO_5 y de DQO fueron significativamente reducidos en todos los experimentos realizados (Figura 20 A, B). Los mejores resultados obtenidos en este diseño experimental con respecto al valor de estos parámetros, después de 21 días de tratamiento, fueron eficiencias de remoción de 93.1% en DQO y 91.6% en DBO_5 del medio de cultivo con 75% de VTA, empleando 10 g

de biomasa de *T. trogii* 8154; en el caso de *P. ostreatus* 7992 la máxima eficiencia fue 92.3% de remoción de la DQO y 93% de la DBO₅ de un medio de cultivo con 75% de VTA inoculado con 10 g de biomasa del hongo (Figura 20 A, B) (Tabla 4).



Figura 19. Biorremediación a vinaza tequilera tratada con alginato (VTA), dentro de la cámara controlada y en agitación orbital.

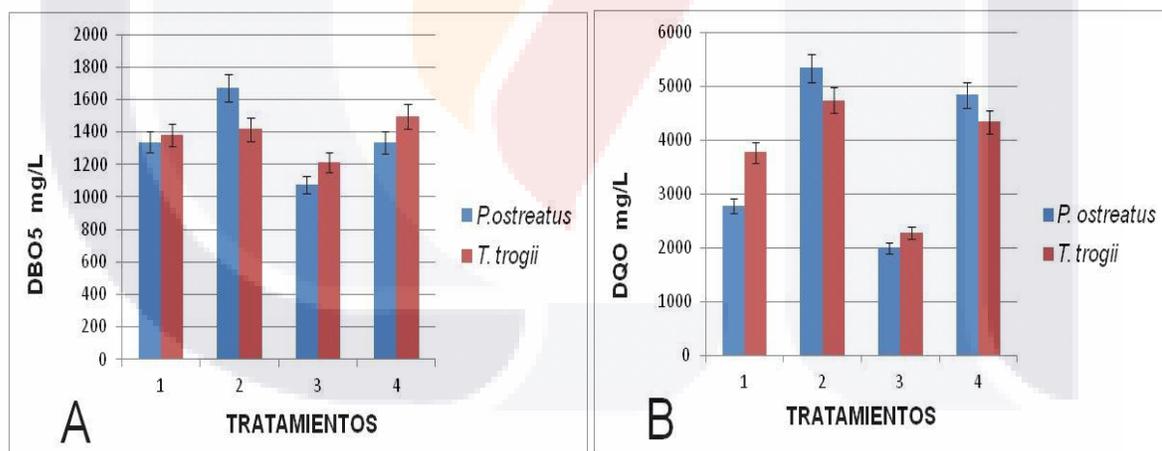


Figura 20. Valores de DBO₅ (A) y DQO (B) expresados en mg/L en la vinaza tratada con alginato (VTA) y biorremediada con hongos ligninolíticos durante 21 días ($p < 0.05$, $n = 3$). Tratamiento 1: 50% VTA + 5 g de biomasa fúngica. Tratamiento 2: 75% VTA + 5 g de biomasa fúngica. Tratamiento 3: 50% VTA + 10 g de biomasa fúngica. Tratamiento 4: 75% VTA + 10 g de biomasa fúngica. Peso de la biomasa fúngica reportado como peso fresco. VTA 75%: DBO₅, 18675 mg/L; DQO, 63000 mg/L. VTA 50%: DBO₅, 12450 mg/L; DQO, 42000 mg/L.

Tabla 4. Resumen de los mejores resultados obtenidos en cada tipo de tratamiento aplicado a vinazas tequileras.

Tratamiento	Cepa	Remoción de DQO (%) ± SD	Remoción de DBO ₅ (%) ± SD
^a Fisicoquímico	---	14.2 ± 1.95	70.6 ± 0.56
^b Biorremediación	<i>P. ostreatus</i>	87.6 ± 0.94	89.7 ± 1.29
	<i>T. trogii</i>	88.7 ± 1.21	89.7 ± 2.31
^c Fisicoquímico + Biorremediación	<i>P. ostreatus</i>	92.3 ± 2.16	93.0 ± 0.38
	<i>T. trogii</i>	93.1 ± 2.02	91.6 ± 0.81

^aTratamiento fisicoquímico usando vinaza cruda a pH 9 y 3 g/L de alginato.

^bBiorremediación usando 75% de vinaza cruda a pH 5.5, y 10 g de inóculo.

^cTratamiento fisicoquímico y biorremediación en secuencia, tratamiento fisicoquímico bajo las condiciones descritas en (a), biorremediación de 75% VTA, pH 5.5, y 10 g de inóculo.

El análisis estadístico de los resultados de este experimento mostró que la concentración de VTA tuvo un efecto significativo ($p < 0.005$) sobre la remoción de DBO₅, y de acuerdo a la prueba de DMS, la concentración de 75% de VTA tuvo una media más alta ($p < 0.01$) con respecto a la concentración de 50% de VTA. Por otra parte, el análisis mostró que el peso del inóculo y la concentración de VTA tuvieron un efecto significativo ($p < 0.001$ y $p < 0.05$, respectivamente) sobre la remoción de DQO. La prueba de DMS determinó que el peso del inóculo de 10 g tuvo una mayor media ($p < 0.05$) con respecto al peso de inóculo de 5 g. Asimismo, la prueba de DMS indicó que una concentración de 50% de VTA en la composición del medio tuvo la mayor media con respecto a la de la concentración de 75% de VTA. También hubo un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre la remoción de DQO debido a interacciones entre los factores cepa de hongo y concentración de VTA en el medio líquido, siendo significativamente superior *T. trogii* 8154 para la remoción de DQO.

Esta información indica que el tratamiento más efectivo para lograr la remoción más alta de DQO (93.1%) fue empleando un medio para biorremediación con una concentración de 75% de VTA y 10 g de biomasa de *T. trogii* 8154, mientras que el mejor tratamiento para alcanzar la mayor remoción de DBO₅ (93%) fue empleando un medio con una concentración de 75% de VTA y 10 g de biomasa de *P. ostreatus* 7992 (Tabla 4) (Figura 21), lo cual demuestra que la aplicación consecutiva del tratamiento fisicoquímico con alginato y la biorremediación con los hongos ligninolíticos seleccionados es la mejor de las alternativas evaluadas en este trabajo (Figura 22).



Figura 21. Aspecto de la vinaza tequilera después de 21 días de tratamiento con *T. trogii* 8154 (izquierda) y *P. ostreatus* (derecha), ambos en 75% de vinaza tratada con 3 g/L de alginato. Puede observarse en cada matraz que la biomasa fúngica conservó su color claro, por lo que se infiere que hubo degradación, absorción y mineralización de la mayor parte de la materia orgánica presente en la vinaza.

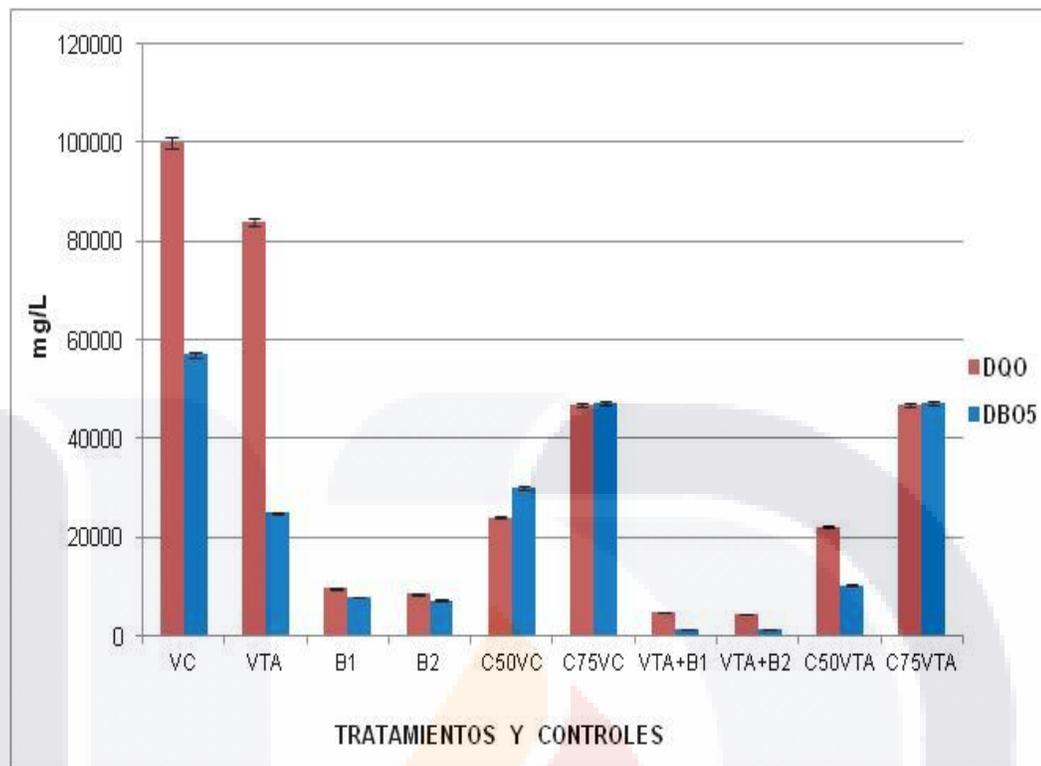


Figura 22. Cambios en los valores de DQO y DBO₅ expresados en mg/L, a través de los tratamientos fisicoquímico y de biorremediación, y la aplicación secuencial de ambos tratamientos. VC, vinaza tequilera cruda. VTA, vinaza tratada con alginato. B1, biorremediación de VC (75%) con *P. ostreatus*. B2, biorremediación de VC (75%) con *T. troglitii*. C50VC, Control con VC (50%). C75VC, Control con VC (75%). VTA+B1, VTA (75%) tratada con *P. ostreatus*. VTA+B2, VTA (75%) tratada con *T. troglitii*.

6.7 Determinación de la concentración de fenoles en muestras de vinaza tequilera cruda y en muestras obtenidas de los diferentes tratamientos

Los valores de concentración de fenoles para cada muestra se presentan en la Tabla 5, fueron calculados interpolando los resultados de las lecturas de absorbancia (510 nm) de cada muestra en la curva patrón de concentración de **fenol** vs absorbancia obtenida por espectrofotometría en el laboratorio, presentada al final del **Anexo E**. La técnica para la determinación de la concentración de fenoles está descrita en el **Anexo E**. En la Tabla 5 se observa que todos los tratamientos lograron disminuir la concentración de fenoles en la vinaza, siendo el tratamiento combinado empleando a *P. ostreatus* el que alcanzó mayor remoción de fenoles.

Tabla 5. Resultados de la cuantificación de fenoles en muestras de vinaza cruda y después de los distintos tratamientos.

Muestra	Dilución de la muestra	Absorbancia 510 nm	Concentración de Fenol (µg/mL)	% real de remoción de Fenol
Vinaza cruda	1:30	0.634	152.9	---
Vinaza tratada con alginato (VTA)	1:20	0.393	60.61	60.36
Vinaza con tratamiento combinado usando <i>T. trogl</i> y 75% VTA	1:10	0.193	15.25	88.92
Vinaza con tratamiento combinado usando <i>P. ostreatus</i> y 75% VTA	1:10	0.187	14.78	89.27
Control 75% VTA	1:10	0.283	22.37	50.78
Control 50% VTA	1:10	0.248	19.60	89.27

6.8 Caracterización fisicoquímica de la vinaza mezcalera

El contenido de fenoles, SS y ST, así como los valores de DQO y DBO₅ de la vinaza mezcalera fueron elevados, además de tener un pH bastante ácido (3.88), en concordancia con las características generales de este tipo de agua residual (Robles-González et al. 2012). La VM presentó un contenido de nitrógeno en forma de nitritos y nitratos más elevado que el de la vinaza tequilera analizada previamente en este trabajo. Debido al contenido de sales minerales, la VM contiene una notable dureza (expresada como CaCO₃); así como altos valores de acidez y alcalinidad (expresadas como CaCO₃). En la Tabla 6 se presentan los resultados obtenidos en la caracterización fisicoquímica.

Tabla 6. Resultados de la caracterización fisicoquímica de la vinaza mezcalera.

Parámetro	Resultado
DBO ₅	25 576 mg/L
DQO	42 000 mg/L
Sólidos Totales	45.86 g/L
Sólidos Sedimentables	260 mL/L
pH	3.88
Fenoles	70.56 µg/mL
Acidez	3 200 mg CaCO ₃ /L
Alcalinidad	270 mg CaCO ₃ /L
Dureza	312 mg CaCO ₃ /L
Nitritos	70 mg/L
Nitratos	91.1 mg/L

La vinaza caracterizada en este trabajo, presentó un valor de DQO y un contenido de fenoles notablemente más bajos que los reportados por Villalobos-Castillejos (2009) en vinazas mezcaleras provenientes de destilerías tecnificadas ubicadas en el Estado de Oaxaca. Estas vinazas presentaron una DQO de 54,000 – 58,500 mg/L, y un contenido de fenoles de 478 – 521 g/L. Por otra parte, la vinaza empleada para este trabajo presentó valores semejantes pero ligeramente menores en los parámetros de DBO₅ y ST con respecto a las vinazas mencionadas. Villalobos-Castillejos (2009) también reporta la caracterización de una vinaza originada en un proceso de producción artesanal de mezcal, cuyos valores en todos los parámetros mencionados anteriormente, fueron más elevados. Esto corrobora que las diferencias fisicoquímicas entre vinazas generadas en distintas destilerías se ve influida por la materia prima (especie y/o variedad de agave), la metodología y la tecnología empleadas en el proceso de obtención del mezcal y el control que se ejerza sobre éste en todas sus etapas (Robles-González et al. 2012, Villalobos-Castillejos 2009, García-García et al. 1997). Se sabe que el proceso de molienda de las piñas de agave para extraer el jugo para la fermentación aporta gran cantidad de sólidos a la vinaza, reflejándose en los altos valores de SS y ST que presenta, y que varía según el método y equipo utilizado para la molienda. La presencia de alto contenido de SS y ST también incrementa los valores de DQO y DBO₅ de la vinaza. La preparación del mosto previo a la fermentación, donde se añade un suplemento de nutrientes en forma de sales

inorgánicas para las levaduras, incrementa el contenido de nitrógeno, calcio y magnesio en la vinaza, originando su elevada dureza. El contenido de fenoles en la vinaza, es una propiedad intrínseca a la especie de agave empleado para elaborar el mezcal, de acuerdo a las especies de agave especificadas en la NOM-070-SCFI-1994 (SECOFI 1997), por lo que puede variar ampliamente de una especie a otra. Además, la metodología empleada en el proceso de destilación y rectificación, también influye en el contenido de compuestos fenólicos de la vinaza (Villalobos-Castillejos 2009, Robles-González et al. 2012). De esta forma, se tiene que en la producción de mezcal, los procesos artesanales suelen generar vinazas con mayor contenido de sólidos y por tanto con valores de DQO y DBO_5 más elevados, debido al uso de técnicas y equipos más rudimentarios, y al poco control que se tiene sobre las variables involucradas durante todo el proceso de producción (Robles-González et al. 2012a, 2010b, Villalobos-Castillejos 2009, García-García et al. 1997, Cedeño 1995).

6.9 Tratamiento fisicoquímico a vinaza mezcalera cruda

Los resultados indican que el mejor tratamiento para remover sólidos de la vinaza mezcalera cruda (VMC) fue utilizando la concentración de alginato de 3 g/L y pH 5 (Tabla 7), con la que se obtuvieron remociones del 42.4% de sólidos totales, además de un 18.4% de la DBO_5 y 40.7% de la DQO. Este tratamiento se seleccionó para tratar vinaza para la biorremediación con HL, ya que aunque la remoción de DBO_5 obtenida fue 1.2% menor que al añadir 6 g/L de alginato a pH 10, se utiliza sólo la mitad de la cantidad de alginato, lo que representa menor costo, y la DBO_5 remanente puede ser removida por los HL en la biorremediación.

Los resultados del análisis de varianza de los datos muestran que no hubo efecto significativo ($p > 0.05$) del pH y la concentración del alginato ($p > 0.05$) sobre la remoción de sólidos de la vinaza. Los resultados del análisis estadístico también revelan que no hubo efecto significativo ($p > 0.05$) del alginato, el pH y la interacción de ambos factores sobre la remoción de DBO_5 . Por otra parte, tampoco hubo efecto significativo ($p > 0.05$) del alginato y el pH sobre la remoción de DQO; la interacción de ambos factores ($p > 0.063$) genera mayor efecto sobre la remoción de DQO, aunque sin ser significativo.

Tabla 7. Resultados del tratamiento fisicoquímico a vinaza mezcalera (n=2).

Alginato g/L	pH	^a Sólidos removidos g/100 mL	% Sólidos removidos	^b DBO ₅ mg/L	% DBO ₅ removida ± SD	^c DQO mg/L	% DQO removida ± SD
3.0	5	1.945	42.40 ± 0.32	20880	18.36 ± 5.27	24900	40.71 ± 4.04
3.0	10	1.653	36.06 ± 0.52	21215	17.05 ± 6.50	27650	34.16 ± 4.64
6.0	5	1.912	41.70 ± 0.09	19870	22.30 ± 1.33	27000	35.71 ± 1.66
6.0	10	1.742	38.00 ± 0.91	20205	21.00 ± 5.25	24400	41.90 ± 4.76
^d 4.5	^d 7.5	1.738	37.90 ± 0.50	21700	15.15 ± 2.68	28110	33.07 ± 3.93

^a Valores de sólidos removidos una vez sustraída la cantidad de alginato añadida.

^b DBO₅ inicial de la vinaza cruda = 25,576 mg/L

^c DQO inicial de la vinaza cruda = 42,000 mg/L

^d Valores de alginato y pH en el punto medio de su respectivo límite inferior y superior

6.10 Biorremediación de vinaza mezcalera cruda empleando hongos ligninolíticos

En la biorremediación con *T. trogii* 8154 se lograron remociones máximas de 62.6% de la DBO₅ y 67.9% de la DQO en el medio con 75% de vinaza y un inoculo de 15 g de biomasa del hongo. Con *P. ostreatus* 7992 se obtuvieron remociones de 61.4% de la DBO₅ y 67.3% de la DQO empleando el medio con 75% de vinaza y un inoculo de 10 g de biomasa (Figura 23 A, B). El análisis de varianza de los resultados mostró que la interacción entre la concentración de vinaza en el medio de cultivo y el peso de biomasa inoculada tuvo un efecto significativo (p<0.05) sobre la remoción de DBO₅. La cepa *P. ostreatus* 7992 fue la que tuvo una media mayor en cuanto a la remoción de DBO₅. Por otra parte, el análisis indicó que la interacción entre la cepa de hongo y el peso del inoculo tuvo efecto significativo (p<0.05) sobre la remoción de DQO, siendo *T. trogii* 8154 la cepa que tuvo una media más elevada.

El mejor tratamiento para biorremediar la vinaza mezcalera cruda es empleando una concentración de vinaza de 75%, inoculada con 10 g de biomasa de *P. ostreatus* 7992, o bien con un inóculo de 15 g de biomasa de *T. trogii* 8154, logrando en ambos casos las mayores remociones de DQO y DBO₅, en el caso de esta última muy similares entre ambas cepas, dejando casi los mismos valores de DBO₅ remanente. Los resultados sugieren que altas concentraciones de materia orgánica en la vinaza, con presencia de compuestos complejos, estimulan la activación del sistema enzimático ligninolítico de *P. ostreatus* 7992 y *T. trogii* 8154. Esto da lugar a que los hongos remuevan mayor cantidad de materia orgánica, una vez que han agotado los sustratos a los que tienen fácil acceso, como azúcares residuales. Sin embargo, se observó que en cultivos en medio líquido con una concentración de 100% de vinaza mezcalera cruda, los HL no se desarrollaron, sugiriendo que hay uno o varios elementos o compuestos presentes en la vinaza cruda que a cierta concentración limitan o inhiben el desarrollo de los HL. Estos elementos pueden ser metales, y compuestos como fenoles y melanoidinas (Robles-González et al. 2012, Strong 2010, Rodríguez et al. 2003, García-García et al. 1997), cuya concentración es reducida a un nivel más adecuado para los hongos al diluir la vinaza cruda. Esto pudiera ser la causa que permita que los hongos se desarrollen en vinaza cruda al 50 y 75%. Lo mismo puede estar sucediendo en vinaza tratada con alginato, donde los hongos también son capaces de desarrollarse, lo que sugiere que en los sólidos removidos se encuentra al menos una parte del o de los compuestos que inhiben a los hongos. El efecto inhibitorio de la vinaza cruda sobre los hongos ligninolíticos brinda oportunidad para futuras investigaciones al respecto. Con los resultados obtenidos, se tienen bases para afirmar que *P. ostreatus* 7992 y *T. trogii* 8154 son capaces de degradar vinazas mezcaleras a altas concentraciones (75%) en cultivos líquidos, proporcionando evidencias de la factibilidad de utilizar estas cepas para biorremediar VM a escala industrial, siendo necesario obtener más información en un estudio previo a escala piloto.

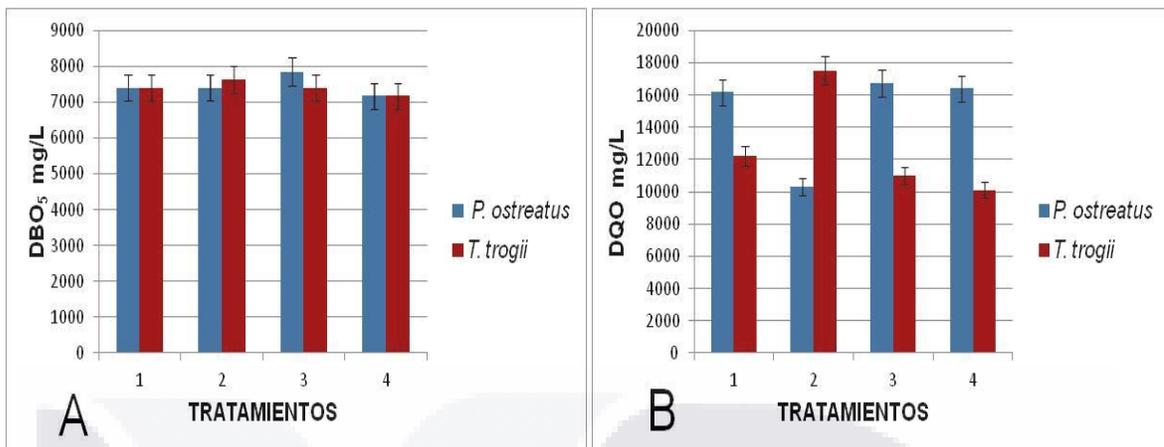


Figura 23. Valores de DBO₅ (A) y DQO (B) expresados en mg/L en la vinaza mezcalera cruda (VMC) después de 21 días de biorremediación con hongos ligninolíticos ($p < 0.05$, $n = 3$). Tratamiento 1: 50% VMC + 10 g de biomasa fúngica. Tratamiento 2: 75% VMC + 10 g de biomasa fúngica. Tratamiento 3: 50% VMC + 15 g de biomasa fúngica. Tratamiento 4: 75% VMC + 15 g de biomasa fúngica. Peso de la biomasa fúngica reportado como peso fresco. 75% VMC: DBO₅ 19182 mg/L; DQO 31500 mg/L. 50% VMC: DBO₅ 12788 mg/L; DQO 21000 mg/L.

6.11 Aplicación secuencial del tratamiento fisicoquímico y de biorremediación a vinaza mezcalera

Una vez desarrollados los experimentos de acuerdo al diseño experimental factorial 2^3 , se evaluó la respuesta de *P. ostreatus* 7992 y *T. trogii* 8154 para la degradación de VMTA. En este caso se volvieron a tener respuestas semejantes entre los tratamientos con ambas cepas (Figura 24 A, B). Después de 21 días de biorremediación, los mejores resultados obtenidos con *T. trogii* 8154, fueron remociones de 82.8% de la DQO y 92.5% de la DBO₅ del medio con 100% de VMTA, inoculado con 15 g de biomasa fúngica. En el caso de *P. ostreatus* 7992, las máximas remociones fueron de 80% de la DQO y 91.4% de la DBO₅ del medio con 100% VMTA inoculado con 15 g de biomasa (Figura 24 A, B). Estos resultados indican que el tratamiento que logró la remoción más alta de DQO (82.8%) y de DBO₅ (92.5%) fue empleando un medio de cultivo con 100% de VMTA y 15 g de biomasa de *T. trogii* 8154, sin embargo como se comentó anteriormente, *P. ostreatus* 7992 tuvo una respuesta muy similar a la de *T. trogii* 8154 y no hay diferencia significativa entre sus respuestas (Tabla 8) (Figura 24 A, B). Esto muestra que para la vinaza mezcalera, la aplicación consecutiva del tratamiento con alginato y la biorremediación con los hongos ligninolíticos seleccionados es la mejor alternativa entre las estudiadas en este trabajo (Figuras 25 y 26).

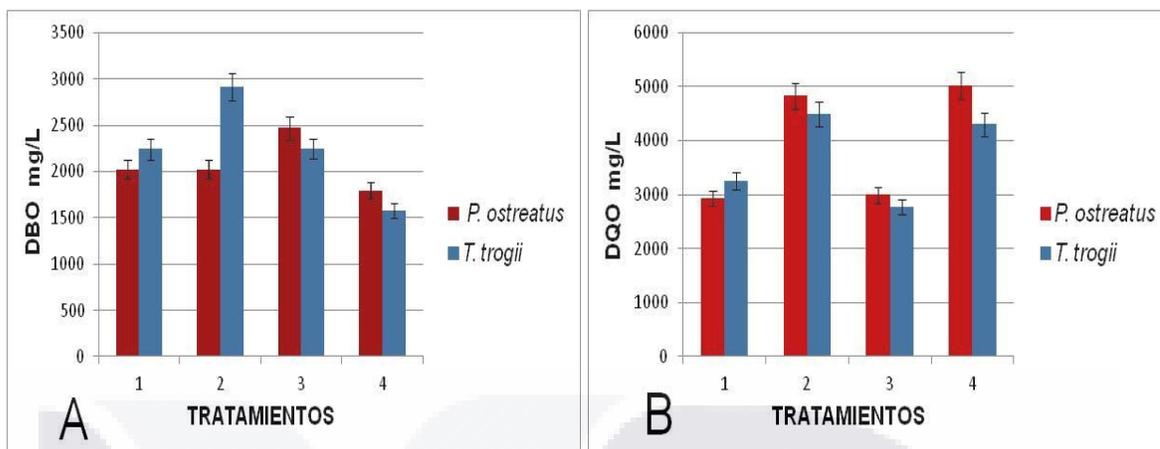


Figura 24. Valores de DBO₅ (A) y DQO (B) (mg/L) en la vinaza mezcalera con tratamiento fisicoquímico (VMTA) y biorremediación con hongos ligninolíticos durante 21 días ($p < 0.05$, $n = 3$). Tratamiento 1: 75% VMTA + 10 g de biomasa. Tratamiento 2: 100% VMTA + 10 g de biomasa. Tratamiento 3: 75% VMTA + 15 g de biomasa. Tratamiento 4: 100% VMTA + 15 g de biomasa. Peso de la biomasa fúngica reportado como peso fresco. 75% VMTA: DBO₅ 15750 mg/L; DQO 18825 mg/L. 100% VMTA: DBO₅ 21000 mg/L; DQO 25100 mg/L.

Tabla 8. Resumen de los mejores resultados obtenidos en cada tipo de tratamiento aplicado a vinazas mezcaleras.

Tratamiento	Cepa	Remoción de DQO (%) ± SD	Remoción de DBO ₅ (%) ± SD
^a Fisicoquímico	---	40.7 ± 4.04	18.4 ± 5.20
^b Biorremediación	<i>P. ostreatus</i>	67.3 ± 1.01	61.4 ± 4.40
	<i>T. trogii</i>	67.9 ± 0.40	62.6 ± 4.60
^c Fisicoquímico + Biorremediación	<i>P. ostreatus</i>	80.0 ± 1.60	91.4 ± 4.50
	<i>T. trogii</i>	82.8 ± 0.40	92.5 ± 2.62

^aTratamiento fisicoquímico usando vinaza mezcalera cruda (VMC) a pH 5 y 3 g/L de alginato.

^bBiorremediación usando 75% de VC a pH 5.5, y 10 g de inóculo de *P. ostreatus* (15 g en el caso de *T. trogii*).

^cTratamiento fisicoquímico y biorremediación en secuencia, tratamiento fisicoquímico bajo las condiciones descritas en (a), biorremediación empleando 100% VMTA, pH 5.5, 15 g de inóculo de cada cepa.

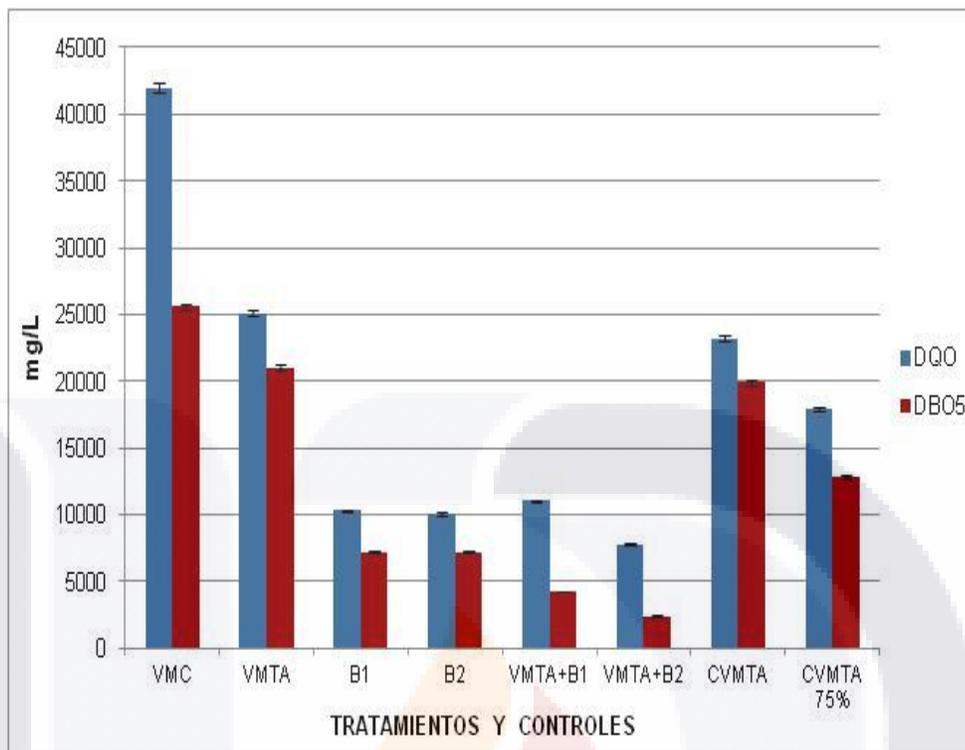


Figura 25. Disminución de la DQO y DBO₅ (mg/L) con tratamiento fisicoquímico, biorremediación, y ambos tratamientos aplicados en serie. VMC, vinaza cruda. VMTA, vinaza mezcalera tratada con alginato. B1, biorremediación de VMC (75%) con *P. ostreatus*. B2, biorremediación de VMC (75%) con *T. troglia*. VMTA+B1, VMTA (100%) + biorremediación con *P. ostreatus*. VMTA+B2, VMTA (100%) + biorremediación con *T. troglia*. CVMTA, Control con 100% VMTA. CVMTA75%, Control con 75% de VMTA.



Figura 26. Aspecto de una réplica de los tratamientos a VMTA después de 21 días de biorremediación.

6.12 Determinación de la concentración de fenoles en las muestras de vinaza mecalera cruda, y en muestras obtenidas en los diferentes tratamientos

La concentración de fenoles de cada muestra (Tabla 9) se calcularon interpolando los resultados de las lecturas de absorbancia en la curva patrón de concentración fenoles, la cual se muestra al final del **Anexo E**. La técnica para determinación de la concentración de fenoles también está descrita en el **Anexo E**.

Tabla 9. Resultados de la cuantificación de fenoles en muestras de vinaza cruda y con distintos tratamientos.

Muestra	^b Concentración de Fenol (µg/mL)	^c Remoción de Fenol (%)
Vinaza mecalera cruda (VMC)	^a 70.56	---
Control 100% VMC	64.59	8.46
Control 75% VMC	48.78	7.82
Control 50% VMC	33.11	6.15
Vinaza cruda tratada con alginato (VMTA)	40.15	56.90
Vinaza cruda (75%) tratada con <i>T. trogii</i>	14.03	73.48
Vinaza cruda (75%) tratada con <i>P. ostreatus</i>	14.87	71.90
Vinaza cruda (50%) tratada con <i>T. trogii</i>	9.95	71.79
Vinaza cruda (50%) tratada con <i>P. ostreatus</i>	10.81	69.36
Tratamiento combinado usando <i>T. trogii</i> y 100% VMTA	10.49	85.13
Tratamiento combinado usando <i>P. ostreatus</i> y 100% VMTA	12.23	82.66
Tratamiento combinado usando <i>T. trogii</i> y 75% VMTA	8.90	70.44
Tratamiento combinado usando <i>P. ostreatus</i> y 75% VMTA	9.52	68.38
Control 100% VMTA	18.57	7.47
Control 75% VMTA	13.72	8.85

^a Concentración inicial de fenoles en la vinaza cruda

^b Concentración residual de fenoles después del tratamiento, excepto (a)

^c Remociones de fenol calculadas en base a la concentración de fenol según la vinaza (VMC, VMTA) y el % de vinaza (50, 75, 100%) empleado en el tratamiento

7. DISCUSIÓN

7.1 Caracterización fisicoquímica de la vinaza tequilera

Es importante conocer la composición básica de la vinaza, ya que esto nos da una idea de lo que puede suceder al aplicar el tratamiento con alginato, y también, al fungir como medio de cultivo donde se inocularán los hongos, se tiene información sobre qué nutrientes contiene para el desarrollo de éstos para que realicen la degradación y se obtengan los resultados esperados.

El análisis preliminar de la vinaza tequilera confirmó la presencia de iones divalentes, calcio principalmente, y magnesio. La presencia de estos iones induce la pre-gelificación del alginato cuando es añadido a la vinaza. Debido a estas reacciones, la presencia en las vinazas de iones de calcio que provienen del contenido natural de las piñas de agave y del proceso de producción del tequila, hacen necesario el uso de citrato de sodio como agente secuestrante de iones divalentes para ligar los iones de calcio para formar citrato de calcio, tomando ventaja de que la constante de formación del citrato de calcio es mayor que la de la formación del alginato de calcio, evitando así la pre-gelificación del alginato y asegurando que sea solubilizado en la vinaza. Desde el punto de vista económico, este paso representa un costo adicional para el tratamiento, pero es vital para la óptima aplicación del alginato y obtener así los mejores resultados.

La caracterización de la vinaza tequilera reveló que presenta valores de DQO y DBO₅ notablemente más elevados que los reportados en otras vinazas tequileras o de otro origen (Carvajal-Zarrabal et al. 2012, Strong 2010, Íñiguez-Covarrubias y Peraza-Luna 2007, Rodríguez et al. 2003, García-García et al. 1997, Meza-Pérez et al. 1996). Las diferencias fisicoquímicas entre las vinazas tequileras y vinazas de otro origen se deben principalmente a la materia prima de donde se obtiene el destilado, así como a las técnicas y procesos particulares empleados. Las vinazas tequileras tienen un alto contenido de materia orgánica e inorgánica, el cual puede variar entre ellas de acuerdo al sitio donde el agave fue cultivado (características fisicoquímicas del suelo de cultivo); por la técnica de horneado de las cabezas de agave; por las técnicas y equipos empleados para moler las cabezas de agave para extraer su jugo; a los microorganismos, formulaciones del mosto, técnicas y equipos empleados en el proceso de fermentación y

destilación; al control sobre las variables de dichos procesos y a diluciones de la vinaza previas a su descarga (Robles-González et al. 2012a, 2010b, Villalobos-Castillejos 2009, García-García et al. 1997, Cedeño 1995). Los valores elevados de DBO₅ y DQO involucran tratamientos convencionales con largos tiempos de retención hidráulica, los cuales no remueven con eficiencia los contaminantes contenidos en la vinaza debido a la presencia de compuestos fenólicos que son tóxicos para las bacterias y otros microorganismos. El contenido de ST en la vinaza tequilera también fue elevado, por lo que en la descarga de vinazas sin tratamiento representan una fuente rica de compuestos orgánicos para la población microbiana del suelo, de cuerpos de agua, ríos y arroyos, aunque el exceso de nutrientes puede llevar a la eutrofización de los cuerpos de agua, afectando a la vida acuática. El pH de la vinaza tequilera resultó muy bajo (3.9), lo cual puede afectar el equilibrio y disponibilidad de micro y macro nutrientes en el suelo. El pH ácido también puede causar daño foliar en los cultivos (Strong 2010) y cambios adversos de pH en cuerpos de agua receptores de descargas de vinazas sin previo tratamiento. El bajo pH de la vinaza es inadecuado para aplicarle tanto el tratamiento fisicoquímico como el de biorremediación, por lo que el pH requiere un ajuste previo para tal propósito. Debido a estas características fisicoquímicas, las vinazas pueden dañar y poner en peligro el medio ambiente y a los seres vivos si son descargadas sin tratamiento. Por otra parte, el bajo contenido de nitrógeno en la vinaza puede ser un factor benéfico que incrementa la actividad ligninolítica de los hongos para la biorremediación, ya que se sabe que el estrés por nitrógeno activa el sistema enzimático extracelular de los HL (Kahraman y Gurdal 2002). Asimismo, el análisis de la vinaza reveló la presencia de cobre, que se sabe actúa como inductor de la síntesis de lacasas (Strong 2010, Hamman 2004) y además es parte de la estructura funcional de dichas enzimas.

7.2 Tratamiento fisicoquímico con alginato a vinaza tequilera cruda

En los experimentos fisicoquímicos, la remoción de sólidos se incrementó cuando el pH fue elevado de 5 a 9 para todas las concentraciones de alginato evaluadas, lo cual puede ser atribuido a un incremento en las interacciones entre el alginato y los sólidos a causa del pH. Los grupos carboxilo e hidroxilo del manuronato y del guluronato en las cadenas de alginato tienen mayor carga negativa a medida que el pH aumenta, ya que el alginato está bajo su forma desprotonada, condición que favorece la interacción con los sólidos para

retenerlos al formar el gel (Lozano-Alvarez et al. 2009, Díaz de Apodaca-Díaz et al. 2007, Hashem y Elhmmali 2006, Navarro et al. 2004).

Con el tratamiento fisicoquímico ensayado se tuvieron eficiencias de remoción de hasta 37% de los sólidos (23 g/L) de la vinaza tequilera, y hasta 73% de remoción de DBO₅. Sin embargo, en la remoción de DQO la eficiencia máxima lograda con este tratamiento fue de 17%. El ANOVA de los datos experimentales nos muestra que tanto el pH y el alginato tienen efecto significativo ($p < 0.05$) en la remoción de sólidos, por otra parte, en la remoción de DBO₅ y DQO, únicamente el alginato tiene efecto significativo ($p < 0.05$). De esta forma, es conveniente mantener el pH y el alginato en los valores máximos ensayados, con el fin de remover la mayor cantidad posible de sólidos, lo cual influye directamente en la eficiencia de remoción de DBO₅, y en menor grado en la remoción de DQO. Esto da como resultado, un efluente con menor cantidad de compuestos recalcitrantes y/o tóxicos, más asequible para la biorremediación con los hongos ligninolíticos que pueden degradar dichos compuestos hasta disminuir notablemente la carga contaminante de las vinazas.

La mayor parte de la carga orgánica se encuentra disuelta en la vinaza, siendo difícil de remover tanto con métodos fisicoquímicos como por medios biológicos convencionales. Los sólidos removidos en el tratamiento con alginato comprenden los sólidos sedimentables, sólidos suspendidos, mas una fracción de los sólidos disueltos de la vinaza. Los resultados prueban la factibilidad del uso del alginato para tratar vinaza tequilera y mezcalera y la capacidad del alginato para gelificar en un amplio rango de pH, tanto en condiciones ácidas como alcalinas. Otra ventaja del alginato es el hecho de que pueden gelificar aun a temperaturas frías, y es un polímero biodegradable no tóxico.

Comparados con los resultados de otros trabajos consultados en la literatura, en donde se trataron vinazas crudas a nivel laboratorio, los resultados obtenidos en el presente trabajo, **respecto a remoción de DBO₅, son superiores** a otros reportados previamente. Por otra parte, los resultados obtenidos en el presente trabajo, **respecto a remoción de DQO**, son comparables a los obtenidos por Iñiguez-Covarrubias y Peraza-Luna (2007) quienes emplearon poliácridamida (PAM) para tratar una vinaza tequilera cruda que tenía valores iniciales de ST de 21883 mg/L y DQO de 43,541 mg/L. A nivel piloto aplicaron a la vinaza 200 mg/L de PAM, obteniendo remociones del 38.6% de la DQO y 25.6% de ST. En otro

estudio, Dávila-Rincón et al. (2009) lograron una remoción de 37% de los ST de vinaza de destilería de alcohol tratada por el método de electrocoagulación - electroflotación.

7.3 Evaluación de la capacidad de crecimiento de 20 cepas de hongos ligninolíticos en un medio compuesto de vinaza tequilera y agar

En estos experimentos se observó inhibición del crecimiento en 8 de las 20 cepas de HL ensayadas. Se ha postulado que la inhibición del crecimiento de los HL puede ser dado por la presencia de compuestos tóxicos en la vinaza, como melanoidinas y fenoles entre otros (Ferreira et al. 2010, Rodríguez et al. 2003); así como por las condiciones del cultivo como el pH, concentración de vinaza en el medio, temperatura y nutrientes (Strong 2010, Ramírez-Rincón 2006). Se seleccionaron las cepas *Bjerkandera adusta* 7308, *Pleurotus ostreatus* 7992 y *Trametes trogii* 8154, las cuales mostraron mayor desarrollo de micelio y decoloración en menor tiempo que el resto de las cepas que presentaron crecimiento. El óptimo desarrollo de estas tres cepas en el medio de cultivo con vinaza al 100% y agar, así como la decoloración que realizaron en dicho medio, indica que su sistema enzimático extracelular les confiere la capacidad de aprovechar como fuente de carbono el agar del medio de cultivo, así como compuestos complejos presentes en la vinaza. También sugiere que tuvieron disponibilidad de micronutrientes necesarios como nitrógeno, manganeso, hierro y cobre, éste último muy importante en la síntesis de lacasas. Se ha probado en investigaciones previas que *P. ostreatus* y *T. trogii* incrementan su producción de lacasa en presencia de cobre (Minussi et al. 2007, Mouso et al. 2003). La expresión de lacasa es regulada a nivel de transcripción genética por cobre y nitrógeno en *T. versicolor* y por cobre en *P. ostreatus* (Minussi et al. 2007) y *T. pubescens* (Strong 2010). La presencia de manganeso es un factor crítico en la regulación de la expresión de MnP y en menor grado de la LiP (Wang et al.) En *T. trogii*, la MnP se ve inducida también por la presencia de cobre (Mouso et al. 2003). Con los resultados de este experimento, también se prueba que las condiciones experimentales de pH y temperatura para incubar los cultivos, fueron favorables para que *B. adusta* 7308, *P. ostreatus* 7992 y *T. trogii* 8154 degradaran sustratos que otras cepas no lograron por alguna circunstancia que no favoreció su desarrollo, como puede ser una menor tolerancia a compuestos tóxicos presentes en la vinaza, las altas concentraciones de compuestos que pueden inhibir su crecimiento, la ausencia o baja disponibilidad de uno o varios micronutrientes críticos para

su desarrollo, que la temperatura y el pH del medio de cultivo no fueron óptimos para su desarrollo, por diferencias en la especificidad de sustratos de sus enzimas, además de una combinación de todas estas circunstancias. Se sabe que el pH tiene influencia en la producción de enzimas ligninolíticas, y que las cepas de HL tienen particulares condiciones de pH que estimulan la síntesis de sus enzimas ligninolíticas, además de que éstas también tienen mayor estabilidad y actividad a determinado pH óptimo (Strong 2010, Mouso et al. 2003). Por otra parte, la temperatura también influye sobre la estabilidad y actividad de las enzimas ligninolíticas. Las lacasas suelen ser más activas a pH ácido, entre 5 – 6 (Rodríguez-Rincón 2006, Hamman 2004) y a temperaturas de 28 – 30°C.

En los cultivos para determinar la cinética de crecimiento y nuevamente la decoloración del medio ensayado, se observó mayor velocidad de crecimiento en los primeros días con *B. adusta* 7308, al final del periodo de cultivo, *P. ostreatus* 7992, *T. trogii* 8154 y *B. adusta* 7308 presentaron crecimiento radial de 5.0, 6.5 y 7.5 cm respectivamente. Sin embargo, *P. ostreatus* 7992 y *T. trogii* 8154 realizaron mayor decoloración del medio que *B. adusta* 7308. Estos resultados concuerdan con los de Ferreira et al. (2010) que evaluaron el crecimiento de diferentes cepas de hongos en un medio conteniendo 100% de vinaza de caña de azúcar con agar. Finalmente, se seleccionaron las cepas *P. ostreatus* 7992 y *T. trogii* 8154 por su mayor capacidad para decolorar la vinaza tequilera, para realizar los experimentos de biorremediación.

Se ha establecido que las diferencias en el desarrollo de las distintas cepas de hongos ligninolíticos en un medio de cultivo se deben al sistema enzimático extracelular, en cuanto al tipo de enzimas y las concentraciones producidas, específicas a cada cepa, las condiciones de cultivo y la tolerancia de cada cepa a los compuestos tóxicos presentes en la vinaza, lo cual permite a los hongos crecer en el medio agar-vinaza o bien, ser inhibidos (Ferreira et al. 2010, Faraco et al. 2009, Hamman 2004, Rodríguez et al. 2003, Kahraman y Gurdal 2002).

7.4 Determinación de actividad enzimática ligninolítica de las cepas *P. ostreatus* 7992 y *T. trogii* 8154 en vinaza tequilera (medio líquido)

En las condiciones experimentales, ambas cepas tuvieron producción de las tres enzimas evaluadas: lacasa, LiP y MnP. La cronología del perfil de excreción de las enzimas fue distinto entre las cepas y concuerda con reportes previos (Ferreira et al. 2010, Strong 2010, Rodríguez et al. 2003), observándose que *P. ostreatus* 7992 tuvo mayor actividad de la enzima MnP, a diferencia de *T. trogii* 8154 que tuvo mayor actividad de la lacasa. Como se estableció previamente, se encontró que bajo las condiciones de cultivo en que se realizaron los experimentos, *P. ostreatus* 7992 tuvo producción de LiP, contrastando con reportes previos en los que se establece que el género *Pleurotus* carece de la LiP o bien no la produce (Ferreira et al. 2010, Rodríguez et al. 2003), en tanto que Chi et al. (2007) reportaron una baja actividad de LiP en co-cultivos de *Pleurotus ostreatus* con *C. subvermispora* y *P. rivulosus*. Se ha postulado que dichas diferencias están relacionadas con la cepa de hongo, sus características genéticas y metabólicas particulares, la composición del medio de cultivo y las condiciones de cultivo (Strong 2010, Chi et al. 2007, Minussi et al. 2007), siendo factores que interaccionan entre sí para regular, potenciar o inhibir la producción de enzimas, así como para mantener su actividad. La LiP interviene en la oxidación de compuestos fenólicos y compuestos aromáticos no fenólicos de la lignina, y por medio de los radicales intermediarios que forma al oxidar los sustratos, da paso a reacciones no enzimáticas que conducen al rompimiento de cadenas laterales de la lignina, demetilaciones y rearrreglos moleculares. La MnP fue la enzima que alcanzó la mayor actividad en ambas cepas, obteniéndose valoraciones similares en *T. trogii* 8154 y en *P. ostreatus* 7992. La MnP interviene en la degradación de sustratos fenólicos y no fenólicos de la lignina. La lacasa fue la enzima producida de forma más continua por ambas cepas a través de todo el periodo de cultivo; hubo una notoria actividad de la lacasa en *T. trogii* 8154, en *P. ostreatus* 7992 fue más baja la actividad de esta enzima, muy importante en el proceso de degradación de la materia orgánica de la vinaza porque es capaz de oxidar tanto compuestos aromáticos fenólicos como no aromáticos a través de un mecanismo de reacción catalizado por radicales y empleando el oxígeno molecular como aceptor de electrones. Se sabe que la lacasa está involucrada en la decoloración y degradación de compuestos complejos como colorantes, melanoidinas, fenoles, lignina y sus derivados, los cuales son tóxicos para otros microorganismos y recalcitrantes a su remoción mediante tratamientos biológicos

convencionales (Ferreira et al. 2010, Strong 2010, Dhouib et al. 2006, Rodríguez et al. 2003, García-García et al. 1997). Esta es una razón para el empleo de hongos ligninolíticos como *P. ostreatus* 7992 y *T. trogii* 8154 para tratar vinazas, debido a su capacidad para producir lacasa, LiP, MnP, otras peroxidasas versátiles y enzimas auxiliares, las cuales pueden degradar el alto contenido de materia orgánica de las vinazas que no pueden ser degradados por bacterias y otros microorganismos.

7.5 Biorremediación de vinaza tequilera cruda empleando hongos ligninolíticos

En la biorremediación como único tratamiento se utilizó vinaza cruda (VC) la cual tenía inicialmente una DQO de 100,000 mg/L y DBO₅ de 82,000 mg/L. Los mejores resultados obtenidos después de 21 días de tratamiento, fueron eficiencias de remoción de 88.7% de DQO y 89.7% de DBO₅ de vinaza al 75% en el medio de cultivo, empleando 10 g de biomasa de *T. trogii* 8154; con *P. ostreatus* 7992 la máxima eficiencia de remoción fue de 87.6% de la DQO y 89.7% de la DBO₅ empleando 75% de vinaza en el medio de cultivo y 10 g de inóculo. Los cambios en los valores de estos parámetros fueron realizados a través de todo el periodo de cultivo de acuerdo a su respectivo perfil de excreción de enzimas ligninolíticas (Figura 17 A, B, C), el cual muestra que ambas cepas tuvieron producción de las tres enzimas valoradas casi durante todo el periodo de cultivo.

Por lo anterior, se estableció un periodo de 21 días de tratamiento de las muestras para su biorremediación, de acuerdo al perfil de excreción de enzimas ligninolíticas de ambos hongos, en condiciones en que la aireación se realizó únicamente por intercambio gaseoso con el medio exterior a los matraces a través del tapón de algodón, y por la agitación de los matraces. La aplicación de una mayor aireación al proceso de biorremediación teóricamente debe modificar este perfil de excreción de enzimas, aumentando su actividad, lo cual debe llevar a incrementar la eficiencia de remoción de los contaminantes y a disminuir el tiempo de retención hidráulica en el tratamiento, con fundamento en que las lacasas de *P. ostreatus* 7992 y *T. trogii* 8154 requieren oxígeno molecular para realizar sus funciones para transformar y mineralizar compuestos orgánicos complejos (Dashtban et al. 2010, Strong 2010, Minussi 2007, Dávila y Vázquez-Duhalt 2006, Hamman 2004) como los presentes en las vinazas.

El mismo experimento de biorremediación de vinaza tequilera tratada con alginato fue llevado a cabo previamente con un periodo de tratamiento de 14 días, de acuerdo al trabajo de Strong (2010), obteniendo remociones más bajas de DQO y DBO₅ (datos no mostrados) a las logradas posteriormente en los experimentos con 21 días de tratamiento. Este hecho concuerda con los perfiles de actividad de las enzimas ligninolíticas de *P. ostreatus* 7992 y *T. trogii* 8154 (Figura 17 A, B, C) donde es posible apreciar que entre los días 15 y 21 del tratamiento ambas cepas tuvieron actividad enzimática, principalmente la LiP en *P. ostreatus* 7992 y de las tres enzimas en el caso de *T. trogii* 8154. De esta manera, en las condiciones experimentales establecidas, se incrementó la biodegradación de materia orgánica de la vinaza cuando el tratamiento con los hongos se extendió a 21 días, generando la disminución de la DQO y la DBO₅.

En el presente trabajo, los resultados obtenidos en la biorremediación de vinaza cruda son superiores a los reportados en la literatura por otros autores que han realizado estudios de biorremediación de vinazas de distintos orígenes utilizando hongos ligninolíticos. Rodríguez et al. (2003), emplearon el hongo *Pleurotus spp.*, para decolorar y degradar vinaza de caña de azúcar proveniente de una destilería de alcohol con una DQO inicial de 73,600 mg/L, logrando un 55% de remoción de la DQO después de 20 días de tratamiento; sin embargo, la vinaza empleada para los experimentos estaba diluida al 50%, adicionada con un medio sintético con nutrientes para formar el medio de cultivo para sus experimentos, a pH 6, y además fue esterilizada antes de ser inoculada con el hongo. Por otra parte, Ferreira et al. (2010) reportaron el empleo de *Pleurotus sajor-caju* para decolorar vinaza de caña de azúcar proveniente de una destilería de alcohol. En su trabajo no reportaron cuánta DQO ó DBO₅ tenía dicha vinaza, la cual utilizaron sin diluir, la esterilizaron previo a su inoculación, y lograron hasta 98% de decoloración después de 15 días de tratamiento. Strong (2010) trabajó con vinazas procedentes del proceso de destilación de la bebida denominada crema de Amarula, las vinazas tenían una DQO inicial de 27,000 mg/L, pH 3.8 y un contenido de compuestos fenólicos de 866 mg/L, y fueron tratadas empleando cuatro cepas de hongos ligninolíticos (*Trametes pubescens* MB89, *Ceriopsis subvermispora*, *Pycnoporus cinnabarinus*, ó *Phanerochaete chrysosporium*) en cultivo líquido a pH 5, las mayores remociones de DQO fueron logradas por *Trametes pubescens* MB89 (74%) y *Phanerochaete chrysosporium* (64%), mientras que la mayor remoción de compuestos fenólicos fue alcanzada por *T. pubescens* MB89 (86%) y *P. cinnabarinus* (69%).

Durante los experimentos del presente trabajo, a la vinaza no se le adicionó ningún nutriente ni fue esterilizada antes de ser inoculada con los hongos para los experimentos de biorremediación, únicamente se hicieron diluciones con agua destilada para dejar la vinaza cruda en diluciones de 50% y 75%, debido a que en experimentos previos de cultivo en medio líquido compuesto de vinaza cruda al 100% ambas cepas de hongos no tuvieron desarrollo. Tal como ya se había discutido en el apartado **7.3**, la inhibición del crecimiento de estas cepas pudo deberse a diversas circunstancias como una menor tolerancia a compuestos tóxicos presentes en la vinaza, a las altas concentraciones de compuestos que pueden inhibir su crecimiento, la ausencia o baja disponibilidad de uno o varios nutrientes críticos para su desarrollo, o bien que las condiciones en que se llevó a cabo el cultivo, como la temperatura controlada de la cámara y el pH del medio de cultivo no fueron las óptimas para estas cepas.

En la aplicación práctica de este método de biorremediación a escala piloto o industrial, el tiempo total de biorremediación deberá ser en teoría, más corto, tomando en cuenta que el suministro de aireación al proceso de biorremediación debe incrementar la eficiencia de remoción de contaminantes, disminuyendo el tiempo de retención hidráulica, debido a que las lacasas producidas por *P. ostreatus* 7992 y *T. trogii* 8154 requieren de oxígeno molecular como un aceptor de electrones para oxidar una amplia variedad de compuestos aromáticos y no aromáticos (Dashtban et al. 2010, Strong 2010, Minussi et al. 2007, Dávila y Vázquez-Duhalt 2006, Hamman 2004). Por otra parte, la LiP y la MnP son peroxidases que necesitan peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para catalizar reacciones oxidativas dependientes de H_2O_2 (Dashtban et al. 2010, Hamman 2004). Además, los hongos ligninolíticos producen otras enzimas extracelulares que actúan como enzimas accesorias involucradas en la degradación de lignina y sus compuestos derivados, las cuales incluyen oxidasas generadoras de H_2O_2 como la glioxal oxidasa (GLOX) (EC 1.2.3.5) y la aril-alcohol oxidasa (AAO) (EC 1.1.3.7), que proveen el H_2O_2 necesario para que la LiP y la MnP realicen sus funciones (Dashtban et al. 2010, Pointing 2001). Por lo tanto, proveer óptimas cantidades de oxígeno molecular debe resultar en un incremento de la actividad enzimática ligninolítica, favoreciendo la producción de más radicales libres oxidantes no específicos así como quelatos de Mn^{+3} , los cuales pueden difundirse a través del medio (Dashtban et al. 2010, Hamman 2004, Pointing 2001), incrementando las reacciones no enzimáticas y el contacto con la materia orgánica permitiendo su

transformación y posterior uso como fuente de carbono por parte de los hongos hasta su total mineralización (Strong 2010, Hamman 2004).

7.6 Aplicación secuencial de tratamiento fisicoquímico y biorremediación a vinaza tequilera

En los experimentos de esta etapa se utilizó vinaza tratada con alginato (VTA) la cual tenía inicialmente una DQO de 84,000 mg/L y DBO₅ de 18,675 mg/L, para ser biorremediada. Los resultados obtenidos indicaron que la aplicación consecutiva del tratamiento fisicoquímico con alginato y la biorremediación con las cepas seleccionadas *P. ostreatus* 7992 y *T. trogii* 8154 es la mejor alternativa entre todas las estudiadas en este trabajo (Figura 22).

Los hongos son organismos aerobios, por lo que las condiciones experimentales establecidas en este trabajo fue una limitante para ellos debido a que no se suministró un flujo de aire a los matraces donde se incubaron, el aire únicamente fue proveído por los intercambios naturales de gases entre el ambiente interno de los matraces y el ambiente externo de la cámara controlada de cultivo, a través de los tapones de algodón de los matraces. Además, la muestra de vinaza tequilera que se empleó para los experimentos tenía un contenido de materia orgánica más elevado que el de otras vinazas reportadas en la literatura. El presente estudio es el primero en reportar el tratamiento de vinaza tequilera usando alginato y biorremediación con hongos ligninolíticos.

Como se había discutido en la sección anterior, las remociones de DQO y DBO₅ obtenidas en el presente trabajo fueron más elevadas con respecto a las reportadas en otros trabajos mencionados anteriormente con vinazas tequileras o de otro origen, tanto con la biorremediación como único tratamiento, como con la combinación del tratamiento fisicoquímico con la biorremediación. Además, es importante remarcar que los experimentos de este trabajo fueron realizados empleando vinazas sin esterilizar, lo cual puede representar un inconveniente para los hongos utilizados para la biorremediación, pues en la vinaza aún sobreviven levaduras que inicialmente pueden competir con los hongos por nutrientes y contribuyen con los valores de DQO y DBO₅ (controles C50VC, C75VC; Figura 22).

Existen trabajos publicados que abordan tratamientos combinados a vinazas tequileras. Meza-Pérez et al. (1996) a nivel laboratorio emplearon una combinación de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ y FeCl_3 (1.5 y 1.0 g/L respectivamente) a pH 6, para tratar el efluente de vinaza tequilera proveniente de un reactor anaerobio, logrando remociones de 41% de la DQO y 82% del color. Carvajal-Zarrabal et al. (2012) trataron vinaza tequilera mediante un proceso de floculación-coagulación usando ácido poliglutámico a concentraciones de 250-300 mg/L, combinado con la adición de hipoclorito de sodio y doble filtración en columnas de arena, la DQO inicial era de 40,000 mg/L y fue reducida en un 79.5%.

Por otra parte, también hay reportes de estudios sobre tratamiento con hongos ligninolíticos a otro tipo de residuos, tales como aguas residuales de industrias como la textil (Faraco et al. 2009), del proceso de blanqueado de papel (Minussi 2007, Pointing 2001) y extractoras de aceite de oliva (Dhouib et al. 2006); así como pesticidas (Davila-Vazquez et al. 2005, Hamman 2004, Jáuregui et al. 2003, Pointing 2001, Kirk et al. 1990), hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs o PAHs) (Hamman 2004, Pointing 2001, Márquez-Rocha et al. 2000, Kirk et al. 1990), residuos de fabricación de municiones y explosivos (Pointing 2001), residuos lignocelulósicos (Malherbe y Cloete 2002, Kirk et al. 1990), compuestos xenobióticos como colorantes azo (Faraco et al. 2009, Dias et al. 2003, Abadulla et al. 2000, Heinfling et al. 1997) y polímeros sintéticos como plásticos (Pointing 2001). Sin embargo, hay pocos reportes acerca del tratamiento de vinazas tequileras, los cuales abordaron el uso de métodos fisicoquímicos, pero no se encontraron métodos de biorremediación de vinaza tequilera empleando hongos ligninolíticos.

La aplicación práctica de los métodos de tratamiento fisicoquímico y de biorremediación propuestos en este trabajo requiere estudios futuros a nivel piloto. Esto incluye una optimización de la dosificación de alginato y el pH durante el tratamiento fisicoquímico. Para la biorremediación, ejercer un control sobre el pH durante el tratamiento, aplicar un flujo controlado de aireación y de las cargas orgánicas para esta etapa. Además, los tratamientos deberán realizarse tanto en proceso por lote como en proceso continuo. De esta manera, se lograrán obtener las condiciones óptimas que nos permitan remover mayores cantidades de contaminantes de la vinaza con el tratamiento fisicoquímico y con la biorremediación con hongos ligninolíticos (Strong 2010, Minussi 2007). Desde este punto de vista, los resultados obtenidos son alentadores para implementar una prueba piloto, que deberá incluir una selección o diseño de equipo adecuado para esta etapa

experimental. En este sentido el equipo para el tratamiento fisicoquímico deberá incluir un sistema para la dosificación del alginato, un tanque de reacción/sedimentación, un sistema de bombeo para retirar el gel de alginato con sólidos y desecarlo. Para la biorremediación se requieren equipos como un biorreactor con un sistema de aireación acoplado, un tanque de sedimentación, y un sistema de bombeo para retiro/recirculación de biomasa fúngica hacia el biorreactor para inoculación y mantenimiento de la cantidad óptima de biomasa en el mismo. La dosificación óptima de alginato y la aireación, así como los resultados finales de pH, DBO₅, DQO y color permitirán tomar decisiones sobre la factibilidad del equipo, la efectividad de todo el sistema y si se requieren mejoras. En combinación con información complementaria de flujos, cargas y volumen total de vinazas producidas por una destilería en particular que esté interesada, será posible escalar el sistema hacia un nivel industrial. Por otra parte, la implementación industrial también requiere la evaluación del área disponible dentro de la destilería para diseñar el arreglo espacial de la planta de tratamiento, para finalmente estimar la inversión necesaria. El enfoque económico de la factibilidad de la biorremediación con hongos ligninolíticos está ganando interés en la búsqueda de tecnologías de alta eficiencia, bajo costo y amigables con el medio ambiente (Hamman 2004). La biorremediación con hongos ligninolíticos puede ser más económica que los tratamientos fisicoquímicos, químicos y biológicos que actualmente se aplican en las destilerías para tratar sus vinazas, además de que algunos de estos métodos son inadecuados, de baja eficiencia o costosos. Entre ellos, los dos tratamientos más eficientes incluyen cinco etapas cada uno: el caso (a) sedimentación, neutralización, tratamiento anaeróbico, flotación y tratamiento aeróbico; y el caso (b) enfriamiento, coagulación-floculación, tratamiento aeróbico, filtración y ozonación; estos sistemas logran remover hasta 90% de la DQO y 85% de la DBO₅, a un alto costo de operación (López-López et al. 2010). Los métodos estudiados aquí, pueden ser realizados en tres etapas: enfriamiento y ajuste de pH, tratamiento con alginato y biorremediación con hongos ligninolíticos, este sistema podría representar ahorros significativos en costos de operación comparado con aquellos tratamientos aplicados actualmente en las destilerías, y con la ventaja de una mayor eficiencia en la remoción de DBO₅ y DQO. Las tequileras realizan dos tipos de procesos de destilación: por lote y continuo (Cedeño 1995), siendo el primero el más aplicado, ya que la mayor parte de las tequileras son micro, pequeñas y medianas destilerías, otras tequileras medianas y de gran tamaño operan un proceso continuo, después del cual almacenan sus vinazas para su posterior

trastamiento, por lo que es posible que los métodos estudiados en este trabajo, con las mejoras pertinentes, puedan ser aplicados para tratar vinazas generadas en procesos continuos o discontinuos.

7.7 Determinación de la concentración de fenoles en las muestras de vinaza tequilera cruda, y en muestras obtenidas en los diferentes tratamientos

La vinaza tuvo una concentración de fenoles de 152.9 µg/mL, y la VTA 60.6 µg/mL. Strong (2010) reportó una concentración de fenoles totales de 866 mg/L en vinaza del proceso de destilación de la crema de Amarula. García-García et al. (1997) reportaron un contenido de fenoles totales de 469 mg/L en vinaza de caña de azúcar. En el presente trabajo, las remociones de fenol alcanzadas con los tratamientos combinados fueron de 88.9% con *T. troglitii* 8154 y de 89.2% con *P. ostreatus* 7992, representando reducciones notables en la concentración de fenol en las muestras. Strong (2010) reportó remociones de fenoles totales de 33 – 86% en sus experimentos de biorremediación de vinaza con cuatro cepas de hongos ligninolíticos. Esto manifiesta la capacidad de ambas cepas para biodegradar fenoles, aún a altas concentraciones, lo que las hace muy útiles en la remoción de este tipo de compuestos para disminuir así la toxicidad de las vinazas. Los controles sin inóculo también presentaron reducción de la concentración de fenoles, pero al final del periodo de incubación estos controles tuvieron valores mucho más elevados de concentración de fenoles que los tratamientos de biorremediación. La reducción de la concentración de fenoles observada en los controles puede ser atribuida a la oxidación atmosférica (Strong 2010). Al final del periodo de tratamiento, en los medios permaneció una concentración residual de fenoles que no fueron degradados. Esto puede ser atribuido a moléculas que fueron estéricamente inaccesibles a las enzimas ligninolíticas; o bien, a la falta de compuestos radicales intermediarios como los mediadores, los cuales completan los procesos de degradación de lignina y sus derivados. Los mediadores, entre ellos algunos compuestos fenólicos, son formados por la actividad de la lacasa, la MnP y la LiP. La escasez de mediadores en el medio pudo muy probablemente deberse a la falta de moléculas de oxígeno en el medio. Muchos de estos mediadores son generados en reacciones catalizadas por el peróxido de hidrógeno en el caso de la LiP y la MnP, y el oxígeno molecular en el caso de la lacasa. En estas reacciones primero se forman radicales libres y radicales intermedios, que actúan como sustratos intermedios para las

enzimas, dando así origen a los mediadores (Dashtban et al. 2010). En el caso de la MnP, primero debe darse la oxidación dependiente de H_2O_2 del Mn^{+2} a Mn^{+3} , el cual es liberado por la enzima en forma quelada con oxalato o malonato. De esta forma, actúa como un mediador redox de bajo peso molecular y alta difusibilidad, capaz de generar radicales reactivos para la degradación de compuestos fenólicos (Dashtban et al. 2010).

Los compuestos fenólicos presentes en las vinazas dificultan su tratamiento por digestión biológica ya sea por sistemas anaerobios o aerobios convencionales (García-García et al. 1997). Muchos compuestos fenólicos no pueden ser biodegradados por bacterias y les resultan tóxicos aún a bajas concentraciones, sin embargo los hongos son capaces de degradar este tipo de compuestos y utilizarlos como fuente de carbono y energía (Strong 2010, Hamman 2004).

7.8 Caracterización fisicoquímica de la vinaza mezcalera

La caracterización confirmó que la vinaza mezcalera contiene gran cantidad de sales minerales, principalmente de calcio y de magnesio, puesto que el valor obtenido de dureza (expresada como $CaCO_3$) fue alto. Estas sales minerales representan un elevado contenido de iones divalentes que se sabe dificultan el tratamiento fisicoquímico de la vinaza con el alginato, haciendo necesario disolver en la vinaza un secuestrante de iones divalentes previo a la adición del alginato. Los nitritos y nitratos también están presentes en la vinaza mezcalera, se sabe que el contenido de nitrógeno puede influir en la producción de las enzimas ligninolíticas de los HL. En algunas cepas, una baja disponibilidad de nitrógeno puede activar la producción de una o varias enzimas, mientras que a otras cepas esta condición puede limitarla. Incluso, existen cepas para las que una alta disponibilidad de nitrógeno no resulta ser limitante para producir enzimas ligninolíticas, induciendo su desarrollo (Ferreira et al. 2010, Strong 2010, Rodríguez et al. 2003, Kharaman y Gurdal 2002). Por otra parte, la caracterización también reveló la gran cantidad de sólidos y materia orgánica que contiene la vinaza, confirmados por los elevados valores obtenidos en la determinación de DQO, DBO_5 , ST y SS. Asimismo, un característico pH ácido. La VM tiene un notable contenido de fenoles, pudiéndose inferir que resulte tóxica a la mayoría de los microorganismos. En el caso de los HL, la presencia de compuestos fenólicos induce la producción de lacasa, lo que les permite degradar este tipo de compuestos. Todas estas particularidades fisicoquímicas le confieren a la vinaza

mezcalera la característica de ser un residuo líquido recalcitrante al tratamiento por métodos biológicos convencionales, ya sea mediante microorganismos aerobios, anaerobios, o una combinación de ambos métodos. En comparación con las características de vinazas de otro origen (Strong 2010, García-García et al. 1997) y vinazas mezcaleras de destilerías del Estado de Oaxaca (Robles-González et al. 2012, Villalobos-Castillejos 2009), la vinaza mezcalera empleada en el presente trabajo tiene menor contenido de fenoles (70.56 mg/L), ya que aquéllas tienen concentraciones de fenoles en un rango que fluctúa entre 469 – 866 mg/L; así como un valor menor en la DQO (42,000 mg/L), en la que otras vinazas mezcaleras reportadas presentan valores en un rango de 56,000 – 60560 mg/L. En contraste, la vinaza analizada tiene valores semejantes en parámetros como DBO₅ y ST, respecto a otras vinazas mezcaleras reportadas (Robles-González et al. 2012, Villalobos-Castillejos 2009).

7.9 Tratamiento fisicoquímico con alginato a vinaza mezcalera cruda

Las pruebas preliminares de solubilización del alginato en la VMC confirmó la presencia de iones divalentes libres. La presencia de estos iones en la vinaza provoca la pre-gelificación del alginato al momento de ser añadido, mediante un proceso de gelificación denominado “de difusión”, formando perlas o fibras de alginato dependiendo de la cantidad y forma en que se agregue. Esto es causado por la reacción entre iones divalentes, principalmente de calcio, y los sitios específicos de unión en la estructura de las cadenas de alginato. Por esta razón, fue necesario utilizar citrato de sodio como agente secuestrante para ligar dichos iones, puesto que el valor de la constante de formación del citrato de calcio es mayor al de la constante de formación del alginato de calcio, lo que permite que cumpla la función de secuestrante del ion calcio. De esta forma, se evita que dicho ion divalente esté libre para interactuar con las regiones de guluronato de la estructura del alginato, cuando éste es añadido a la vinaza. En consecuencia, se previene la pre-gelificación del alginato y permite obtener mejores resultados en el tratamiento fisicoquímico al tener el alginato en solución y realizar la gelificación controlada al añadir el CaCl₂.

Los resultados del análisis de varianza de los datos, muestran que el efecto del pH sobre la remoción de sólidos totales, DQO y DBO₅ de la vinaza no es estadísticamente significativo. Sin embargo, se logró remover una cantidad ligeramente mayor de sólidos

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

totales a pH 5 con ambas concentraciones de alginato. Por otra parte, en la remoción de sólidos totales, DQO y DBO₅ no hubo diferencia estadística entre los tratamientos con las dos concentraciones de alginato probadas (3 y 6 g/L). Esto pone de manifiesto que el aumentar la cantidad de alginato adicionado, no resulta en un incremento proporcional en la remoción de sólidos totales. Por ello, no es conveniente adicionar grandes cantidades de alginato, ya que en términos de una aplicación práctica, los costos se elevarían innecesariamente sin obtener mayores resultados que lo justifiquen.

De acuerdo a la caracterización de ambas vinazas, se aprecia en los resultados una alcalinidad y acidez mucho más elevadas en la vinaza mezcalera; además, fue más difícil solubilizar el alginato en la vinaza mezcalera, debido a una mayor presencia de iones divalentes en comparación con la vinaza tequilera, lo cual se refleja en la caracterización de la vinaza mezcalera al mostrar un valor elevado de dureza.

7.10 Biorremediación de vinaza mezcalera cruda empleando hongos ligninolíticos

Los resultados obtenidos en la remoción de materia orgánica de la VMC mediante biorremediación (Figura 23), son comparables a los reportados en otros trabajos enfocados al uso de hongos ligninolíticos para biorremediación de diferentes tipos de vinazas. Rodríguez et al. (2003), a nivel laboratorio realizaron el tratamiento de vinaza proveniente de una destilería de alcohol de caña de azúcar, la cual tenía una DQO inicial de 73,600 mg/L. Empleando al hongo *Pleurotus spp.* y un medio compuesto por 50% de vinaza y 50% de un medio sintético para hongos, con pH 6 y esterilizado, lograron remociones del 55% de la DQO después de 20 días de cultivo sumergido. Ferreira et al. (2010) también desarrollaron un trabajo a nivel laboratorio para biorremediación de vinaza de caña de azúcar. La vinaza sin diluir fue esterilizada, y a pH 6, fue inoculada con *Pleurotus sajor-caju* e incubada durante 15 días. Este tratamiento logró remociones de 98% del color. Strong (2010) empleó a *Trametes pubescens* MB89 para biorremediar a nivel laboratorio vinaza originada en el proceso de destilación de crema de Amarula. La vinaza tenía un contenido de fenoles de 866 mg/L y una DQO de 27,000 mg/L, fue centrifugada y el sobrenadante en diferentes concentraciones fue inoculado con el hongo. Después de 14 días de cultivo a 28°C, las eficiencias de remoción de DQO fueron del 71-

77%, y la remoción de fenoles del 87-92%. Sin embargo, no hay reportes de trabajos de biorremediación de vinaza mezcalera usando hongos ligninolíticos. Este tipo de tratamiento se puede aplicar a las vinazas de otras industrias como la de la producción de alcohol de caña, el ron, brandy, bacanora entre otros.

Como se había discutido anteriormente, una diferencia importante del presente trabajo con respecto a otros reportados anteriormente, es que la VMC empleada en el presente trabajo no fue enriquecida con ningún nutriente ni fue esterilizada previo a su inoculación con hongos. La VMC únicamente fue diluida con agua destilada para dejar la vinaza en concentraciones de 50% y 75%, debido a que la VMC al 100% inhibió el desarrollo del hongo. Esto indica la presencia en la vinaza de uno o varios compuestos a una concentración que resulta tóxica o inhibitoria para los hongos. Además, en los experimentos del presente estudio no se tuvo aireación forzada, por lo que los resultados obtenidos se muestran aún más valiosos. Es un hecho que la LiP, MnP, la lacasa y demás enzimas accesorias de *P. ostreatus* 7992 y *T. troglia* 8156 necesitan el oxígeno molecular para llevar a cabo la síntesis de mediadores y las reacciones de oxidación para transformar y mineralizar compuestos orgánicos (Dashtban et al. 2010, Strong 2010, Minussi 2007, Dávila y Vázquez-Duhalt 2006, Hamman 2004) como los presentes en las vinazas, por lo que es imprescindible realizar futuros estudios de biorremediación en condiciones de aireación para verificar si se incrementan la remoción de materia orgánica contaminante, como en teoría se esperaría.

7.11 Aplicación secuencial de tratamiento fisicoquímico y biorremediación a vinaza mezcalera

Para estos experimentos se utilizó vinaza tratada con alginato (VMTA) que presentaba una DQO de 25,100 mg/L y una DBO₅ de 21,000 mg/L después del tratamiento fisicoquímico, logrando así que la VMTA obtenida tuviera menor contenido de materia orgánica previo a su tratamiento de biorremediación con HL.

Las remociones de DQO y DBO₅ obtenidas en el presente trabajo con la combinación del tratamiento fisicoquímico y la biorremediación son comparables con respecto a las reportadas en otros trabajos que abordan el tratamiento a VM o de otro origen (Ferreira et al. 2010, Strong 2010, Rodríguez et al. 2003, García-García et al. 1997). Sin embargo, es

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

importante resaltar que los experimentos del presente estudio se realizaron en condiciones que pudieran parecer adversas para la biorremediación con HL. Se empleó vinaza sin esterilizar, con concentraciones de hasta 75% de vinaza cruda, sin suministro de aireación en los matraces. La vinaza no se suplementó con nutrientes adicionales para los HL, tomando en cuenta que la vinaza contiene abundantes fuentes de carbono, suficientes para el crecimiento fúngico y síntesis de enzimas (Zhang et al. 2013). Se tuvo en consideración la capacidad de estos organismos para biodegradar inespecíficamente una gran variedad de compuestos complejos, mediante su sistema enzimático extracelular (Hamman 2004, Pointing 2001), así como las condiciones estables de temperatura, oscuridad y agitación durante el periodo de incubación de los medios experimentales.

Las enzimas ligninolíticas de los hongos de la podredumbre blanca son responsables de la disminución del contenido de fenoles y de los valores de DBO₅ y DQO de la vinaza. La lacasa puede oxidar una amplia gama de compuestos fenólicos y no fenólicos requiriendo únicamente oxígeno molecular como aceptor de electrones (Dashtban et al. 2010, Strong 2010, Dávila y Vázquez-Duhalt 2006); algunos compuestos fenólicos inducen un aumento en su síntesis (Strong 2010).

Se sabe que en el género *Pleurotus* la lacasa no es regulada por condiciones limitantes de nutrientes, ya que el exceso de éstos puede estimular su actividad y la producción de biomasa. Un comportamiento similar de la actividad lacasa se ha comprobado en estudios realizados a HL capaces de producir lacasa y MnP (Rodríguez et al. 2003). La lacasa es una enzima con importancia a nivel industrial, por su potencial aplicación en el tratamiento de aguas residuales de destilerías, industrias textiles, e industria del papel y de la pulpa (Strong 2010, Rodríguez et al. 2003); así como en tratamientos ambientales para degradación de compuestos xenobióticos como pesticidas y HPAs (Rodríguez et al. 2003, Pointing 2001). La actividad de la MnP es inducida por la presencia de material lignocelulósico (Ferreira et al. 2010), la MnP cataliza la oxidación de Mn⁺² a Mn⁺³, el cual es liberado quelado con oxalato u otros queladores. Este complejo es capaz de difundirse a través de la pared celular vegetal y actúa como mediador redox de compuestos fenólicos, aminas y estructuras fenólicas de la lignina (Dashtban et al. 2010, Dávila y Vázquez-Duhalt 2006). La LiP cataliza la oxidación dependiente de H₂O₂ de compuestos no fenólicos de la lignina, sustratos aromáticos no fenólicos y gran variedad de compuestos fenólicos. Forma radicales fenoxi y cationes del alcohol veratrílico, los cuales

llevan a cabo reacciones no enzimáticas que amplían su rango de sustratos (Dashtban et al. 2010). Con este fundamento, puede inferirse que la lacasa, la LiP y la MnP, así como otras enzimas accesorias sintetizadas por los HL empleados en el presente estudio, participan en forma conjunta en la degradación de la gran variedad de componentes orgánicos presentes en la vinaza. Por lo tanto, estas enzimas contribuyen directamente a la disminución del contenido de fenoles, de la DBO₅ y la DQO. Además, los HL utilizan los azúcares residuales presentes en la vinaza como fuente de carbono, lo que también permite reducir parte de la DBO₅ y la DQO.

En las publicaciones se encontraron dos reportes de estudios respecto al tratamiento de vinaza mezcalera. Robles-González et al. (2010) aplicaron en laboratorio un proceso de ozonación seguido de un proceso biológico aerobio para depurar VM. En la etapa de ozonación con periodos de contacto de 1.5 horas, lograron remociones de 4.5-11% de la DQO, e intervalos de remoción de 16-32% y 48-83% de compuestos aromáticos y fenoles (expresado como ácido gálico), respectivamente. En la etapa biológica aerobia, lograron una remoción del 84% de la DQO en vinaza con previa ozonación, para una máxima remoción total del tratamiento combinado del 87% de la DQO. Por otra parte, Villalobos-Castillejos et al. (2009), a nivel matraz trataron vinazas mezcaleras mediante un proceso anaerobio, en el que aplicaron una velocidad de carga orgánica de 952 mgO₂/L-día en el medio a tratar, el cual consistía de 10% de vinaza mezcalera (v/v) y 90% de agua residual sintética, y obtuvieron remociones de DQO de 80-82% a partir del día 40 del periodo de tratamiento hasta el día 100 del mismo. Los resultados del presente trabajo son comparables a los reportados por Robles-González et al. (2010), con remociones totales de DQO que superan el 80%, y son superiores a los reportados por Villalobos-Castillejos et al. (2009), que usaron vinaza diluida para el desarrollo experimental.

7.12 Determinación de la concentración de fenoles en muestras de vinaza mezcalera cruda, y en muestras de los diferentes tratamientos

La VMC presentó una concentración de fenoles de 70.56 µg/mL, y la VMTA 20.1 µg/mL. El tratamiento fisicoquímico fue bastante efectivo para disminuir el contenido de fenoles, ya que logró remover 56% de los fenoles presentes en la vinaza cruda, evidenciando la capacidad del alginato para remover fenoles. La solubilización del alginato previo a su

gelificación es muy importante para que los sitios de interacción de sus moléculas estén disponibles para interactuar con la materia orgánica. Esto permite que sea atrapada al momento de la gelificación del alginato. La biorremediación de VMC con HL también logró eliminar hasta 73.48% de la concentración de fenoles al emplear a *T. trogii* 8154, y hasta un 71.9% usando a *P. ostreatus*. Las remociones totales de fenol obtenidas con los tratamientos combinados fueron de 85.13% empleando a *T. trogii* 8154 en la biorremediación y de 82.66% usando a *P. ostreatus* 7992. Se observó en los tratamientos que altas concentraciones de fenol en la vinaza promueven que los HL remuevan mayores cantidades de fenol. Estos resultados muestran la capacidad de ambas cepas de HL para biodegradar fenoles, aún a altas concentraciones, gracias a la actividad de sus enzimas ligninolíticas extracelulares. Se sabe que los compuestos fenólicos dificultan el tratamiento de aguas residuales por digestión anaerobia y se caracterizan por poseer propiedades antimicrobianas y fitotóxicas (Robles-González et al. 2012, García-García et al. 1997). La remoción de compuestos fenólicos debe ser a través de un proceso biológico aerobio con hongos, los cuales facilitan la degradación de la vinaza (García-García et al. 1997) y disminuyen su toxicidad. Por esta razón, los HL son organismos muy útiles con fines ambientales para remover este tipo de compuestos. Por otra parte, los controles con 100% de VMC, 100% y 75% de VMTA presentaron una reducción de la concentración de fenoles, en 7.04, 7.47% y 8.85% respectivamente, y puede ser atribuida a la oxidación atmosférica (Strong 2010), ocurrida durante los 21 días de tratamiento. La remoción de fenoles de la vinaza puede ser susceptible de incrementarse suministrando aireación al proceso de biorremediación, pues es de esperarse que las enzimas ligninolíticas tengan mayor disponibilidad de oxígeno para llevar a cabo las reacciones de oxidación de la materia orgánica que incluye a los fenoles.

CONCLUSIONES

1. En el tratamiento fisicoquímico, el alginato remueve sólidos, compuestos fenólicos, DBO₅ y DQO de las vinazas, por lo cual es factible usarlo para remediar vinazas, además de ser un polímero de origen natural biodegradable, económico y no tóxico.
2. Se seleccionaron las cepas *P. ostreatus* 7992 y *T. trogii* 8154 por su capacidad para crecer en vinaza, logrando metabolizar, mineralizar y decolorar los compuestos complejos presentes en ella.
3. *P. ostreatus* 7992 y *T. trogii* 8154 poseen distintos perfiles enzimáticos, y ambas cepas producen lacasa, LiP y MnP bajo las condiciones experimentales de cultivo.
4. El tratamiento combinado permite una mayor remoción de compuestos fenólicos, DQO y DBO₅ de las vinazas.
5. No hay diferencia significativa entre *P. ostreatus* 7992 y *T. trogii* 8154 con respecto a su capacidad de biorremediación de vinazas.
6. Los resultados demuestran que el uso de alginato y los hongos *P. ostreatus* 7992 y *T. trogii* 8154, tienen potencial para remediar vinazas a escala industrial.
7. A pesar de que con los tratamientos aplicados a vinaza tequilera y mezcalera, bajo las condiciones en que fueron realizados se obtuvieron altas remociones de DQO (93.1% y 82.8% respectivamente) y DBO₅ (93% y 92.5% respectivamente), no se logró que las vinazas cumplieran con los límites máximos permisibles de DBO₅ establecidos en las Normas Oficiales Mexicanas NOM-001-SEMARNAT-1996 y NOM-002-SEMARNAT-1996.
8. Para mejorar estos tratamientos es necesario futuras investigaciones sobre la biorremediación con *P. ostreatus* 7992 y *T. trogii* 8154 en condiciones que incluyan el suministro de aireación para incrementar la remoción de contaminantes, así como el diseño de equipo para tratar vinazas a escala piloto y un análisis de costo-beneficio para implementar esta tecnología a nivel industrial.

GLOSARIO

Absorbancia: en espectrofotometría, es la cantidad de luz de una longitud de onda específica, que absorbe una muestra líquida.

Aguas residuales: las aguas de composición variada provenientes de las descargas de usos municipales, industriales, comerciales, de servicios, agrícolas, pecuarios, domésticos, incluyendo fraccionamientos y en general de cualquier uso, así como la mezcla de ellas.

Biopolímeros: son macromoléculas presentes en los seres vivos. Una definición de los mismos los considera materiales poliméricos o macromoleculares sintetizados por los seres vivos. Existen tres principales familias de biopolímeros: proteínas (colágeno, miosina, globulina, etc.), polisacáridos (celulosa, alginatos, etc.) y ácidos nucleicos (ADN, ARN), aunque también hay otros más singulares como los politerpenos entre los cuales está el caucho natural, los polifenoles como la lignina que compone la madera o algunos poliésteres producidos por bacterias.

Biorremediación: cualquier proceso que utilice microorganismos, hongos, plantas o las enzimas derivadas de ellos para retornar un medio ambiente alterado por contaminantes a su condición natural. La biorremediación puede ser empleada para atacar contaminantes específicos del suelo, por ejemplo en la degradación bacteriana de compuestos organoclorados o de hidrocarburos.

Coagulación: proceso que permite incrementar la tendencia de las partículas en el agua a agregarse, para formar coágulos con mayor peso y tamaño para facilitar su separación por precipitación.

Coagulantes: en química de aguas, un coagulante son sales metálicas que reaccionan con la alcalinidad del agua, para producir un coágulo de hidróxido del metal, insoluble en agua, que incorpore a las partículas coloidales, favoreciendo su separación por sedimentación.

Compuestos xenobióticos: compuestos cuya estructura química en la naturaleza es poco frecuente o inexistente debido a que son compuestos sintetizados por el hombre en

el laboratorio. La mayoría han aparecido en el medio ambiente durante los últimos 100 años.

Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅): cantidad de oxígeno consumido por la actividad metabólica de microorganismos, en un periodo de cinco días, a 20°C, considerando la suma de las concentraciones solubles y en suspensión.

Demanda Química de Oxígeno (DQO): cantidad de sustancias orgánicas e inorgánicas susceptibles de ser oxidadas por medios químicos que hay disueltas o en suspensión en una muestra líquida.

Descarga: acción de verter, infiltrar, depositar o inyectar aguas residuales a un cuerpo receptor en forma continua, intermitente o fortuita.

Efluente: La salida o flujos salientes de cualquier sistema que despacha flujos de agua, a un tanque de oxidación, a un tanque para un proceso de tratamiento biológica del agua, etc. Esta es el agua producto dada por el sistema.

Enzimas: son moléculas de naturaleza proteica que catalizan reacciones químicas siempre que sean termodinámicamente posibles, una enzima hace que una reacción química que es energéticamente posible pero que transcurre a una velocidad muy baja, sea cinéticamente favorable, es decir, transcurra a mayor velocidad que sin la presencia de la enzima. En estas reacciones, las enzimas actúan sobre unas moléculas denominadas sustratos las cuales se convierten en moléculas diferentes denominadas productos. Casi todos los procesos en las células necesitan enzimas para que ocurran a unas tasas significativas. A las reacciones mediadas por enzimas se las denomina reacciones enzimáticas.

Espectrofotometría: es el método de análisis óptico más usado en las investigaciones químicas y bioquímicas. El espectrofotómetro es un instrumento que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia.

Fertirrigación: técnica que permite la aplicación simultanea de agua y fertilizantes a través del sistema de riego, que es hoy en día, el método más racional de que disponemos para realizar una fertilización optimizada.

Fitorremediación: la descontaminación de los suelos, la depuración de las aguas residuales o la limpieza del aire interior, usando plantas vasculares. Así pues, se trata de eliminar o controlar las diversas contaminaciones.

Floculación: proceso de aglomeración de partículas coaguladas en el agua, para formar flóculos de mayor peso y tamaño para facilitar su separación por precipitación.

Floculante: en química de aguas, es una sustancia que aglutina sólidos en suspensión, provocando su precipitación. Por ejemplo el alumbre, que es un grupo de compuestos químicos, formado por dos sales combinadas en proporciones definidas una de las sales es el sulfato de aluminio o el sulfato de amonio.

Fotosíntesis: es la conversión de materia inorgánica en materia orgánica gracias a la energía que aporta la luz. En este proceso la energía luminosa se transforma en energía química estable, siendo el adenosín trifosfato (ATP) la primera molécula en la que queda almacenada esa energía química. Con posterioridad, el ATP se usa para sintetizar moléculas orgánicas de mayor estabilidad. Además, se debe tener en cuenta que la vida en nuestro planeta se mantiene fundamentalmente gracias a la fotosíntesis que realizan las algas, en el medio acuático, y las plantas, en el medio terrestre, que tienen la capacidad de sintetizar materia orgánica (imprescindible para la constitución de los seres vivos) partiendo de la luz y la materia inorgánica. Los organismos fotosintéticos fijan en forma de materia orgánica alrededor de 100.000 millones de toneladas de carbono anuales.

Ligninolítico(a): término que se aplica organismos capaces de degradar la lignina, como los hongos de la podredumbre blanca de la madera, o bien a condiciones fisicoquímicas y ambientales que facilitan la degradación de la lignina.

Límite máximo permisible: valor o rango asignado a un parámetro el cual no debe ser excedido en la descarga de aguas residuales. **Cuerpo receptor:** corrientes, depósitos naturales de agua, presas, cauces, zonas marinas o bienes nacionales donde se descargan aguas residuales, así como los terrenos en donde se infiltran o inyectan dichas aguas, cuando puedan contaminar el suelo o los acuíferos.

Medio de cultivo GMY: medio de cultivo apropiado para hongos y levaduras, que contiene entre otros componentes extracto de levadura, peptona de carne y dextrosa.

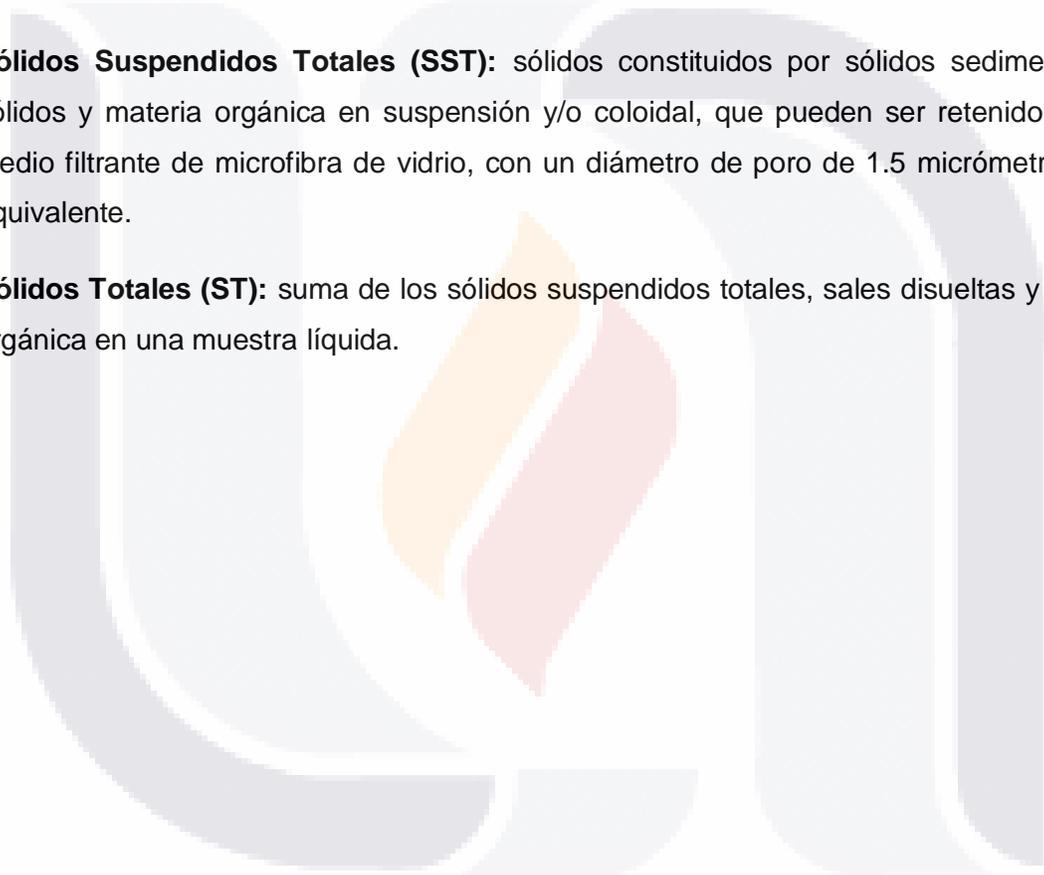
Medio de cultivo PDA: medio de cultivo conformado de agar, papa y dextrosa, es el medio más utilizado para el crecimiento de hongos y levaduras que atacan a las plantas vivas o materia vegetal muerta en descomposición.

Recalcitrante: reacio, obstinado a la resistencia, reincidente, terco.

Sólidos Sedimentables (SS): cantidad de sólidos que en un tiempo determinado (1 hora) se depositan en el fondo de un recipiente (cono Imhoff graduado) en condiciones estáticas. La medición es volumétrica.

Sólidos Suspendidos Totales (SST): sólidos constituidos por sólidos sedimentables, sólidos y materia orgánica en suspensión y/o coloidal, que pueden ser retenidos en un medio filtrante de microfibra de vidrio, con un diámetro de poro de 1.5 micrómetros o su equivalente.

Sólidos Totales (ST): suma de los sólidos suspendidos totales, sales disueltas y materia orgánica en una muestra líquida.



BIBLIOGRAFIA

1. Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K.H., Cavaco-Paulo, A., Gübitz, G.M. (2000). *Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from Trametes hirsuta*, Appl. Environ. Microbiol. 66, 3357-3362.
2. Cámara Nacional de la Industria Tequilera (CNIT) (2013). *Estadísticas 2013*. Disponible en www.tequileros.org.
3. Carvajal-Zarrabal, O., Nolasco-Hipólito, C., Barradas-Dermitz, D.M., Hayward-Jones, P.M., Aguilar-Uscanga, M.G., Bujang, K. (2012). *Treatment of vinasse from tequila production using polyglutamic acid*, J. Env. Manage 95, 66-70.
4. Cedeño, M. (1995). *Tequila production*, Critical Reviews in Biotechnol. 15, 1-11.
5. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ) (2009). *Informe de resultados US11675/2009*, 1-4.
6. Chi, Y., Hatakka, A., Maijala, P. (2007). *Can co-culturing of two white-rot fungi increase lignin degradation and the production of lignin-degrading enzymes?*, International Biodeterioration and Biodegradation 59, 32-39.
7. Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal (COMERCAM) (2011). *Informe anual 2011*.
8. Consejo Regulador del Tequila, A.C. (2004). *Inducción al Tequila*, Editorial Ágata. Texto completo.
9. Consejo Regulador del Tequila, A.C. (2009). *Informe Estadístico 2009*.
10. Dashtban, M., Schraft, H., Syed, T.A., Qin, W. (2010). *Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin*, Int. J. Biochem. Mol. Biol. 1, 36-50.
11. Dávila-Rincón, J., Marriaga-Cabrales, N., Machuca-Martínez, F. (2009). *Remoción de sólidos totales de vinazas por electrocoagulación-electroflotación*, Dyna 158, 41-47.
12. Davila-Vazquez, G., Tinoco, R., Pickard, M.A., Vazquez-Duhalt, R. (2005). *Transformation of halogenated pesticides by versatile peroxidase from Bjerkandera adusta*, Enzyme Microb. Technol. 36, 223-231.
13. Dávila, G. and Vázquez-Duhalt, R. (2006). *Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales*, En: Flores-Herrera, O., Rendón-Huerta, E., Velázquez-López, I. and Oria-Hernández, J. (eds.), Mensaje bioquímico Vol. XXX. UNAM, México, 29-54.
14. Dias, A.A., Bezerra, R.M., Lemos, P.M. and Nazré-Pereira, A. (2003). *In vivo and laccase-catalyzed decolourization of xenobiotic azo dyes by a basidiomycetous*

- fungus: characterization of its ligninolytic system*, World J. of Microbiol. and Biotechnol. 19, (2003), 969-975.
15. Díaz de Apodaca-Díaz, E., Villarán-Velasco, M.C., Río-Pérez, F., Ramírez-López, C.A. and Lorenzo-Ibarreta, L. (2007). *Utilización de adsorbentes basados en quitosano y alginato sódico para la eliminación de iones metálicos: Cu⁺², Pb⁺², Cr⁺³ y Co⁺²*, Revista Iberoamericana de Polímeros 8, 20-37.
 16. Dhoub, A., Ellouz M., Aloui, F., Sayadi, S. (2006). *Effect of bioaugmentation of activated sludge with white-rot fungi on olive mill wastewater detoxification*, Letters in Applied Microbiology 42, 405-411.
 17. Donati, I. and Paoletti, S. (2009). *Alginates: Biology and Applications*, In: *Material properties of Alginates*, Rehm, B.H.A., ed., Springer, Berlin, 1-53.
 18. Draget, K.I. (2000). *Alginates*, In: *Handbook Hydrocolloids*, Phillips, G.O. and Williams, P.A. (eds.), Woddhead Publishing, Cambridge, 379-395.
 19. Edwards, G. A. and Amirtharajah, A. (1985) *Removing color caused by acids*, Journal AWWA 77, 50-57.
 20. Faraco, V., Pezzella, C., Miele, A., Giardina, P., Sannia, G. (2009). *Bio-remediation of colored industrial wastewaters by the white-rot fungi Phanerochaete chrysosporium and Pleurotus ostreatus and their enzymes*, Biodegradation 20, 209-220.
 21. Ferreira, L. F., Aguiar M., Pompeu, G., Messias, T. G., Monteiro, R. R. (2010). *Selection of vinasse degrading microorganisms*, World J. Microbiol. Biotechnol. 26, 1613-1621.
 22. FMC Biopolymer, (2003). *Alginates*, FMC Corporation. Texto completo.
 23. Gacesa, P. (1998). *Bacterial alginate biosynthesis-recent progress and future prospects*, Microbiology 144, 1133-1143.
 24. García-García, I., Bonilla-Venceslada, J.L., Jimenez-Peña, P.R., Ramos-Gómez, E. (1997). *Biodegradation of phenol compounds in vinasse using Aspergillus terreun and Geotrichum candidum*, Wat. Res 31, 2005-2011.
 25. Giardina, P., Palmieri, G. Fontanella, B., Riviaccio, V., Sannia, G. (2000). *Manganese peroxidase isoenzymes produced by Pleurotus ostreatus grown on wood sawdust*, Arch. Biochem. Biophys. 376, 171-179.
 26. Grant, G.F., Morris, E.R., Rees, D.A., Smith, P.J.C., Thom, D. (1973). *Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model*, FEBS Lett. 32, 195-198.

27. Hamman, S. (2004). *Bioremediation capabilities of white rot fungi*, BI570 –review article Spring, 1-12.
28. Hashem, A. and Elhmmali, M.M. (2006). *Modification of sodium alginate for the removal of Cd(II) from aqueous solutions*, Polymer-plastics Technol. Engineering 45, 707-712.
29. Heinfling, A., Bergbauer, M., Szewzyk, U. (1997). *Biodegradation of azo and phthalocyanine dyes by Trametes versicolor and Bjerkandera adusta*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 48, 261-266.
30. Iñiguez-Covarrubias, G. and Peraza-Luna, F. (2007). *Reduction of solids and organic load concentrations in tequila vinasses using polyacrylamide (PAM) polymer flocculant*, Rev. Int. Contam. Ambient. 23, 17-24.
31. Jáuregui, J., Valderrama, B., Albores, A., Vázquez-Duhalt, R. (2003). *Microsomal transformation of organophosphorus pesticides by white rot fungi*, Biodegradation 14, 397-406.
32. Jiménez, A.M., Borja, R., Martín, A. (2003). *Aerobic–anaerobic biodegradation of beet molasses alcoholic fermentation wastewater*, Proc. Biochem. 38, 1275–1284.
33. Kahraman, S.S. and Gurdal, I.H. (2002). *Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi*, Bioresour. Technol. 82, 215-217.
34. Kirk, T.K., Lamar, R., Glaser, J.A. (1990). *The potential of white-rot fungi in bioremediation*, In: *Biotechnology and environmental science-molecular approaches*, S. Mongkolsuk, Lovett, P.S. and Trempy, J.E. (eds.), Proceedings of an international conference on biotechnology and environmental science: molecular approaches, Bangkok, Thailand. New York: Plenum Press, 131-138.
35. Leonowicz, A. and Grzywnowicz, K. (1981). *Quantitative estimation of laccase form in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate*, Enzyme Microb. Technol. 3, 55-58.
36. Li, L., Fang, Y., Vreeker, R., Appelqvist, I., Mendes, E. (2007). *Reexamining the egg-box model in calcium-alginate gels with X-ray diffraction*, Biomacromolecules 8, 464-468.
37. Linerio-Gil, J.E. y Guzmán-Carrillo, A. (2004). *Tratamiento de efluentes y aprovechamiento de residuos*, En: *Ciencia y tecnología del tequila, avances y perspectivas*, Gschaedler-Mathis A.C. (ed.), Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ). Guadalajara, México, 258-284.

38. López-López, A., Davila-Vazquez, G., León-Becerril, E., Villegas-García, E., Gallardo-Valdez, J. (2010). *Tequila vinasses: generation and full scale treatment processes*, Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 9, 109-116.
39. Lozano-Álvarez, J.A., Jáuregui-Rincón, J., Mendoza-Díaz, G., Rodríguez- Vázquez, R., Frausto-Reyes, C. (2009). *Study of sorption equilibrium of biopolymers alginic acid and xanthan with C.I. disperse yellow 54*, J. Mex. Chem. Soc. 53, 59-70.
40. Madrigal, J., Motolinia, C., Arias, A. (2002). *Biomass production of Pleurotus ostreatus and Lentinula edodes on tequila vinasses*, Sánchez et al. (eds.), UAEM, Mushroom Biol. and Mushrooms Products, 331-336.
41. Malherbe, S. and Cloete, T.E. (2002). *Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications*, Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 1, 105-114.
42. Márquez-Rocha, F.J., Hernández-Rodríguez, V.Z., Vazquez-Duhalt, R. (2000). *Biodegradation of soil-adsorbed polycyclic aromatic hydrocarbons by the White rot fungi Pleurotus ostreatus*, Biotechnol. Letters 22, 469-472.
43. Méndez-Acosta, H.O., Snell-Castro, R., Alcaraz-González, V., González-Álvarez, V., Pelayo-Ortiz, C. (2010). *Anaerobic treatment of tequila vinasses in a CSTR-type digester*, Biodegradation 21, 357-363.
44. Meza-Pérez, A., Briones-Méndez, R., Ilangovan, K., (1996). *Floculación-coagulación como postratamiento del efluente de un reactor anaerobio que trata vinazas tequileras*, En: Trabajos presentados durante el 25 Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Ciudad de México, México.
45. Minussi, R.C., Pastore, G.M., Durán, N. (2007). *Laccase induction in fungi and laccase/N-OH mediator systems applied in paper mill effluent*, Bioresour. Technol. 98, 158-164.
46. Miranda, P.M., Benito, G.G., Cristóbal, N.S., Nieto, C.H. (1996). *Color elimination from molasses wastewater by Aspergillus niger*, Bioresour. Technol. 57, 229-235.
47. Montgomery, D.C. (2002). *Diseño y análisis de experimentos*, Ed. Limusa-Wiley, México.
48. Mouso, N., Papinutti, L., Forchiassin, F. (2003). *Efecto combinado del cobre y pH inicial del medio de cultivo sobre la producción de lacasa y manganeso peroxidasa de Stereum hirsutum (Willd) Pers*, Rev. Iberoam. de Micol. 20, 176-178.
49. Narkis, N. and Rebhun, M. (1975). *The mechanism of flocculation processes in the presence of humic substances*, Journal AWWA 2, 101-109.

50. Navarro, A.E., Blanco, D., Llanos, B., Flore, J., Maldonado, H. (2004). *Biorremoción de Cadmio (II) por desechos de algas marinas: optimización del equilibrio y propuesta de mecanismo*, Rev. Soc. Quím. Perú 70, 147-157.
51. Ohmomo, S., Kaneko, Y., Sirianuntapiboon, S., Somchal, P., Atthasampunna, P., Nakamura, I. (1987). *Decolorization of molasses wastewater by a thermophilic strain, Aspergillus fumigates G-2-6*, Agric. Bio. Chem. J. 51, 3339-3346.
52. Pérez, B. y Tello, J. (2002). *Tecnologías de membranas para la obtención de componentes de alto valor añadido a partir de aguas residuales de bodegas*, Disponible en: www.azti.es
53. Pointing, S.B. (2001). *Feasibility of bioremediation by white-rot fungi*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 57, 20-33.
54. Robles-González, V., López-López, E., Martínez-Jerónimo, F., Ortega-Clemente, A., Ruiz-Ordaz, N., Galíndez-Mayer, J., Rinderknecht-Seijas, N., Poggi-Varaldo, H.M. (2010). *Combined treatment of mezcal vinasses by ozonation and aerobic biological post-treatment*, En: Proceedings of 14th International Biotechnology Symposium, Rimini, Italy, in CD ROM.
55. Robles-González, V., Galíndez-Mayer, J., Rinderknecht-Seijas, N., Poggi-Varaldo, H.M. (2012). *Treatment of mezcal vinasses: a review*, J. Biotech. 157, 524-546.
56. Rodríguez-Rincón, F. (2006). *Análisis molecular de la lacasa de Phanerochaete flavidio-alba: caracterización del gen y regulación por fenoles y metales*, Tesis Doctoral, Universidad de Granada, Granada, España.
57. Rodríguez, S., Fernández, M., Bermúdez, R., Morris, H. (2003). *Tratamiento de efluentes industriales coloreados con Pleurotus spp.*, Rev. Iberoam. Micol. 20, 164-168.
58. Rodrigues, J.R. and Lagoa, R. (2006). *Copper ions binding in Cu-alginate gelation*, J. of Carbohydrate Chemistry 25, 219-232.
59. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (SECOFI) (2001). *Norma Mexicana NMX-AA-028-SCFI-2001*, Diario Oficial de la Federación, México.
60. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (SECOFI) (2001). *Norma Mexicana NMX-AA-030-SCFI-2001*, Diario Oficial de la Federación, México.
61. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (SECOFI) (1995). *Norma Oficial Mexicana NOM-004-SCFI-1994*, Diario Oficial de la Federación, México.

62. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (SECOFI) (1995). *Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-1994*, Diario Oficial de la Federación, México.
63. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (SECOFI) (1995). *Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994*, Diario Oficial de la Federación, México.
64. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) (1988). *Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente*, Diario Oficial de la Federación, México.
65. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) (1997). *Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996*, Diario Oficial de la Federación, México.
66. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) (1998). *Norma Oficial Mexicana NOM-002-SEMARNAT-1996*, Diario Oficial de la Federación, México.
67. Sergio, A.M.D. and Bustos, T.Y. (2009) *Biodegradation of wastewater pollutants by activated sludge encapsulated inside calcium-alginate beads in a tubular packed bed reactor*, Biodegradation 20, 709-715.
68. StatPoint Technologies Inc. (2011) *Statgraphics Centurion XVI*. Warrenton, VA, software available at <http://www.statgraphics.com>
69. Strong, P. J. (2010). *Fungal remediation of Amarula distillery wastewater*, World J. Microbiol. Biotechnol. 26, 133-144.
70. Tien, M. and Kirk, T.K. (1988). *Lignin peroxidase of Phanerochaete chrysosporium*, Methods Enzymol. 161, 627-631.
71. Tripathy, T., Bhagat, R.P., Singh, R.P. (2001). *The flocculation performance of grafted sodium alginate and other polymeric flocculants in relation to iron ore slime suspension*, European Polymer J. 37, 125-130.
72. Villa-Mejía, J.M., Zamora-Galván, F., Fausto-Guerra, S., Rodríguez-Macías, R., García-López, P.M. (2006). *Obtención de proteína fúngica a partir de vinazas tequileras*, En: Avances en la investigación científica en el CUCBA, XVII Semana de la Investigación Científica, Universidad de Guadalajara, Zapopan, México, 206-208.
73. Villalobos-Castillejos, F. (2009). *Disminución de la materia orgánica biodegradable presente en vinazas mezcaleras mediante digestión anaerobia*, Tesis de Licenciatura, Universidad Tecnológica de la Mixteca, Oaxaca, México.
74. Wang, P., Hu, X., Cook, S., Begonia, M., Lee, K.S., Hwang, H.M. (2008). *Effect of culture conditions on the production of ligninolytic enzymes y white rot fungi*

Phanerochaete chrysosporium (ATCC 20696) and separation of its lignin peroxidase, World J. Microbiol. Biotechnol. 24, 2205-2212.

75. Wariishi, H.K., Valli, K., Gold, M. (1992). *Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete Phanerochaete chrysosporium. Kinetic mechanism and role of chelators*, J. Biol. Chem. 267, 23688-23695.
76. Yesilada, O., Cing, S., Asma, C. (2002). *Decolorization of the textile dye Astiazon Red FBL by Funalia trogii pellets*, Bioresour. Technol. 81, 155-157.
77. Zhang, Z., Liu, D., Feng, F., Li, J., Li, M., Pang, Q., Chen, K. (2013). *Optimization of the nutrition for biodegradation of vinasse by Aspergillus oryzae using response surface methodology*, Wat. Sci. Technol. 67, 772-779.



ANEXOS

ANEXO A

ANEXO B

ANEXO C

ANEXO D

ANEXO E



ANEXO A

Mensaje original -----

Asunto:Environmental Technology - Decision on Manuscript ID OA-2012-1369.R1

Fecha:2013-12-31 10:24

Remitente:smtiquia@umd.umich.edu

Destinatario:jjareg@correo.uaa.mx

31-Dec-2013

Dear Dr Jauregui:

Ref: High removal of chemical and biological oxygen demand from Tequila vinasses using physicochemical and biological treatments

Our referees have now considered your paper and have recommended publication in Environmental Technology. We are pleased to accept your paper in its current form which will now be forwarded to the publisher for copy editing and typesetting. The reviewer comments are included at the bottom of this letter.

You will receive proofs for checking, and instructions for transfer of copyright in due course.

The publisher also requests that proofs are checked and returned within 48 hours of receipt.

Thank you for your contribution to Environmental Technology and we look forward to receiving further submissions from you.

Sincerely,
Dr Sonia M Tiquia
Regional Editor, Environmental Technology
smtiquia@umd.umich.edu

Referee(s) ' Comments to Author:

Referee: 1

Comments to the Author

This is an excellent manuscript, nicely incorporated all the comments. I approve of its publication.

Referee: 2

Comments to the Author

Please check again over the English as well as typos.

Referee: 3

Comments to the Author

The reviewers' comments were taken into account. The paper can be accepted.

Drive citations to your paper! Please visit

<http://journalauthors.tandf.co.uk/beyondpublication/optimizingcitations.asp> for ideas on how to optimise citations to your research.

There are now over 1050 Taylor & Francis titles available on our free table of contents alerting service! To register for this free service visit: www.informaworld.com/alerting.



High removal of chemical and biochemical oxygen demand from tequila vinasses by using physicochemical and biological methods

Jose Luis Retes-Pruneda^a, Gustavo Davila-Vazquez^b, Iliana Medina-Ramírez^c, Norma Angelica Chavez-Vela^a, Juan Antonio Lozano-Alvarez^a, Felipe Alatristero-Mondragon^b and Juan Jauregui-Rincon^{a*}

^aDepartamento de Ingeniería Bioquímica, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes C.P. 20131, México; ^bDirección de Tecnología Ambiental, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Guadalajara A.C. C.P. 44270, México; ^cDepartamento de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes C.P. 20131, México; ^dDivisión de Ciencias Ambientales, IPICYT, San Luis Potosí, México

(Received 20 December 2012; accepted 31 December 2013)

The goal of this research is to find a more effective treatment for tequila vinasses (TVs) with potential industrial application in order to comply with the Mexican environmental regulations. TVs are characterized by their high content of solids, high values of biochemical oxygen demand (BOD₅), chemical oxygen demand (COD), low pH and intense colour; thus, disposal of untreated TVs severely impacts the environment. Physicochemical and biological treatments, and a combination of both, were probed on the remediation of TVs. The use of alginate for the physicochemical treatment of TVs reduced BOD₅ and COD values by 70.6% and 14.2%, respectively. Twenty white-rot fungi (WRF) strains were tested in TV-based solid media. *Pleurotus ostreatus* 7992 and *Trametes troglia* 8154 were selected due to their ability to grow on TV-based solid media. Ligninolytic enzymes' production was observed in liquid cultures of both fungi. Using the selected WRF for TVs' bioremediation, both COD and BOD₅ were reduced by 88.7% and 89.7%, respectively. Applying sequential physicochemical and biological treatments, BOD₅ and COD were reduced by 91.6% and 93.1%, respectively. Results showed that alginate and selected WRF have potential for the industrial treatment of TVs.

Keywords: alginate; *Pleurotus ostreatus*; *Trametes troglia*; vinasses; bioremediation

1. Introduction

Industrial activities give rise to pollution in municipal sewage systems, soils and superficial waters.[1–3] Industrial wastewaters cause adverse impacts on the environment if no treatment is applied to them prior to their discharge because they may have high organic content, which include dyes, lignin, melanoidins and phenolic compounds; and also inorganic compounds such as acids, salts and metal ions.[1,2,4–6] Some of these compounds are recalcitrant to conventional wastewater treatments and are toxic to cells. The wastewaters generated in alcohol distilleries are an example of this environmental issue.[6] In Mexico, production of tequila from 100% agave in 2011 was 155.3 million litres (40% Alc. Vol.),[7] which generates approximately 1130 million litres of liquid residue from fermented and distilled agave mostly known as vinasses.

Vinasses from different ethanol industries are also produced in other countries.[4–6,8–10] The characteristics of each type of vinasses depend mainly on the raw material used to obtain ethanol.[8,9] Vinasses generated from maize, barley and wheat have a high proportion of insoluble solids, whereas vinasses generated from sugar

cane, sugar beet, grape or sweet sorghum have a high concentration of soluble solids.[8,9] The values of biochemical oxygen demand (BOD₅) and chemical oxygen demand (COD) among different vinasses also varied according to their origin; sugar cane vinasses have BOD₅ and COD of 12,000–16,700 and 25,000–30,400 mg l⁻¹, respectively, grape (wine) vinasses have BOD₅ and COD of 14,500–16,300 and 26,000–50,200 mg l⁻¹, respectively, and sweet sorghum vinasses have BOD₅ and COD of 46,000 and 79,900 mg l⁻¹, respectively.[8,9] Tequila vinasses (TVs) have characteristics such as high content of insoluble and soluble solids, and high BOD₅ and COD. Distillation of fermented agave juice generates 10–12 l of TVs for each litre of Tequila produced, a similar rate at which vinasses from other origins are generated. TVs have: (1) a low pH, (2) dark brown colouration due to the presence of melanoidins, (3) high COD ranging from 60,000 to 100,000 mg l⁻¹ and (4) high BOD₅ ranging from 40,000 to 60,000 mg l⁻¹, [2,11] which include lignocellulosic residues such as polyphenols, polyaromatic compounds, cellulose and lignin. In view of their complex composition, TVs are recalcitrant to conventional treatment; [11] hence their discharge into rivers, lakes

*Corresponding author. Email: jjaureg@correo.uaa.mx

ANEXO B

NMX-AA-028-SCFI-2001. ANÁLISIS DE AGUA - DETERMINACIÓN DE LA DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO EN AGUAS NATURALES, RESIDUALES (DBO₅) Y RESIDUALES TRATADAS - MÉTODO DE PRUEBA.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

El método se basa en medir la cantidad de oxígeno que requieren los microorganismos para efectuar la oxidación de la materia orgánica presente en aguas naturales y residuales y se determina por la diferencia entre el oxígeno disuelto inicial y el oxígeno disuelto al cabo de cinco días de incubación a 20°C.

REACTIVOS Y PATRONES

Todos los productos químicos usados en este método deben ser grado reactivo, a menos que se indique otro grado.

Agua: Debe entenderse agua que cumpla con las siguientes características:

- a) Resistividad, megohm-cm a 25°C: 0,2 mín.;
- b) Conductividad, $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25°C: 5,0 máx., y
- c) pH: 5,0 a 8,0.

5.1 Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4)

5.2 Fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4)

5.3 Fosfato dibásico de sodio heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

5.4 Cloruro de amonio (NH_4Cl)

5.5 Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

5.6 Cloruro de calcio anhidro (CaCl_2)

5.7 Cloruro férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

5.8 Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4)

5.9 Hidróxido de sodio (NaOH)

5.10 Sulfito de sodio (Na_2SO_3)

5.11 2-cloro-6 (triclorometil) piridina

5.12 Glucosa grado patrón primario ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)

5.13 Ácido glutámico grado patrón primario ($\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$)

5.14 Ácido clorhídrico (HCl)

5.15 Acido nítrico (HNO_3)

5.16 Disolución amortiguadora de fosfato. Pesar aproximadamente 8,5 g de fosfato monobásico de potasio (ver inciso 5.1), 21,75 g de fosfato dibásico de potasio (ver inciso 5.2), 33,4 g de fosfato dibásico de sodio heptahidratado (ver inciso 5.3) y 1,7 g de cloruro de amonio (ver inciso 5.4), disolver en 500 mL de agua y aforar a 1 L. El pH de la disolución debe ser de 7,2. Desechar el reactivo (o cualquiera de los siguientes reactivos) si hay algún signo de crecimiento biológico en el frasco de almacenamiento.

5.17 Disolución de sulfato de magnesio. Pesar aproximadamente 22,5 g de sulfato de magnesio heptahidratado (ver inciso 5.5), disolver en agua y diluir a 1 L.

5.18 Disolución de cloruro de calcio. Pesar aproximadamente 27,5 g de cloruro de calcio anhidro (ver inciso 5.6), disolver en agua y diluir a 1 L.

PROCEDIMIENTO

Preparación de agua para dilución

Colocar el volumen requerido de agua en un frasco y añadir por cada litro de agua 1 mL de cada una de las siguientes disoluciones: disolución de sulfato de magnesio (ver inciso 5.17), disolución de cloruro de calcio (ver inciso 5.18), disolución de cloruro férrico (ver inciso 5.19) y disolución amortiguadora de fosfatos (ver inciso 5.16). Preparar el agua de dilución diariamente. Analizar y almacenar el agua de dilución a 20°C , de tal forma que

siempre tenga a mano agua de calidad garantizada. Antes de usar el agua de dilución debe ponerse a una temperatura aproximada de 20°C. Saturar con oxígeno aireando con aire filtrado, libre de materia orgánica durante 1 h por lo menos. Si la muestra presenta alto contenido de biocidas como cloro o se sabe de su bajo contenido de materia orgánica, es necesario inocular la muestra. Si se requiere, sembrar el agua de dilución como se indica en el apartado Inóculo - fuente de siembra.

Control del agua de dilución

Utilizar este procedimiento como una comprobación aproximada de la calidad del agua de dilución. Si la disminución de oxígeno disuelto del agua excede de 0,2 mg/L, obtener agua de mejor calidad mejorando la purificación o usar agua de otra fuente. Alternativamente si se requiere inhibir la nitrificación, almacenar el agua de dilución sembrada en una habitación oscura a temperatura ambiente hasta que la captación de oxígeno disuelto se haya reducido lo suficiente para cumplir los criterios de comprobación del agua de dilución. No se recomienda su almacenamiento cuando la DBO₅ se va a determinar sin inhibir la nitrificación ya que pueden desarrollarse microorganismos nitrificantes durante ese tiempo. Si el agua de dilución no ha sido almacenada para mejorar su calidad, añadir suficiente inóculo como para un consumo de OD de 0,05 mg/L a 0,1 mg/L en cinco días a 20°C. Al Incubar en un frasco Winkler lleno de agua de dilución durante cinco días a 20°C, el consumo no debe ser mayor a 0,2 mg/L y preferiblemente no menor a 0,1 mg/L.

Inóculo

Fuente de la siembra

Es necesario contar con una población de microorganismos capaces de oxidar la materia orgánica biodegradable de la muestra. El agua residual doméstica, los efluentes no clorados o sin desinfección, los efluentes de las plantas de tratamiento de desechos biológicos y las aguas superficiales que reciben las descargas de aguas residuales contienen poblaciones microbianas satisfactorias. Algunas muestras no contienen una población microbiana suficiente (por ejemplo, algunos residuos industriales no tratados, residuos desinfectados, residuos de alta temperatura o con valores de pH extremos). Para tales residuos, sembrar el agua de dilución añadiendo una población de microorganismos. La mejor siembra es la que proviene del efluente de un sistema de tratamiento biológico de aguas residuales. Cuando se usa como siembra el efluente de tratamiento biológico de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

sistema de aguas residuales se recomienda la inhibición de la nitrificación. Cuando no se disponga de ésta, utilizar el sobrenadante del agua residual doméstica después de dejarlo reposar a temperatura ambiente durante al menos 1 h, pero no más de 36 h. Determinar si la población existente es satisfactoria haciendo la prueba de la siembra en una muestra para DBO_5 . El incremento del valor de la DBO_5 indica una siembra exitosa.

Control del inóculo

Determinar la DBO_5 del material de siembra como para cualquier otra muestra. Esto es una siembra control. A partir de este valor y de uno conocido de la dilución del material de siembra (en el agua de dilución) determinar el consumo de OD de la siembra. Lo ideal es hacer diluciones tales de la siembra que la mayor cantidad de los resultados presenten una disminución de al menos el 50 % del OD. La representación de la disminución del OD (mg/L) con respecto a los mililitros de siembra, tiene que ser una línea recta cuya pendiente corresponde a la disminución de OD por mililitro del inóculo. La intersección del eje de las abscisas (OD) representa el consumo del oxígeno causado por el agua de dilución y debe ser inferior a 0,1 mg/L. Para determinar el consumo de OD de una muestra, se resta el consumo de OD de la siembra, del consumo de OD total. La captación de OD total del agua de dilución sembrada debe oscilar entre 0,6 mg/L y 1,0 mg/L.

Pretratamiento de la muestra

Muestras con pH ácidos o básicos

Neutralizar las muestras a un pH entre 6,5 y 7,5 con ácido sulfúrico o hidróxido de sodio de concentración tal que la cantidad de reactivo no diluya la muestra en más del 0,5 %. El pH del agua de dilución sembrada no debe verse afectado por la dilución de la muestra.

Técnica de dilución

Las diluciones que dan lugar a un OD residual mayor de 1 mg/L y una captación de OD de al menos 2 mg/L después de 5 días de incubación, producen los resultados más confiables. Hacer varias diluciones (al menos 3) por duplicado de la muestra preparada para obtener una captación de OD en dicho intervalo. La experimentación con una muestra concreta permite el uso de un número menor de diluciones. Un análisis más rápido tal como la DQO, presenta una correlación aproximada con la DBO_5 y sirve como

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

una guía para seleccionar las diluciones. En ausencia de datos previos, utilizar las siguientes diluciones: de 0 % a 1 % para los residuos industriales fuertes, de 1 % a 5 % para las aguas residuales sedimentadas y crudas, del 5 % al 25 % para el efluente tratado biológicamente y del 25 % al 100 % para las aguas superficiales contaminadas.

Diluciones preparadas directamente en frascos tipo Winkler. Utilizando una pipeta volumétrica, añadir el volumen de muestra deseado a frascos Winkler individuales de 300 mL. Añadir cantidades adecuadas del material de siembra a los frascos tipo Winkler o al agua de dilución. Llenar los frascos con suficiente agua de dilución, sembrada si es necesario, de forma que la inserción del tapón desplace todo el aire, sin dejar burbujas. No realizar diluciones mayores de 1:300 (1 mL de la muestra en un frasco). Determinar el OD inicial en uno de los frascos de cada una de las diferentes diluciones. En los frascos de los duplicados de cada una de las diluciones, Ajustar herméticamente el tapón, poner un sello hidráulico y la contratapa e incubar durante 5 días a 20°C.

Determinación del OD inicial

Método yodométrico

La determinación del OD inicial se realiza por medio del método yodométrico de azida modificado, de acuerdo a lo establecido en la norma mexicana NMX-AA-012-SCFI (ver 2 Referencias).

Blanco del agua de dilución. Emplear un blanco del agua de dilución como un control aproximado de la calidad del agua de dilución no sembrada y de la limpieza de los frascos de incubación. Junto con cada lote de muestras, incubar un frasco de agua de dilución no sembrada. Determinar el OD inicial y final como se especifica en la técnica de dilución y en el apartado Determinación de OD final, respectivamente. El consumo de OD no debe ser mayor de 0,2 mg/L y preferentemente no menor a 0,1 mg/L.

Incubación

Incubar a 20°C \pm 1°C las botellas de DBO₅ que contengan las muestras con las diluciones deseadas, los controles de siembra, los blancos de agua de dilución y el control de glucosa-ácido glutámico. En caso de no contar con contratapas, diariamente se debe verificar que el sello hidráulico esté intacto en cada botella incubada, agregar agua si es necesario

Determinación del OD final

Después de 5 días de incubación determinar el OD en las diluciones de la muestra, en los controles y en los blancos. La medición del OD debe ser realizada inmediatamente después de destapar la botella de Winkler, para evitar la absorción de oxígeno del aire por la muestra.

CÁLCULOS

Calcular la DBO₅

Cuando no se utilice inóculo ni diluciones:

$$\text{DBO}_5 \text{ (mg/L)} = \text{ODi mg/L} - \text{OD}_5 \text{ mg/L}$$

donde:

ODi mg/L es el oxígeno disuelto inicial, y

OD₅ mg/L es el oxígeno disuelto al quinto día.

Cuando se emplea una dilución:

$$\text{DBO}_5 \text{ (mg/L)} = (\text{ODi mg/L} - \text{OD}_5 \text{ mg/L}) / \% \text{ de dilución expresado en decimales}$$

ANEXO C

NMX-AA-030-SCFI-2001. ANÁLISIS DE AGUA - DETERMINACIÓN DE LA DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO EN AGUAS NATURALES, RESIDUALES Y RESIDUALES TRATADAS - MÉTODO DE PRUEBA.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

El principio de este método se basa en la medición cuantitativa de los sólidos y sales disueltas así como la cantidad de materia orgánica contenidos en aguas naturales y residuales, mediante la evaporación y calcinación de la muestra filtrada o no, en su caso, a temperaturas específicas, en donde los residuos son pesados y sirven de base para el cálculo del contenido de estos.

REACTIVOS Y PATRONES

Todos los productos químicos usados en este método deben ser grado reactivo, a menos que se indique otro grado.

Agua: Debe entenderse agua que cumpla con las siguientes características:

- a) Resistividad: megohm-cm a 25°C: 0,2 min.;
- b) Conductividad: $\mu\text{S/cm}$ a 25°C: 5,0 máx., y
- c) pH: 5,0 a 8,0.

4.1 Método reflujó cerrado / método espectrofotométrico

4.1.1 Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4)

4.1.2 Dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)

4.1.3 Sulfato mercúrico (HgSO_4)

4.1.4 Sulfato de plata (Ag_2SO_4)

4.1.5 Biftalato de potasio patrón primario ($\text{HOCC}_6\text{H}_4\text{COOK}$)

4.1.6 Disolución estándar de biftalato de potasio (1 mL = 1 mg de DQO).

Deshacer los grumos y secar el biftalato de potasio (ver inciso 4.1.5) a 120°C. Pesar aproximadamente y con precisión 0,851 g de biftalato de potasio, disolver en agua y aforar a 1 L. Es estable hasta por 3 meses cuando se mantiene en refrigeración y si no se observa crecimiento biológico.

4.1.7 Disolución de sulfato de plata en ácido sulfúrico. Pesar aproximadamente y con precisión 15 g de sulfato de plata (ver inciso 4.1.4) y disolver en 1 L de ácido sulfúrico concentrado (ver inciso 4.1.1). El sulfato de plata requiere un tiempo aproximado de dos días para su completa disolución. La disolución formada debe mantenerse en la obscuridad para evitar su descomposición.

4.1.8 Disolución de digestión A (alta concentración). Pesar aproximadamente y con precisión 10,216 g de dicromato de potasio (ver inciso 4.1.2), previamente secado a 103°C por 2 h, y añadirlos a 500 mL de agua, adicionar 167 mL de ácido sulfúrico concentrado (ver inciso 4.1.1) y aproximadamente 33,3 g de sulfato mercúrico (ver inciso 4.1.3). Disolver y enfriar a temperatura ambiente. Aforar a 1 L con agua.

4.1.9 Disolución de digestión B (baja concentración). Pesar aproximadamente y con precisión 1,021 6 g de dicromato de potasio (ver inciso 4.1.2), previamente secado a 103oC por 2 h, y añadirlos a 500 mL de agua. Adicionar 167 mL de ácido sulfúrico concentrado (ver inciso 4.1.1) y 33,3 g de sulfato mercúrico (ver inciso 4.1.3). Disolver y enfriar a temperatura ambiente. Aforar a 1 L con agua.

PROCEDIMIENTO PARA EL MÉTODO DE REFLUJO CERRADO / MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

Precalear a 150°C el digestor de DQO.

Colocar en los tubos de reacción 1,5 mL de la disolución de digestión A o B (ver incisos 4.1.8 y 4.1.9)

Tomar cuidadosamente 2,5 mL de muestra previamente homogeneizada dentro de los tubos de reacción. Cerrar inmediatamente para evitar que se escapen los vapores, asegurarse de que están herméticamente cerrados. Suavemente invertir los tubos varias veces destapando después de cada inversión para liberar la presión.

NOTA.- La disolución es fuertemente ácida y el tubo se calienta en este proceso, trabajar con guantes aislantes.

Añadir cuidadosamente 3,5 mL de la disolución de digestión respectiva.

Colocar 2,5 mL de agua en un tubo para la determinación del blanco de reactivos.

Colocar todos los tubos en el digestor previamente calentado a 150°C y reflujar por 2 h.

Retirar los tubos del digestor y dejar que los tubos se enfríen a temperatura ambiente, permitiendo que cualquier precipitado se sedimente.

Medir la absorbancia en el espectrofotómetro, previamente calibrado o cuantificar por titulación.

Para aguas que contengan una DQO baja (5 mg/L a 75 mg/L), utilizar la disolución de digestión B (ver inciso 4.1.9). Si el valor de la DQO determinado es más alto que 75 mg/L después de usar estos reactivos, reanalizar la muestra, utilizando la disolución A (ver inciso 4.1.8).

ANEXO D

NMX-AA-034-SCFI-2001. ANÁLISIS DE AGUA - DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS Y SALES DISUELTAS EN AGUAS NATURALES, RESIDUALES Y RESIDUALES TRATADAS - MÉTODO DE PRUEBA.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

El principio de este método se basa en la medición cuantitativa de los sólidos y sales disueltas así como la cantidad de materia orgánica contenidos en aguas naturales y residuales, mediante la evaporación y calcinación de la muestra filtrada o no, en su caso, a temperaturas específicas, en donde los residuos son pesados y sirven de base para el cálculo del contenido de estos.

PROCEDIMIENTO

Preparación de cápsulas de porcelana

Las cápsulas se introducen a la mufla a una temperatura de $550^{\circ}\text{C} \pm 50^{\circ}\text{C}$, durante 20 min como mínimo. Después de este tiempo transferirlas a la estufa a $103^{\circ}\text{C} - 105^{\circ}\text{C}$ aproximadamente 20 min.

Sacar y enfriar a temperatura ambiente dentro de un desecador.

Pesar las cápsulas y registrar los datos.

Repetir el ciclo hasta alcanzar el peso constante, el cual se obtendrá hasta que no haya una variación en el peso mayor a 0,5 mg. Registrar como peso G.

Preparación de la muestra

Sacar las muestras del sistema de refrigeración y permitir que alcancen la temperatura ambiente. Agitar las muestras para asegurar la homogeneización de la muestra.

Medición para sólidos totales (ST) y sólidos totales volátiles (SVT)

- Determinación para sólidos totales (ST):

En función de la cantidad de sólidos probables tomar una cantidad de muestra que contenga como mínimo 25 mg/L de sólidos totales, generalmente 100 mL de muestra es un volumen adecuado.

Transferir la muestra a la cápsula de porcelana que previamente ha sido puesta a peso constante (ver inciso 9.1.4).

Llevar a sequedad la muestra en la estufa a 103°C-105°C.

Enfriar en desecador hasta temperatura ambiente y determinar su peso hasta alcanzar peso constante. Registrar como peso G1.

CÁLCULOS

Calcular el contenido de sólidos totales de las muestras como sigue:

$$\text{ST} = (\text{G1} - \text{G}) * 1\ 000 / \text{V}$$

donde:

ST son los sólidos totales, en mg/L;

G1 es el peso de la cápsula con el residuo, después de la evaporación, en mg;

G es el peso de la cápsula vacía, en mg a peso constante, y

V es el volumen de muestra, en mL.

ANEXO E

NMX-AA-050-SCFI-2001. ANÁLISIS DE AGUA - DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES EN AGUAS NATURALES, POTABLES, RESIDUALES Y RESIDUALES TRATADAS - MÉTODO DE PRUEBA.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

El método está basado en la destilación de los fenoles y la subsecuente reacción de estos con 4-aminoantipirina a un pH de 10 ± 0.1 en presencia de ferricianuro de potasio, formando compuestos de un color amarillo intenso a rojo, los cuales son extraídos de la disolución acuosa con cloroformo midiendo su absorbancia a una longitud de onda de 460 nm o bien leer directamente el complejo formado a 510 nm.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE FENOLES

El procedimiento para cada una de las muestras y el blanco es el siguiente:

A 10 mL de muestra se le añadieron 250 μ L de solución de amoníaco (hidróxido de amonio) 0.5 N y 100 μ L de 4-aminoantipirina al 2% (P/V). Se mezcló y se le agregó 100 μ L de solución de ferricianuro de potasio al 8% (P/V), se mezcló y se dejó reposar 15 minutos. Se transfirió a la celda y se leyó absorbancia a 510 nm.

Preparación de la solución de amoníaco 0.5 N:

1. Tomar 1 mL de la solución original de amoníaco de concentración desconocida y diluirla en 10 mL de agua destilada (10% v/v) y añadir 2 gotas de fenolftaleína, mezclando bien.
2. Titular esta solución de amoníaco empleando HCL 2 N
3. Cálculos

Conc. HCl x Vol HCl = Conc. Hidróxido de amonio x Vol. Hidróxido de amonio

Conc. Hidróxido de amonio = (Conc. HCl x Vol HCl) / Vol. Hidróxido de amonio

El resultado se expresa en Normalidad (N)

Ahora se calcula en base a la N obtenida, cuántos mL de la solución original de hidróxido de amonio (de la que no se conoce su concentración inicial) necesitamos para preparar 100 mL de una solución 0.5 de hidróxido de amonio.

$$\text{mL de solución original} = (100 \text{ mL} \times 0.5) / N \text{ calculada}$$

Después se toman los mL calculados y se afora a 100 mL con agua destilada y se obtienen 100 mL de solución 0.5 N de hidróxido de amonio.

Para obtener una curva estándar de fenol:

Preparar 4 estándares de fenol (10, 25, 50 y 100 ppm de fenol) y el blanco con agua destilada. Tratar 10 mL de los estándares como a las muestras con los mismos reactivos, igual al blanco.

Leer el blanco y los estándares en el espectro a 510 nm, Anotar cada lectura y elaborar una gráfica de Absorbancia vs Concentración de fenol.

Leer después el blanco y cada muestra problema de ambos tipos de vinazas, anotar lecturas e interpolarlas en su gráfica correspondiente para obtener las concentraciones de fenol de cada muestra.

CURVA PATRON DE FENOLES OBTENIDA EN EL LABORATORIO

Concentración de Fenol (µg /mL)	Absorbancia
1	0.121
2	0.253
3	0.389
5	0.622
10	1.280
15	1.820
20	2.393