



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

MAESTRÍA EN INGENIERÍA AMBIENTAL Y TECNOLOGÍAS SUSTENTABLES



HONGOS EXTREMÓFILOS CON
POTENCIALIDADES PARA EL TRATAMIENTO
Y VALORIZACIÓN DE BIOSÓLIDOS MUNICIPALES

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN INGENIERÍA AMBIENTAL Y
TECNOLOGÍAS SUSTENTABLES**

PRESENTA

I.Q. HEILYN PÉREZ SOLER

ASESOR: DR. RAMÓN ALBERTO BATISTA GARCÍA

COMITÉ TUTORAL: DRA. CONSTANZA MACHÍN RAMÍREZ

DRA. ELISABET ARANDA BALLESTEROS

DR. JORGE LUIS FOLCH MALLOL

DRA. BLEND A RAMÍREZ PEREDA



Facultad de Ciencias
Químicas e Ingeniería

CUERNAVACA, MORELOS

OCTUBRE, 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS e INGENIERÍA

Programas educativos de calidad reconocidos por CIEES y CACEI
Certificada en la norma ISO 9000:2008

Maestría en Ingeniería Ambiental y Tecnologías Sustentables.

Cuernavaca, Morelos, a 20 de junio del 2019.

NOMBRAMIENTO DE COMISIÓN REVISORA Y DICTAMEN DE REVISIÓN (T-2)

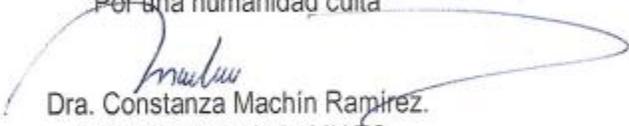
Dr. Ramón Alberto Batista García
Dra. Constanza Machín Ramírez
Dr. Jorge Luis Folch Mallol
Dra. Blenda Ramírez Pereda
Dra. Elisabet Aranda Ballesteros

PRESENTE.

Por este conducto, me permito informarle que ha sido asignado como integrante de la Comisión Revisora de la tesis que presenta la I.Q. Heilyn Pérez Soler titulada: "Hongos Extremófilos con potencialidades para el tratamiento y valorización de Biosólidos Municipales" realizada bajo la dirección del Dr. Ramón Alberto Batista García en el Programa Educativo de Maestría en Ingeniería Ambiental y Tecnologías Sustentables. Agradezco su valiosa participación en esta Comisión y quedo a sus órdenes para cualquier aclaración o duda al respecto.

ATENTAMENTE

"Por una humanidad culta"


Dra. Constanza Machín Ramírez.
Coordinadora de la MIATS.

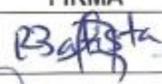
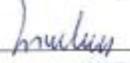
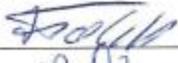
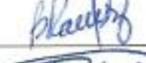
Dra. Constanza Machín Ramírez.

Coordinadora de la MIATS.

PRESENTE.

En respuesta a su amable solicitud para formar parte de la Comisión Revisora de la tesis mencionada, y en la vez realizada la revisión correspondiente, me permito informarle que mi VOTO es:

DICTAMEN

NOMBRE	VOTO	FIRMA
Dr. Ramón Alberto Batista García	Aprobatorio	
Dra. Constanza Machín Ramírez	Aprobatorio	
Dr. Jorge Luis Folch Mallol	Aprobatorio	
Dra. Blenda Ramírez Pereda	Aprobatorio	
Dra. Elisabet Aranda Ballesteros	Aprobatorio	

FCQel - UAEM

MIATS



MAESTRIA EN INGENIERIA
AMBIENTAL Y TECNOLOGIAS
SUSTENTABLES

AGRADECIMIENTO A CONACYT

Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de Hongos (LBMH) del Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Departamento de Ingeniería Civil de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Sherbrooke., bajo la asesoría del Dr. Ramón Alberto Batista García con el apoyo financiero del Programa de Becas Mixtas al extranjero, otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

COMITÉ REVISOR

DR. RAMÓN ALBERTO BATISTA GARCÍA

DR. CONSTANZA MACHÍN RAMÍREZ

DRA. ELISABET ARANDA BALLESTEROS

DR. JORGE LUIS FOLCH MALLOL

DRA. BLEND A RAMÍREZ PEREDA

DEDICATORIA

A mi abuela Doraida que desde el cielo siempre me ilumina.

A mi Tío Juan Félix.

A Dios y mi santo San Lázaro por darme las fuerzas necesarias para seguir adelante.

A mi asesor de tesis Dr. Ramón Alberto Batista García por abrirme las puertas de su laboratorio y los conocimientos brindados.

A los doctores Constanza Machín, Elisabet Aranda, Jordi Folch y Blenda Ramírez.

A mi esposo Guillermo Pérez Cachán, mi todo, por su apoyo incondicional, por amar mis mil versiones, por su comprensión y por ser mi luz cuando todo se torna oscuro.

A mis padres por ser mi razón de ser, porque desde la distancia me motivan a ser mejor cada día, porque todo lo que soy y seré se los debo a ellos.

A mi hermano Kleich, la estrella que algún quisiera llegar a ser, por su amor infinito.

A mis tíos Juan Miguel, mi segundo papá, Lázaro y mi primo Jorgito por su apoyo y cariño.

A mis suegros Silvia y Carlos y a mis cuñados Carlitos y Yaday por su cariño.

A mis mejores amigos Vero, Axel y Jasiel por aceptarme con mis defectos y virtudes, por hacerme reír y apoyarme cuando más lo he necesitado.

A mis cubanas favoritas Adry, Jazmín y Regla.

A mis amigos de la MIATS especialmente a Brenda, Roberto, Sam, Rashad y Enmanuel.

Al Laboratorio de Ingeniería Ambiental de Departamento de Ingeniería Civil de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Sherbrooke, al Dr. Hubert Cabana, Abiram, Olivier y especialmente Arielle gracias por todo.

Al Laboratorio de Biología Molecular de Hongos (LBMH) del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos especialmente a Irina y Giselle.

A los colegas Maykel y Edgar.

A todos los que me apoyaron de una forma u otra en la realización de esta tesis.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	8
ÍNDICE DE FIGURAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS	11
RESUMEN	13
ABSTRACT	14
INTRODUCCIÓN	15
CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	18
1.1. Antecedentes	18
1.1.1. Biosólidos	18
1.1.2. Alternativas para el uso de biosólidos	19
1.1.3. Microorganismos extremófilos	22
1.2. Marco teórico	23
1.2.1. Situación internacional y tratamientos de biosólidos municipales	23
1.2.2. Métodos de disposición	24
1.2.3. Pre-tratamientos utilizados en biosólidos municipales	29
1.2.4. Potencial de los hongos en el tratamiento de biosólidos municipales	31
1.2.5. Tendencias, retos y perspectivas del empleo de hongos en el tratamiento de biosólidos municipales	49
CAPÍTULO 2. PLANTEAMIENTO GENERAL DE LA INVESTIGACIÓN.....	55
2.1. Planteamiento del problema de la investigación	55
2.2. Justificación	57
2.3. Objetivos	58
2.3.1. Objetivo general	58
2.3.2. Objetivos específicos	58
CAPÍTULO 3. DISEÑO Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	60
3.1. Diseño experimental	60
3.2. Estrategia experimental	62
3.3. Materiales y Métodos	63
3.3.1. Material fúngico	63
3.3.2. Tratamiento de biosólidos municipales	63
3.3.3. Cuantificación de la actividad de enzimas extracelulares en tratamientos de biosólidos municipales	64
3.3.3.1. Cuantificación de la actividad aril alcohol oxidasa	65

3.3.3.2. Cuantificación de la actividad esterasa	65
3.3.3.3. Cuantificación de la actividad lacasa.....	66
3.3.3.4. Cuantificación de la actividad lipasa	66
3.3.3.5. Cuantificación de la actividad peroxidasa.....	67
3.3.3.6. Cuantificación de la actividad lignina peroxidasa.....	67
3.3.3.8. Cuantificación de la actividad amilasa, celulasa y xilanasa.....	68
3.3.3.9. Cuantificación de proteínas totales.....	70
3.3.3.10. Cuantificación de azúcares reductores.....	70
3.3.4. Degradación de colorantes Rojo Congo y Naranja II	70
3.3.5. Reducción de demanda química de oxígeno (DQO) en biosólidos municipales.....	71
3.3.6. Remoción de fenoles en biosólidos municipales	71
3.3.7. Remoción de metales pesados en biosólidos municipales.....	72
3.3.8. Remoción de compuestos farmacéuticos en biosólidos municipales.....	73
3.3.9. Ensayos toxicológicos	74
3.3.10. Análisis económico.....	75
3.3.10.1. Costo de producción de enzimas a escala de laboratorio.....	75
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	77
4.1. Tratamiento de biosólidos municipales. Fermentación en estado sólido <i>Aspergillus sydowii</i> -like.....	77
4.1.1. Cuantificación de enzimas extracelulares	77
4.1.2. Optimización de múltiples respuestas.....	82
4.1.3. Degradación de colorantes Congo Rojo y Naranja II	84
4.2. Tratamiento de biosólidos municipales. Fermentación en estado sólido <i>Aspergillus destruens</i>	87
4.2.1. Cuantificación de enzimas extracelulares	87
4.2.2. Optimización de múltiples respuestas.....	90
4.3. Tratamiento de biosólidos municipales mediante fermentación en estado líquido con las cepas <i>Aspergillus sydowii</i> – like y <i>Aspergillus destruens</i>	92
4.3.1. Cuantificación de enzimas extracelulares	92
4.3.2. Cuantificación de azúcares reductores	95
4.3.3. Optimización de múltiples respuestas.....	96
4.3.4. Reducción de demanda química de oxígeno (DQO) en biosólidos municipales.....	98
4.4. Remoción de fenoles en biosólidos municipales	100
4.5. Remoción de metales pesados en biosólidos municipales.....	103
4.6. Remoción de compuestos farmacéuticos en biosólidos municipales	106

4.7. Ensayos toxicológicos	110
4.8. Análisis económico	112
4.8.1. Costo de producción de enzimas a escala de laboratorio	112
CONCLUSIONES	115
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
ANEXOS.....	140

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ventajas y desventajas de tecnologías para la recuperación de metales.	27
Tabla 2. Pre-tratamientos usados en BSM.	30
Tabla 3. Ventajas y desventajas de microorganismos encontrados en biosólidos municipales.	31
Tabla 4. Acción de hongos en diversos efluentes de distintas industrias en la remoción de distintos contaminantes en BSM.	34
Tabla 5. Posible acción de las enzimas en contaminantes recalcitrantes en BSM.	47
Tabla 6. Remoción de distintos contaminantes de varias industrias por enzimas de cepas fúngicas.	48
Tabla 7. Patentes registradas empleando hongos en BSM.	49
Tabla 8. Valor de los niveles de los factores empleados en el diseño Plackett-Burman para el tratamiento de biosólidos.	61
Tabla 9. Valores de germinación (%) y longitud de la radícula (%) de las plántulas de lechuga en biosólidos municipales a tiempo final de fermentación (Tiempo 35) tratados con <i>Aspergillus sydowii</i> y <i>Aspergillus destruens</i> .	111
Tabla 10. Análisis de costos de varias enzimas producidas a partir de diferentes tratamientos de biosólidos municipales con las cepas <i>Aspergillus sydowii</i> – like y <i>Aspergillus destruens</i> .	113

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de flujo de una planta de tratamiento de aguas residuales.	18
Figura 2. Generación total de biosólidos municipales por país.	24
Figura 3. Productos que se obtienen de las distintas tecnologías empleadas en BSM.	29
Figura 4. Mecanismos de acción de los hongos en biosólidos.	41
Figura 5. Diagrama de estrategia experimental.	62
Figura 6. Máxima producción enzimática de diferentes tratamientos de biosólidos utilizando fermentación en estado sólido y la cepa <i>Aspergillus sydowii</i> - like.	77
Figura 7. Diagrama de Pareto para todos los factores en la producción de enzima para $\alpha = 5\%$.	79
Figura 8. Productividad y actividad específica de las enzimas de estudio.	81
Figura 9. Gráficos de Superficie de Respuesta Estimada. A) Enzimas ligninolíticas; B) Enzimas lignocelulolíticas; C) Esterasas.	83
Figura 10. Decoloración de Rojo Congo y Naranja II empleando un cóctel enzimático de los mejores tratamientos en estudio.	84
Figura 11. Máxima producción de enzimas de diferentes tratamientos de biosólidos mediante fermentación en estado sólido con la cepa <i>Aspergillus destruens</i> . A) Enzimas ligninolíticas; B) enzimas lignocelulolíticas; C) Otras enzimas.	88
Figura 12. Gráficos de Superficie de Respuesta Estimada. A) Enzimas ligninolíticas; B) Enzimas lignocelulolíticas; C) Otras enzimas.	91
Figura 13. Máxima producción de enzimas de diferentes tratamientos de biosólidos en fermentación líquida con las cepas <i>Aspergillus sydowii</i> – like y <i>Aspergillus destruens</i> . A) Enzimas ligninolíticas; B) enzimas lignocelulolíticas; C) Otras enzimas.	93
Figura 14. Máxima producción de azúcares reductores de diferentes tratamientos de biosólidos con las cepas <i>Aspergillus sydowii</i> - like y <i>Aspergillus destruens</i> .	96
Figura 15. Gráficos de Superficie de Respuesta Estimada. A) Enzimas ligninolíticas; B) Enzimas lignocelulolíticas; C) Otras enzimas. Mejores tratamientos de <i>Aspergillus sydowii</i> – like.	97
Figura 16. Gráficos de Superficie de Respuesta Estimada. A) Enzimas ligninolíticas; B) Enzimas lignocelulolíticas; C) Otras enzimas. Mejores tratamientos de <i>Aspergillus destruens</i> .	98
Figura 17. Remoción de demanda química de oxígeno en tratamientos de biosólidos con <i>Aspergillus sydowii</i> – like y <i>Aspergillus destruens</i> entre 0 y 21 días de fermentación.	99

- Figura 18.** Remoción de fenoles totales en biosólidos municipales mediante las cepas *A. sydowii* – like (A) y *A. destruens* (B). 101
- Figura 19.** Remoción de metales pesados presentes en biosólidos municipales mediante las cepas *Aspergillus sydowii* – like y *Aspergillus destruens*. 104
- Figura 20.** Remoción de compuestos farmacéuticos en biosólidos municipales mediante las cepas *A. sydowii* – like (A) y *A. destruens* (B). 108

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABTS: 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
- BCA: Ácido bicinconínico
- BSM: Biosólidos municipales
- Cd: Cadmio
- C_{eq} : Costo de equipamiento
- CF: Compuestos farmacéuticos
- CitC: Citocromo C
- Cit P450: Citocromo P 450
- CMC: carboximetilcelulosa
- C_{MC} : Costo de medio de cultivo
- COE: Compuestos orgánicos emergentes
- COP: Compuestos orgánicos persistentes
- C_{op} : Costo de operación
- CPO: Cloroperoxidasa
- Cr: Cromo
- Cu: Cobre
- DQO: Demanda química de oxígeno
- EPA: Environmental Protection Agency
- HBT: 1-hidroxibenzotriazol
- Hg: Mercurio
- HPA: Hidrocarburos policíclicos aromáticos
- K: Potasio
- Lac: Lacasa
- LiP: Lignina peroxidasa
- MnP: Manganeso Peroxidasa
- N: Nitrógeno
- Ni: Níquel
- ONU: Organización de las Naciones Unidas
- P: Fósforo

- Pb: Plomo
- PEG: Polietilenglicol
- PNPP: *p*-nitrofenil palmitato
- PTAR: Plantas de tratamiento de aguas residuales
- PTARM: Plantas de tratamiento de aguas residuales municipales
- SEMARNAT: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
- TARM: Tratamientos de aguas residuales municipales
- TPP: Pirofosfato de tiamina
- VP: Versátil peroxidasa
- Zn: Zinc

RESUMEN

El tratamiento de biosólidos municipales actualmente representa un gran desafío. Los biosólidos se obtienen de plantas de tratamiento de aguas residuales y se consideran residuos orgánicos con altos porcentajes de fenoles, metales pesados, compuestos farmacéuticos y otros contaminantes emergentes. Los microorganismos representan una alternativa para los tratamientos ambientales. En particular, los hongos son microorganismos ubicuos con una vasta maquinaria para degradar, adsorber y/o eliminar xenobióticos como compuestos farmacéuticos, hidrocarburos y pesticidas, entre otros. Las enzimas extracelulares (lacasa, peroxidasa) producidas por hongos ligninolíticos podrían desempeñar un papel importante durante los tratamientos de biosólidos. Sin embargo, los estudios que describen esta utilidad son escasos. Además, los biosólidos también podrían emplearse como sustrato para producir enzimas fúngicas. El objetivo del presente trabajo es: Evaluar el potencial de hongos filamentosos en el tratamiento y valorización de biosólidos municipales. En esta investigación se caracterizaron las actividades enzimáticas aril alcohol oxidasa, amilasa, celulasa, esterasa, lacasa, lignina peroxidasa, lipasas, manganeso peroxidasa, peroxidasa total y xilanasas durante el tratamiento de biosólidos municipales con las cepas *Aspergillus sydowii*-like H1 y *Aspergillus destruens* EXF-10411. Se evaluó la remoción de fenoles, metales pesados y compuestos farmacéuticos de los mejores tratamientos seleccionados a partir del análisis estadístico realizado. Las pruebas toxicológicas post-tratamiento se realizaron mediante pruebas de germinación de plántulas de lechuga (*Lactuca Sativa*). Ambas cepas demostraron ser eficaces en la remoción de fenoles, metales pesados y compuestos farmacéuticos. También fueron capaces de expresar enzimas extracelulares (aril alcohol oxidasa, amilasa, celulasa, esterasa, lacasa, lignina peroxidasa, lipasas, manganeso peroxidasa, peroxidasa total y xilanasas) durante el tratamiento de biosólidos municipales en procesos fermentativos sólidos y líquidos. En este estudio, se desarrolló una estrategia de reducción de costos, que se refirió a la capacidad presentada por las cepas de estudio para producir cócteles enzimáticos utilizando biosólidos municipales como sustrato, lo que redujo considerablemente el costo de producción de enzimas.

ABSTRACT

The treatment of biosolids currently represents a great challenge. Biosolids are obtained from wastewater treatment plants and are considered emerging wastes with high percentages of phenols, heavy metals, pharmaceutical compounds and other emerging contaminants. In recent decades, biosolids treatments have gained great attention. Microbes represent a unique opportunity for environmental treatments. In particular, fungi are ubiquitous microorganisms with a vast machinery to degrade, adsorb and/or eliminate xenobiotics such as pharmaceutical compounds, hydrocarbons and pesticides, among others. Extracellular enzymes (laccase, peroxidases, produced by ligninolytic fungi) could play an important role during biosolids treatments. However, studies describing this utility are scarce. In addition, biosolids could also be used as a substrate to produce fungal enzymes. The aim of the present work is: To evaluate the potential of filamentous fungi in the treatment and valorization of municipal biosolids. In this work the enzymatic activities were characterized: aryl-alcohol oxidase, amylase, cellulase, esterase, laccase, lignin peroxidase, lipases, manganese peroxidase, total peroxidase and xylanase during the treatment of municipal biosolids with *Aspergillus sydowii*-like H1 and *Aspergillus destruens* EXF-10411. The removal of phenols, heavy metals and pharmaceutical compounds from the best treatments selected from the statistical analysis was evaluated. Post-treatment was evaluated through germination trials lettuce (*Lactuca Sativa*). Both strains proved to be effective in removing phenols, heavy metals and pharmaceutical compounds. They were also able to express extracellular enzymes (aryl-alcohol oxidase, amylase, cellulase, esterase, laccase, lignin peroxidase, lipases, manganese peroxidase, total peroxidase and xylanase) during the treatment of municipal biosolids in solid and liquid fermentation processes. In this study, a cost reduction strategy was also developed, which referred to the capacity presented by the study strains to produce enzymatic cocktails using municipal biosolids as a substrate, which considerably reduced the cost of production of enzymes.

INTRODUCCIÓN

La generación de aguas residuales se ha incrementado notablemente en los últimos años (ONU, 2015). La actividad industrial en el marco de esquemas de desarrollo poco comprometidos con la sustentabilidad y el medio ambiente, el incremento de la población mundial, la vulnerabilidad de las leyes ambientales en los países en vías de desarrollo, entre otros elementos, han permitido lamentablemente el aumento acelerado de los volúmenes de aguas residuales provenientes de las actividades urbanas e industriales, sin una gestión integral adecuada para su manejo en términos de tratamientos (De la Peña, 2013).

Las aguas residuales pueden ser una fuente rentable y sostenible de energía, nutrientes y materia orgánica, entre otros subproductos útiles. Los potenciales beneficios de la extracción de dichos recursos no solo repercuten en la salud humana y el medio ambiente, sino también en la seguridad alimentaria y energética, así como en la mitigación del cambio climático. En el contexto de una economía circular, donde se busca un equilibrio entre el desarrollo económico, la protección de los recursos naturales y la sostenibilidad ambiental, las aguas residuales constituyen un recurso abundante y valioso (ONU, 2015).

Los biosólidos municipales (BSM) los cuales se generan de las aguas residuales, presentan diversidad de componentes entre ellos contaminantes y compuestos recalcitrantes (Hyland *et al.*, 2012), que incluyen, compuestos orgánicos, organismos patógenos y metales pesados (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2010, 2012; Verlicchi *et al.*, 2012). Una vez diseminados en el suelo, podrían contaminar el agua subterránea; afectar la biota, la calidad y el uso de la tierra; y esto puede contribuir a su acumulación en cadenas tróficas, afectando la salud y el medio ambiente (Stuart *et al.*, 2012).

Los métodos tradicionales para manejar estos residuales son relleno sanitario e incineración, los cuales han sido sometidos a fuertes regulaciones por el impacto ambiental negativo que pueden generar (Ciešlik *et al.*, 2015; Joo *et al.*, 2015).

Una alternativa viable es el empleo de métodos biológicos los cuales se caracterizan por su fácil manipulación, amigable con el medio ambiente, presión y temperatura moderadas de trabajo lo que incide en menor gasto de energía que las tecnologías convencionales (Pramila & Bhawana, 2012; Wu *et al.*, 2011). Aunque también presenta limitaciones como la viabilidad de los microorganismos en el tiempo bajo las condiciones de operación y largos tiempos de procesos (Mohapatra *et al.*, 2014), campos de

estudio en la actualidad. Dentro de los microorganismos con mayor potencial en la remoción de contaminantes y recuperación de subproductos se encuentran los hongos.

Los hongos en cualquier ecosistema son los mayores descomponedores de polímeros de plantas como la celobiosa, lignina, capaces de colonizar todas las matrices (suelo, agua, aire) en ambientes naturales. También tienen la capacidad de mineralizar y acumular materiales tóxicos y han sido empleados en la remoción de contaminantes en el suelo y en biosólidos municipales (BSM) (Bergauer *et al.*, 2005). Su maquinaria enzimática permite atacar compuestos recalcitrantes de diversas índoles debido a su baja especificidad (Anastasi *et al.*, 2012; Catherine *et al.*, 2016). Sin embargo, a pesar del gran potencial en la degradación de compuestos emergentes, fenoles, hidrocarburos policíclicos aromáticos (Aranda, 2016; Badia-Fabregat *et al.*, 2015), se desconoce los mecanismos de acción e interacción del hongo en el tratamiento de BSM.

Una ventaja de usar estos microorganismos en tratamientos de residuales es la extracción de recursos que pueden ser una fuente de energía renovable y sostenible, así como la obtención de nutrientes y materia orgánica, entre otros subproductos útiles, que pueden ser aplicados en la producción de fertilizantes, construcción y productos de alto valor agregado como enzimas (Chen *et al.*, 2016; Ciešlik *et al.*, 2015). Sin embargo, el costo de producción de las enzimas, además de ciertos aspectos de extracción, purificación y aplicación constituyen un reto actualmente. La producción de enzimas está influenciada principalmente por el tipo y la concentración de la fuente de carbono, la relación carbono/nitrógeno y otros parámetros como la velocidad de agitación, la temperatura, el pH, el volumen de inóculo (Irshad *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014; Caceres *et al.*, 2015). A pesar del gran interés por las enzimas en diversas industrias, los altos costos de producción a veces restringen su uso (Aguieiras *et al.*, 2015). La búsqueda de hongos halófilos y halotolerantes que sean capaces de remover compuestos farmacéuticos, metales pesados y fenoles, así como producir enzimas utilizando como sustrato BSM y de esta forma otorgarle un valor agregado a este residuo constituye un tema de interés.

En estudios realizados por Batista-García y colaboradores se lograron aislar cepas filamentosas, las cuales fueron identificadas como *Aspergillus sydowii*-like H1, *Cadophora* sp. TS2, *Emericellopsis* sp. TS11 y *Pseudogymnoascus* sp. TS12 atendiendo a criterios taxonómicos, micromorfológicos y moleculares. Experimentos realizados mostraron un crecimiento de estas cepas y de *Aspergillus destruens* EXF- 10411 en

presencia de elevadas concentraciones de NaCl y su capacidad para producir enzimas extracelulares como peroxidasas, celulasas, esterasas y lacasas (Batista-García *et al.*, 2014). Adicionalmente estas cepas halófilas crecen en medios hipersalinos con benzo (a) pireno o fenantreno como única fuente de carbono (concentración final 10 ppm) (Batista-García *et al.*, 2017). Cabe destacar que estas características son de gran importancia para el uso de estas cepas en procesos de biorremediación de ambientes contaminados.

Para el caso específico de *Aspergillus sydowii*-like H1, se puede agregar que fue aislado de la fermentación de un lote de bagazo de caña de azúcar. Estudios realizados ante la presencia de diferentes concentraciones de NaCl mostraron, que las actividades enzimáticas no variaban y se evidenciaron actividades de celulasas, esterasas, peroxidasas y lacasas. Batista y colaboradores en 2017 evidenciaron que *A. sydowii*-like H1 es capaz de crecer en presencia de xenobióticos presentes en aguas residuales. *A. destruens* por su parte, cuenta hasta la fecha con poca información. Se conoce que necesita para su crecimiento concentraciones de NaCl de 1.9 M, que fue aislado de la superficie de una pintura de caballete (cuadro) y que tiene la capacidad de soportar estrés a bajas o ninguna concentración de agua, por lo que se considera un bi-extremófilo (xerófilo y halófilo)

Actualmente existen proyectos de investigación en los laboratorios de Fisiología Molecular de Hongos Extremófilos del Centro de Investigación en Dinámica Celular de la UAEM (México) y el Departamento de Ingeniería Civil de la Universidad de Sherbrooke (Canadá), enfocados en determinar las potencialidades de las cepas mencionadas para el tratamiento de BSM. Lo expuesto anteriormente muestra una trayectoria recorrida y la que queda aún por transitar en la búsqueda de alternativas para la valorización de estos residuos orgánicos mediante el empleo de hongos extremófilos filamentosos.

CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1. Antecedentes

1.1.1. Biosólidos

Las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) son instalaciones que tienen como objetivo remover los contaminantes presentes en las aguas residuales, tanto domiciliarias como industriales, con el fin de hacerlas aptas para otros usos en actividades de la vida cotidiana con excepción del consumo humano, es decir, no se puede ingerir o emplear para el aseo personal; o bien para evitar riesgos en la salud humana y daños al ambiente a menos que sean sometidas a un proceso adicional que les permita cumplir con las regulaciones para su reúso (Oropeza, 2006), y/o también disponerlas a un cuerpo receptor natural (mar, ríos o lagos).

El tratamiento del agua trae siempre como consecuencia la formación de lodos residuales, subproductos indeseables difíciles de tratar y que implican un costo extra en su manejo y disposición (Bussi, 2015).

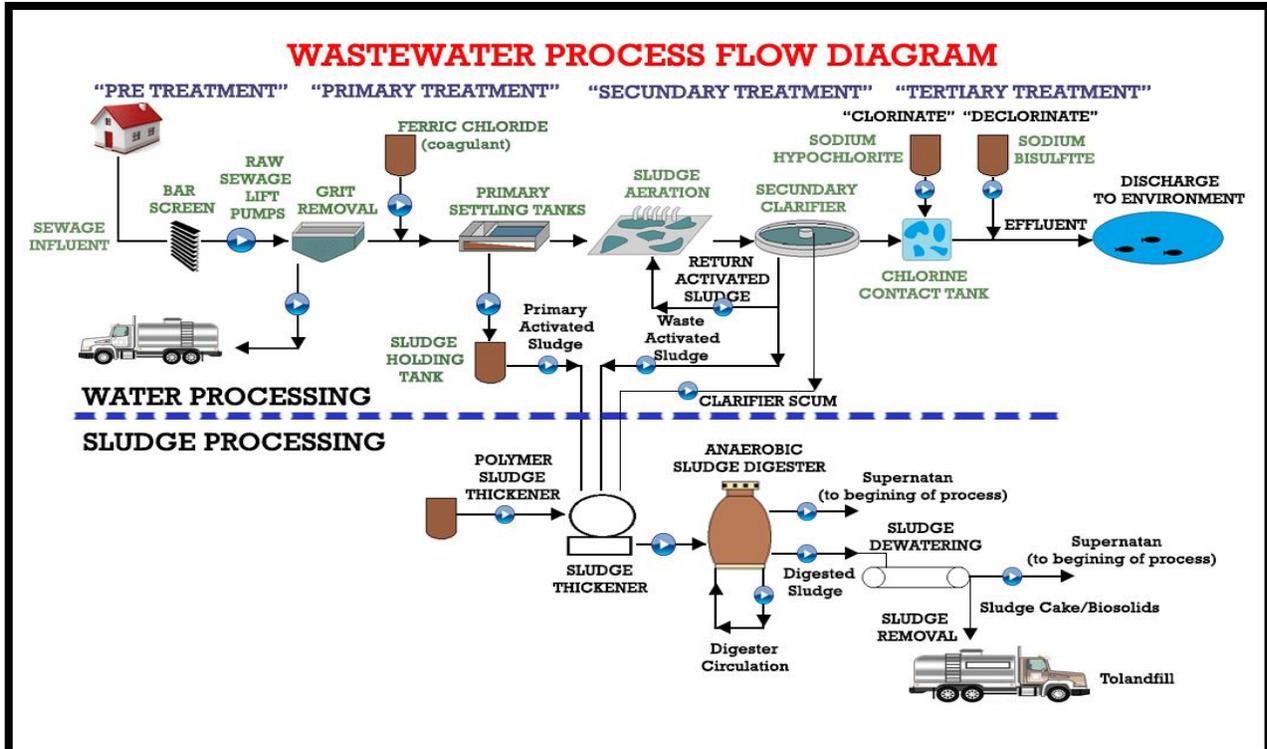


Figura 1. Diagrama de flujo de una planta de tratamiento de aguas residuales (Elaboración propia).

El proceso de lodos es la tecnología de tratamiento de aguas residuales más empleada (Figura 1). Se caracteriza por consumir grandes cantidades de energía y generar grandes cantidades de biosólidos, además de mejorar la calidad de los efluentes (Bussi, 2015).

Los contaminantes que se encuentran en las aguas residuales pasan a las PTAR donde se eliminan en gran medida por el proceso de tratamiento y forman parte de la composición de los subproductos que se generan como los lodos o de acuerdo a la definición de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, biosólidos. Los biosólidos, o como también se le conoce lodo activo, son definidos también como “residuos sólidos, semisólidos o líquidos generados durante el tratamiento de aguas servidas domiciliarias. Los biosólidos incluyen los sólidos removidos durante el tratamiento primario, secundario o avanzado del proceso de tratamiento de aguas servidas y cualquier material derivado de los lodos, excepto las gravillas o cenizas generadas durante el proceso de incineración”; son compuestos viscosos con partículas suspendidas, de color muy oscuro. Otra definición relacionada con los procesos de germinación lo denomina como sólidos orgánicos o lodos generados en el tratamiento del agua residual doméstica y/o industrial que han sufrido un proceso de tratamiento y estabilización, los cuales permiten su utilización benéfica, reducción de nivel de patogenicidad, aumento de poder de fermentación y disminución de capacidad de atracción de vectores.

1.1.2. Alternativas para el uso de biosólidos

El manejo y disposición final de los biosólidos se ha convertido en un problema para la salud y el medio ambiente (González *et al.*, 2014). Como respuesta a la situación planteada, se han realizado diversos estudios sobre el uso de biosólidos en la agricultura (Cicek, 2003; Guzmán & Campos, 2004; Utria-Borges *et al.*, 2008; Eissa *et al.*, 2014), debido a su elevado contenido de materia orgánica y de otros elementos esenciales para el desarrollo óptimo de los cultivos (González *et al.*, 2014). En otras investigaciones (Andrade *et al.*, 2000, Hernández-Herrera *et al.*, 2005) se afirma que los biosólidos mejoran las características físicas, químicas y biológicas del suelo y pueden aumentar el rendimiento de los cultivos, aunque, según He *et al.*, (2005) existen riesgos por el probable contenido en exceso de metales pesados.

Varios estudios que se han realizado sobre el uso de biosólidos en suelos agrícolas se enfocan en el impacto ambiental que puede ser provocado en el suelo, debido al contenido de elementos potencialmente tóxicos que se encuentran en los biosólidos y al riesgo de su potencial ingreso a las redes tróficas (González *et*

al., 2014), lo que pone en peligro la salud humana y animal (He *et al.*, 2005; Torri & Lavado, 2009; González *et al.*, 2014). Entre estos elementos encontramos el zinc (Zn), cobre (Cu), níquel (Ni), cadmio (Cd), plomo (Pb), mercurio (Hg) y cromo (Cr), teniendo todos ellos un gran potencial de acumulación en los tejidos humanos, generando su bio-magnificación en la cadena alimentaria, lo que ha conllevado a preocupaciones medioambientales y sanitarias (Bautista, 2005).

En diversas investigaciones científicas (Banuelos *et al.*, 2007, Odlare *et al.*, 2008) se han realizado estudios referentes a los efectos del uso de biosólidos en suelos agrícolas, donde se mide el impacto de las características que determinan la fertilidad del suelo, el desarrollo de los cultivos y los rendimientos en diferentes tipos de plantas y suelos. Asimismo, se han realizado estudios sobre el cultivo del maíz (Robledo, 2012). En el caso específico del uso de biosólidos en el cultivo de maíz, diferentes científicos (Zamora *et al.*, 1999; Uribe *et al.*, 2002; Montes *et al.*, 2003; Bautista, 2005; Flores-Pardavé *et al.*, 2011; Robledo, 2012; González *et al.*, 2014) han estudiado los biosólidos como material para mejorar el desarrollo del cultivo.

Para Zamora *et al.*, (1999), en su trabajo realizado adicionando lodos residuales de una planta de tratamiento urbana, en el cultivo de maíz, menciona incrementos de un 35% en rendimiento con respecto a la fertilización química convencional, atribuyendo dichos resultados a los nutrientes básicos de N (nitrógeno), P (fósforo) y K (potasio) que contenían el biosólido. Siguiendo a Uribe *et al.*, (2002), en la región agrícola de Delicias (México) se observaron incrementos en rendimiento de forraje verde con la aplicación de biosólidos que fluctuaron entre 11 y 18% en comparación al testigo fertilizado y 27 a 35% en comparación al testigo absoluto. Estos autores concluyeron que en maíz forrajero la dosis más adecuada de biosólidos digeridos anaeróbicamente, desde el punto de vista agronómico y económico, resultó ser 10 toneladas por hectárea de biosólidos en base seca.

Según Montes *et al.*, (2003) realizaron su estudio en Chihuahua (México), analizando los metales tóxicos provenientes de los biosólidos y la contaminación de estos en cultivos de maíz. En este aspecto, Montes *et al.*, (2003) hicieron un análisis comparativo entre un cultivo de maíz tratado a través de biosólidos y un cultivo de maíz tratado con componentes químicos. Los autores concluyeron que los resultados fueron similares, si bien, el porcentaje de mineralización de nitrógeno tendió a reducirse a medida que se incrementó la dosis de biosólidos aplicada, lo que generó un mejor índice de rentabilidad del suelo.

Bautista (2005) en su estudio tenía como objetivos analizar el crecimiento con base en los índices físico técnicos para evaluar el efecto de la aplicación de biosólidos en el cultivo de maíz, determinar el comportamiento del cultivo de maíz aplicando cinco tratamientos de mezclas de biosólidos y musgos de turbera (peat moss) y determinar los índices físicotécnicos y evaluar el efecto que tuvieron los biosólidos en ellos. Los principales resultados obtenidos una vez realizados los ensayos en el cultivo de maíz con respecto a los diferentes tratamientos de biosólidos más musgos de turbera, al considerar la materia seca, el área foliar, la tasa de crecimiento de cultivo y la tasa relativa de crecimiento foliar, concluyó que es posible producir trasplantes de maíz al utilizar el biosólido en cantidades menores al 25%.

Por su parte, Flores-Pardavé *et al.*, (2011) realizaron su estudio sobre la evaluación de colémbolos de suelos agrícolas en cultivos de alfalfa y de maíz adicionados con biosólidos en Aguascalientes (México). Así, mediante trampas pitfall usadas en 2004 y 2005 se recolectaron ocho especies, de las que *Ballistura schoetti*, *Entomobrya ca. triangularis* y *Seira purpurea* fueron las más abundantes. La adición de materia orgánica presente en los biosólidos propició un gran desarrollo poblacional de *B. schoetti* en ambos cultivos. La precipitación fue la variable ambiental mejor relacionada con la abundancia de colémbolos, la diversidad de especies fue baja en todas las condiciones experimentales y la composición de especies fue menor en el cultivo de maíz.

Siguiendo a González *et al.*, (2014), la aplicación de biosólidos, como mejoradores de suelos agrícolas de cultivo de maíz en la localidad de La Paz Tlaxcolpan (México), aumenta los rendimientos de las tierras que los productores destinan para esta práctica. De esta forma, el rendimiento total y las ganancias económicas que obtienen los productores guardan relación directa con la cantidad de superficie de cultivo que poseen. Así, aquellos que tienen mayor cantidad de superficie cultivable pueden aplicar biosólidos a una superficie más amplia, obtener altos rendimientos, destinar mayor cantidad de cosecha a la venta y obtener ingresos económicos, permitiendo un aumento de la calidad de vida de los productores y sus familias. Aunque, el autor también afirma que existe un manejo inadecuado, ineficiente y prácticamente improvisado de los biosólidos por parte de los productores.

1.1.3. Microorganismos extremófilos

Los microorganismos extremófilos tienen como hábitat natural ambientes que antiguamente se consideraban demasiado hostiles para permitir la supervivencia de organismos vivos. Se clasifican con base en la condición física o química extrema del ambiente donde se desarrollan: termófilos (temperatura óptima de crecimiento superior a 45 °C); dentro de éstos se encuentran los hipertermófilos (temperatura óptima de crecimiento superior a 80 °C); psicrófilos (temperatura óptima de crecimiento inferior a 10 °C); acidófilos (pH óptimo de crecimiento menor de 5); alcalófilos (pH óptimo de crecimiento mayor de 8); halófilos (habitan en medios hipersalinos, de 5% a 30% de sal); osmófilos (viven a altas presiones osmóticas); radiófilos (resisten altos niveles de radiación); metalófilos (toleran altas concentraciones de metales pesados); piezófilos (antes llamados barófilos, requieren o toleran presión hidrostática de 40 atm a 60 atm) (Antranikian *et. al.*, 2005; Ferrer *et. al.*, 2007; Jia *et. al.*, 2013; Reed *et. al.*, 2013)

Un prometedor panorama en la biotecnología se ha abierto debido a la gran biodiversidad existente entre los microorganismos extremófilos y su capacidad para sintetizar proteínas y enzimas (extremoenzimas), capaces de funcionar bajo condiciones extremas, ya que gran parte de los procesos industriales ocurren bajo condiciones máximas de temperatura, presión, fuerza iónica, pH y solventes orgánicos. Además, las extremoenzimas pueden ser usadas como un modelo para diseñar y construir proteínas con nuevas propiedades de interés para determinadas aplicaciones industriales, a través de la manipulación genética de microorganismos (Haki & Rakshit, 2003; Eijsink *et al.*, 2004; Jia *et al.*, 2013; Reed *et al.*, 2013)

Desde el punto de vista ambiental, los hongos extremófilos son importantes debido a su capacidad para producir diferentes extremoenzimas, caracterizadas por su termotolerancia, resistencia a cambios de pH, a altas concentraciones de sales, etc (Neifar *et al.*, 2015) (Nigam, 2013). Las propiedades anteriores los convierten en candidatos ideales para el procesamiento y la bioconversión de materias primas como las presentes en las industrias alimentarias, textiles, y en procesos como la biorremediación (Sinha *et al.*, 2014, Singh *et al.*, 2013).

Muchas enzimas hidrolíticas que muestran actividad bajo condiciones extremas han sido reportadas como implicadas en procesos de remediación tales como la contaminación por crudo en condiciones hipersalinas (Naranjo *et al.*, 2013). Diversas especies de hongos han sido caracterizadas como resistentes a ese tipo de

condiciones extremas, entre las que se encuentran *Pestalotiopsis palmarum*, *Lecanicillium muscarium*, *Phanerocheate chrysosporium* y *Aspergillus niger* (Betancor *et al.*, 2013) (Li *et al.*, 2013), capaces de producir extremoenzimas para descomponer hidrocarburos policíclicos aromáticos como sustratos, por lo que podrían ser utilizadas eficazmente como agentes biodegradativos en el proceso de reciclaje de residuos (Narayanan *et al.*, 2013, Maruthi *et al.*, 2013).

1.2. Marco teórico

1.2.1. Situación internacional y tratamientos de biosólidos municipales

Cada año, grandes volúmenes de desechos y aguas residuales son generados a nivel mundial. Se estima que entre 1.7-1.9 billones de toneladas métricas se generan de desechos sólidos municipales anualmente (EPA, 2015). El tratamiento de estos produce grandes cantidades de biosólidos, aparejado a ello se han incrementado las regulaciones y preocupación a nivel global por los efectos de su ubicación final en fuentes de agua, terrestre y su reúso en otras aplicaciones (Aldin *et al.*, 2011; Mulchandani & Westerhoff, 2016).

La Figura 2 muestra que cinco países superan los cuarenta millones de toneladas métricas por año de desechos sólidos generados. Estos países corresponden a tres países desarrollados como Estados Unidos, Japón y Alemania, que corresponden al alto nivel de vida en estos países. En contraste, China y Brasil, países con ingresos medianos a bajos en la población ocupan un lugar prominente en la generación de BSM. En el caso de China, está altamente correlacionado porque es la población mundial más grande.

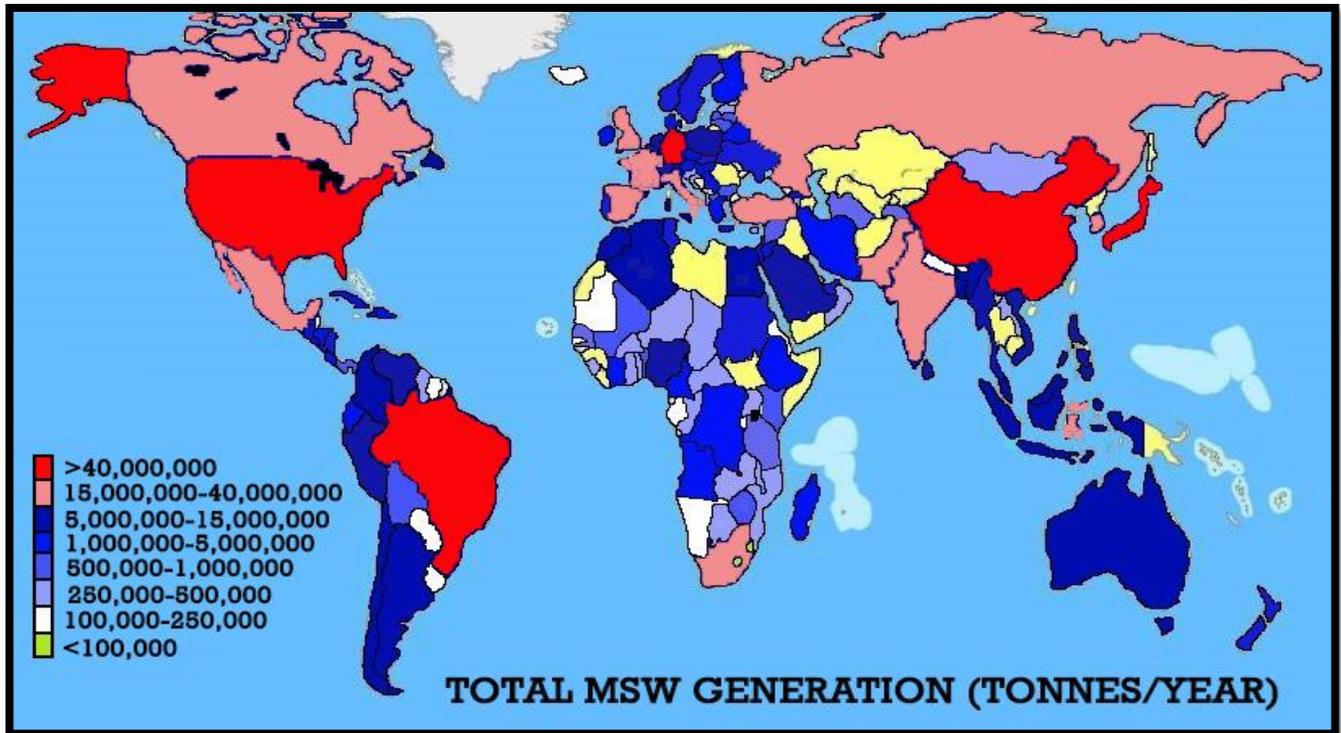


Figura 2. Generación total de biosólidos municipales por país (Elaboración propia).

Brasil, a pesar de ser un país emergente, alcanza niveles de generación BSM per cápita similares a los países desarrollados, lo cual es interesante debido a que posee una población urbana dos veces menor que los cuatro países con la mayor generación de BSM. En general, como se muestra en la Figura 2, la mayoría de los países del mundo generan más de quinientas mil toneladas métricas por año de BSM (Hoornweg & Bhada-Tata, 2012).

Para resolver estas problemáticas, es necesario encontrar alternativas para la disposición final de los biosólidos. Estrategias como recuperación y disposición, reducción, reúso y reciclamiento de los biosólidos se han llevado a cabo.

1.2.2. Métodos de disposición

Rellenos sanitarios es la práctica más generalizada para la disposición de BSM en el mundo (Gersel, 2011), debido a aspectos económicos y facilidades pues no requiere de habilidades de operadores. Sin embargo, está sujeto a varias regulaciones ya que los biosólidos pueden ejercer un efecto adverso en la

flora y fauna del lugar (Parkin, 1993), además en caso de que ocurra inundación por tormentas los biosólidos no deben escurrir del relleno sanitario (EPA, 1994; EPA, 1995). Otros de los requisitos del relleno sanitario es que presente consistencia geológica de forma que no se encuentre en zonas sísmicas, áreas de deslaves y deslizamientos de tierras, evitar también la lixiviación de contaminantes de los biosólidos en el manto freático y de la tierra, además de controlar la concentración de metano por riesgo a explosión (Volpe & Kelley, 1985; EPA, 1994; EPA, 1995). Estos factores hacen que el relleno sanitario sea un método altamente cuestionado. La tendencia a nivel mundial es a disminuir este proceso (Chen et al., 2016). Por otra parte, un aprovechamiento de este proceso es el empleo de celdas de combustible usando microorganismos como bacterias para generar electricidad a partir de lixiviados de vertedero. En un estudio realizado esta tecnología permitió generar electrones a partir de la oxidación de la materia orgánica realizada por las bacterias, sin embargo, la producción de energía a una escala mayor fue insignificante comparándola a escala laboratorio, además el tiempo de producción de energía fue de 52 días muy superior al tiempo de la escala de laboratorio que fue de 12 a 20 días (Damiano *et al.*, 2014).

En el caso de la incineración es un proceso de disposición y reducción de biosólidos empleando altas temperaturas (800–900 °C). El calor generado es usado para convertir el agua en vapor, el cual se podría aprovechar para otros procesos, o para producir electricidad. El problema más serio es concerniente a los problemas ambientales que genera. La incineración de biosólidos produce significantes cantidades de dioxinas, furanos, cenizas, elementos nocivos para la salud humana y animal (Sakamoto, 2001). Se han explorado estrategias para emplear temperaturas superiores, pero esto trae consigo el incremento del costo de operación. Esta tecnología reduce considerablemente el volumen de biosólidos aproximadamente en un 90 % y su peso en un 70%, pero el alto contenido de humedad de los biosólidos y su bajo calor específico requerirá combustible y etapas adicionales (Wang *et al.*, 2008). Una ventaja que tiene este proceso respecto a los rellenos sanitarios es que causa menos contaminación a las aguas subterráneas y al aire (Chen *et al.*, 2016).

En cuanto a la disposición de BSM en los océanos podría traer graves consecuencias en la contaminación de la flora y fauna del mar, el fenómeno de biomagnificación podría traer un serio problema en la salud humana si los metales tóxicos llegan a ser bioacumulados por el cuerpo humano.

El reciclamiento de los lodos se ha reportado en la producción de ladrillos, pavimentos para las carreteras, cementos, para ello el lodo debe poseer ciertas propiedades para su uso como material de construcción (Chen *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2011). Una revisión de estas propiedades se puede encontrar en el trabajo de Show & Tay (1999). Otra forma de reciclamiento es la producción de combustible. Hara & Mino (2008), realizaron un estudio de cuatro alternativas de reciclamiento, enfocados en el gasto energético de los procesos, siendo las opciones de reciclamiento de muy bajo consumo. En el estudio se analiza también la emisión de gases invernaderos como el NO_x incrementando el mismo. No hay una clara comparación entre las opciones de reciclamiento en el estudio. La EPA en el año 2014 ya había reportado también la emisión de grandes cantidades de CH₄ y N₂O por los biosólidos, aspecto negativo socialmente y económico, lo que trae en sí un reto significativo en la investigación de BSM. En Estados Unidos, solamente 250 millones de toneladas de BSM fueron generadas en el 2013, reciclando solo el 34% de esta cifra (EPA, 2015).

Otro reto al que se enfrenta el reciclamiento es la concentración de metales pesados, compuestos organoclorados, emergentes y patógenos en los BSM que son perjudiciales a la salud humana. Lo que hace necesario realizar un pre-tratamiento a los BSM antes de ser reciclados. Este aspecto hace del reciclamiento un cuello de botella. La tendencia en la investigación está encaminada en este tema en la remoción de contaminantes (Li *et al.*, 2016). A la misma vez que es un problema, se convierte también en una oportunidad de obtener 790000 toneladas métricas de metales los cuales podrían ser recuperados de BSM (Lee Bray, 2017). En este aspecto George (2014), reportó que de oro se podía obtener 2.77 millones de toneladas, también se puede recuperar fósforo, nitrógeno, potasio. La cantidad de biosólidos que se genera anualmente, satisface la demanda de fósforo, nitrógeno y potasio en 5, 1.7 y 0.64% lo cual cubrió la demanda global de fertilizantes en el año 2016 (FAO, 2012; Shammass & Wang, 2007). En la Tabla 1 se representa las distintas tecnologías que se pueden emplear para la extracción de estos compuestos.

Tabla 1. Ventajas y desventajas de tecnologías para la recuperación de metales.

Tecnología	Característica	Ventajas	Desventajas	Resultados	Referencias
Hidrotermal licuefacción	Opera entre 5-30% sólidos	Evita los costos por deshidratación y secado, remueve patógenos y contaminantes	Temperaturas superiores a los 200°C y altas presiones de trabajo 10-15MPa	Concentración de metales en un 60-80%	(Leng <i>et al.</i> , 2014, 2016).
Coincineración	En el proceso los metales se concentran y se estabilizan en el lodo	Reducción del volumen del sludge en un 90%, remueve patógenos y destruye contaminantes orgánicos	Altas temperaturas de operación, superiores a los 700°C, emite gases nocivos para la salud humana	Dependiendo de la temperatura y el tiempo de reacción, metal la fijación del metal a la ceniza de lodo puede variar entre 50 y 97%	(Chen & Yan, 2012)
Oxidación química	Forma radicales hidróxidos y peróxidos los cuales transforman compuestos orgánicos complejos en compuestos de bajo peso molecular	No produce gases y elementos tóxicos, no necesita etapas de secado y deshidratación ya que puede operar la biomasa en fase acuosa Elimina patógenos	El proceso se limita en presencia de hierro	35-70 % de los metales en el lodo son oxidables	(Marsden & House, 2009)
Extracción líquida	Mezcla de solventes ácidos , agentes oxidantes, agentes quelantes	Disuelven una amplia gama de metales, descomposición de compuestos orgánicos complejos, se puede extraer lípidos de esta forma al acoplar el proceso del biodiesel	Los desechos ácidos se incrementan, la reusabilidad del lodo disminuye debido a la aplicación de ácidos	Extracción de 12% de lípidos. Remoción completa del contenido orgánico	(Boocock <i>et al.</i> , 1992) (Yuan <i>et al.</i> , 2011)
Tratamiento con hongos	La liberación de enzimas extracelulares, las cuales a través de distintos mecanismos oxidan a compuestos orgánicos complejos	Reduce el uso de químicos, subproductos no tóxicos, bajo costo de operación, toleran altos niveles de toxicidad de metales pesados	Largos tiempos de operación, poco conocimiento de las interacciones de los microorganismos nativos del sludge	Cepas de <i>Acidomyces acidophilus</i> removió 70.3% de As de lodo sludge en minas	(Dos Santos <i>et al.</i> , 2013)

En la Tabla 1 se puede observar que un tratamiento promisorio para recuperar metales, así como contaminantes es el tratamiento con hongos, debido a las ventajas que posee, sobretodo comparando con el resto de las tecnologías donde la operación es simple y sencilla, además del bajo costo de operación.

El empleo de plantas que puedan también acumular metales es otra área de desarrollo en la investigación. Así como la unión simbiótica con hongos, proceso llamado fitorremediación (Göhre & Paszkowski, 2006). Fomina and Gadd, 2014 reportaron la unión simbiótica de plantas y hongos logrando solubilizar Zn, Cd, fosfatos de Cu. En las ramas de este campo se encuentra la fitofiltración, método donde la planta acumula metales pesados, la fitodegradación donde los contaminantes son metabolizados por la planta, aunque presenta un inconveniente la posible formación de intermediarios tóxicos y la fitovolatilización donde las plantas consumen los contaminantes, los cuales son transpirados y liberados a la atmósfera (Ali *et al.*, 2013; Jadia & Fulekar, 2009; Srivastava *et al.*, 2011).

Para la disposición de los biosólidos en la tierra estos necesitan ser estabilizados. Entre las tecnologías que se han empleado para la estabilización se encuentran la digestión anaerobia, estabilización con cal, compost.

Los contaminantes encontrados en las aguas residuales son eliminados y estabilizados por el proceso de digestión anaerobia y se vuelven parte de la composición de los subproductos que se generan como lodo o biosólidos. Este proceso ocurre en cinco etapas (Amador *et al.*, 2015) (clarificación, estabilización, condicionamiento, deshidratación y secado). En el caso de la estabilización es un proceso físico-químico para destruir patógenos y minimizar el mal olor, así como la reducción de vectores potencialmente peligrosos para la salud humana. Dentro de la estabilización se encuentra la aerobia, alcalina, pasteurización, compost y digestión anaerobia, esta última la más empleada.

Varios reportes indican que la digestión anaerobia es limitada, por su pobre biodegradabilidad (Appels *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2013). En base a esto se han desarrollado distintos pre-tratamientos con el objetivo de reducir el tamaño de partícula, solubilizar, mejorar la biodegradabilidad y la pérdida de materia orgánica (Cano *et al.*, 2015) del lodo antes de la digestión anaerobia para lograr una reducción aún superior en el volumen de biosólidos. Pre-tratamientos como físicos, químicos y biológicos se muestran en la Tabla 2 (Abelleira-Pereira *et al.*, 2015; Bolzonella *et al.*, 2012; Ge *et al.*, 2011).

1.2.3. Pre-tratamientos utilizados en biosólidos municipales

Los pre-tratamientos además de que mejoran la disponibilidad de los biosólidos, a la misma vez pueden eliminar contaminantes, desde el punto de vista también de subproductos que contengan alto valor agregado, en la Figura 3 se muestra diferentes tratamientos y oportunidades de productos que se puedan establecer de estas tecnologías.

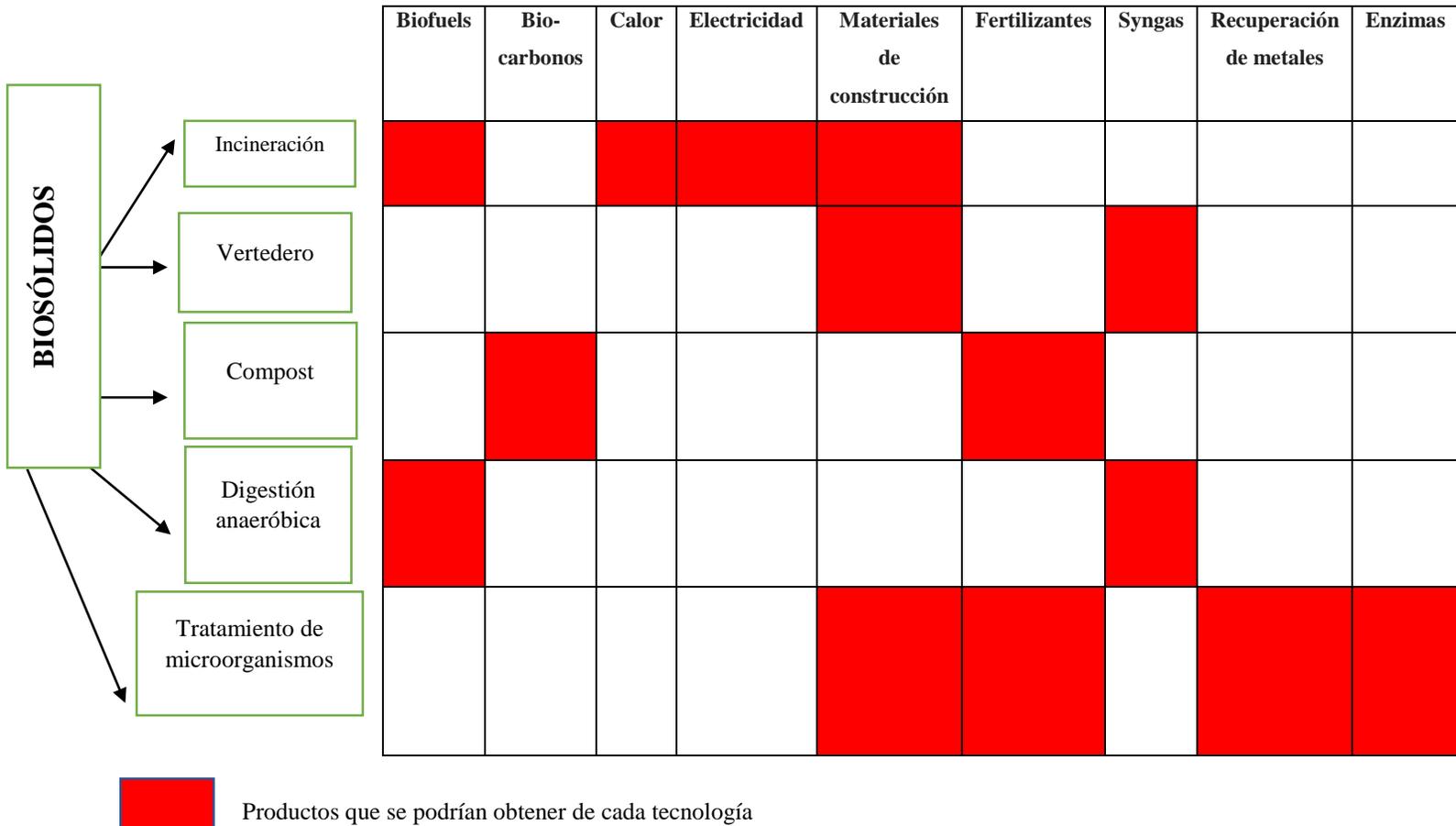


Figura 3. Productos que se obtienen de las distintas tecnologías empleadas en BSM (Elaboración propia).

En la Tabla 2 y Figura 3 se muestra que el empleo de microorganismos es un pre-tratamiento con factibilidad de usarse a escala industrial, no sólo por su bajo costo de operación que implicaría esta tecnología, sino por los productos de alto valor agregado que se podría obtener, como enzimas, las cuales son liberadas por los microorganismos en su acción contra los contaminantes presentes en los biosólidos.

Tabla 2. Pre-tratamientos usados en BSM.

Pre-tratamiento	Tecnología	Tiempo de exposición	Costo	Escala	Ventajas	Desventajas
Físico	Ultrasonido ^a	1-150 min	Alto	Lab/Pilot/ Indust	Incrementa la velocidad de degradación del lodo, se ha usado a escala industrial	Erosión de los sonótrodos, Incremento de la demanda química de oxígeno (DQO) en el efluente
	Térmico ^b	30-60 min	Alto	Lab/Pilot/ Indust	Mejora la sedimentación	Altos costos de operación, Incremento del DQO en el efluente, formación de olores
Químico	Alcalino ^c	1h-8d	Alto	Lab	Mejora la sedimentación Inactivación de patógenos	Corrosión de los equipos, altos costos de operación, efecto adverso en la digestión anaerobia
	Ozonación ^d	5-10 h	Alto	Lab/ Indust	Mejora la sedimentación	Altos costos de operación, incremento del DQO en el efluente
Biológico	Microorganismos ^e	9-48h	Bajo	Lab/Pilot/ Indust	Mejora la deshidratación, bajo costo de operación, mejora la sedimentación	Formación de olores, poco control de la sinergia de los microorganismos

Lab: laboratorio
Pilot: piloto
Indust: Industrial

a: Salsabil *et al.*, 2010; Saha *et al.*, 2011; Kim & Lee, 2012; Zawieja & Wolny, 2013; Martinez-Guerra & Gude, 2015; Trzcinski *et al.*, 2015.

b: Abelleira-Pereira *et al.*, 2015; Fdz-Polanco *et al.*, 2008; Pérez-Elvira & Fdz-Polanco, 2012.

c: KIM *et al.*, 2003; Valo *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2010.

d: Bougrier *et al.*, 2007; Erden & Filibeli, 2011; Goel *et al.*, 2003; Sievers *et al.*, 2004; Silvestre *et al.*, 2015.

e: Hasegawa *et al.*, 2000; Mannan *et al.*, 2005; Sabah & Erkan, 2006; Subramanian *et al.*, 2008.

1.2.4. Potencial de los hongos en el tratamiento de biosólidos municipales

Los tratamientos biológicos han demostrado su eficacia en el reciclamiento y recuperación de componentes de alto valor agregado (Demirel *et al.*, 2005; Forster-Carneiro *et al.*, 2008).

Una variedad de microorganismos se ha encontrado en biosólidos, entre ellos bacterias, hongos, lombrices, virus, protozoos, algas (Khursheed & Kazmi, 2011)

En la Tabla 3 se muestra una comparación entre los microorganismos encontrados en los biosólidos.

Tabla 3. Ventajas y desventajas de microorganismos encontrados en biosólidos municipales.

Microorganismos	Especies encontradas	Ventajas	Desventajas	Referencias		
Hongos	<i>Trichoderma viride</i> , <i>Trichoderma reesei</i> , <i>Mucor hiemalis</i> , <i>Mucor sp</i> , <i>Mucor fuscus</i> ,	-Facilita la formación de lodos floculados y/o lodo granular. -Disminuye DQO.		(Fitzmaurice & Gray, 1989) (McSwain <i>et al.</i> , 2005)		
	<i>Galactomyces geotrichum</i> , <i>Phanerochaete chysosporium</i> , <i>Bjerkandera ajusta</i> , <i>Trichosporun sp</i> ,	-Disminuye la deshidratabilidad. -No presentan inhibición marcada antes antibióticos.	la	-La velocidad de crecimiento es lenta. -Se limita su acción a pH alcalinos.	Fleury, 2007 (Djelal & Amrane, 2013)	
	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus terreus</i> , <i>Fusarium equisetii</i> , <i>Talaromyces spiculisoprus</i> , <i>Penicillium granulatum</i> <i>Penicillium sp</i>	-Probado su tratamiento a escala industrial. -Participa en la remoción y absorción de metales, tintas y compuestos químicos orgánicos e inorgánicos.			(Deshmukh <i>et al.</i> , 2016) (Maza-Márquez <i>et al.</i> , 2016)	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Chloracido-bacteria</i> , <i>Rhodobacter</i> , <i>Saprosiraceae</i> , <i>Acidobacteria</i> , <i>Caldaliresceae</i> , <i>Flavobacteriaceac</i>	-Crecen más rápido que los hongos. -Probado su tratamiento a escala industrial. -Participan en la descomposición de flóculos en el lodo. -Participa en la remoción de metales, tintas y compuestos químicos orgánicos e inorgánicos.		-Bajo catabolismo de contaminantes orgánicos y a pH ácidos. -Son inhibidas en presencia de antibióticos.	(Goel & Noguera, 2006) Fleury, 2007 (Isazadeh <i>et al.</i> , 2016)	
	Algas	<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Scenedesmus spp</i> , <i>Chlorella protothecoides</i>	-Presentan alta velocidad de crecimiento. -Fijan alto contenido de carbono.			
		<i>Cyanophyta anabaena</i> , <i>Chrysophyta navicula</i> , <i>Chlorophyta eudorina</i> <i>Chlophyta pandorina</i> <i>Euglerosphyta euglena</i>	-Liberan oxígeno simbióticamente usado por otros microorganismos. -Participa en la remoción de metales.		-Su crecimiento depende de la intensidad y duración de la luz.	(Muradov <i>et al.</i> , 2015)

Lombrices	<i>Eisenia fétida, Eisenia andrei, Eudrilus eugeniae, Perionyx excavatus, lumbricus rubellus</i>	-Carbono orgánico es Rojoucido. -Disminuye los sólidos suspendidos totales. -Mejora la aireación del suelo. -Disminuye el DQO y DBO ₅ . -Participa en la remoción de metales.	Tiempos muy largos de estabilización >100 días. Baja tolerancia en condiciones salinas y de altas temperaturas.	(Song & Chen, 2009) Hughes <i>et al.</i> , 2009 Iwai <i>et al.</i> , 2013 (Li <i>et al.</i> , 2014) Cieslik <i>et al.</i> , 2014
Protozoos	<i>Giardia lambeli, Amoeba sp, Vorticella microstoma, Aspidisca costata, Vorticella alba</i>	-Elimina bacterias patógenas. -Degradación de materiales orgánicos como la celulosa. - Participa en la disminución de BOD y de la turbidez, clarificando los efluentes por remover materiales suspendidos.	-Pueden Rojoucir la población de bacterias. -Algunas especies son perjudiciales para la salud humana y animal. Produce fiebre, poliomielitis Diarreas, hepatitis Fiebre, infección respiratoria, conjuntivitis Diarrea, hepatitis	Curds & Fey, 1969. (Fayer <i>et al.</i> , 2004) (Niyiyati <i>et al.</i> , 2009)
Virus	Poliovirus Echovirus Adenovirus Reovirus			(Gerba <i>et al.</i> , 2011)

Los hongos son microorganismos heterótrofos, no fotosintéticos, obligados aerobios que requieren de oxígeno disuelto y compuestos orgánicos solubles para su metabolismo. Una de las ventajas que presenta su metabolismo es que requiere la mitad del nitrógeno que requieren las bacterias, y en este caso las aguas residuales son deficientes en este compuesto (More *et al.*, 2010). Otras de sus características es su bajo contenido proteico (20-25%), lo cual los hace más tolerante a pH ácidos que las bacterias y a diferencia de las bacterias pueden crecer a cantidades limitadas de agua. Por su parte las bacterias, participan en la hidrólisis de complejos proteicos y polisacáridos (Isazadesh *et al.*, 2016). En el caso de las algas son microorganismos fotosintéticos, la cual presenta un impacto positivo debido a que produce oxígeno para el crecimiento de nuevas células, sin embargo, genera el mal olor en las aguas residuales (Bitton, 2011). Otro microorganismo que se encuentra en aguas residuales son las lombrices, las cuales pueden sobrevivir a condiciones extremas como alta toxicidad y/o ecosistemas pobres en oxígeno (Paniagua *et al.*, 2016). Dentro de los organismos con una fisiología y morfología diversa se encuentra los protozoos, la mayoría son quimoheterótrofos y generalmente consumen bacterias. Medios de pH ácidos y alcalinos suelen ser condiciones tóxicas para ellos. Otros de los microorganismos que no se pueden catalogar como procariontes o eucariontes son los virus, los cuales pueden infectar a hongos, bacterias, plantas, algas (Bitton, 2011).

Un tema de investigación en el que se debe profundizar es en la interacción simbiótica entre estos microorganismos, poco se conoce de este tema. El nivel trófico de este complejo forma en sí mismo un ecosistema diverso, y multidimensional, donde cada microorganismo compite por su fuente alimenticia. ¿Cómo poder llegar a un balance, dónde se pueda optimizar la acción y la sinergia de cada microorganismo?, es un tema en el que la ciencia se debe enfocar.

Mientras que las bacterias representan los microorganismos más abundantes, los hongos son el mayor grupo de eucariontes. Se estima que hay alrededor de 5.1 millones de especies fúngicas (Blackwell, 2011). Los hongos se encuentran en diversos ambientes, fundamentalmente en el suelo, donde puede adaptarse a una variedad de condiciones y han jugado un papel importante en la descomposición de materia orgánica. Metabólicamente, como se observa en la Tabla 3, existe una gran variedad de hongos reportados en biosólidos. En especies como *Penicillium commune*, *P. lividum*, *P. vulpinum*, *P. janczewskii*, *P. spinulosum* and *P. ranulatum* se han reportado 43×10^3 a 182×10^3 cfu/g (More *et al.*, 2010).

Los hongos han sido empleados en la remoción de contaminantes de diversas industrias, y en el mejoramiento de parámetros de operación en biosólidos como la deshidratación, turbidez entre otros. En la Tabla 4 se representa reportes del empleo de hongos y su acción en diferentes efluentes de diversas industrias.

Tabla 4. Acción de hongos en diversos efluentes de distintas industrias en la remoción de distintos contaminantes en BSM.

Aplicación Industrial	Hongos	Elementos	Resultados	Concentración Inicial(mg/L)	Tiempo de duración	Observación	Referencias
Colorantes	<i>A.niger</i>	Reactive Black-5	88% Remoción	100	60h	El crecimiento del hongo en forma de pellet mejoró la bioacumulación de tintas	(Taskin & Erdal, 2010)
	<i>Trametes pubescens</i>	Congo Rojo	98% Remoción	100	60 min	Se favoreció la adsorción a pH 2. Estudio a escala laboratorio (250 mL)	(Si <i>et al.</i> , 2015)
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Amido Black 10B	98% Remoción	1000	3d	La adición de inductores como almidón y lignina incrementó la velocidad de decolorización. Estudio a escala de laboratorio (250 mL)	(Senthilkumar <i>et al.</i> , 2014)
	<i>Penicillium janthinellum P1</i>	Rojo Congo	>90% Remoción	150	24h	El pH juega un papel fundamental en la decoloración, siendo pH 5 el de mejor resultado, experimentos a escala laboratorio (150 mL)	(Wang <i>et al.</i> , 2015a)
	<i>Penicillium citrinum</i>	U	127.3 mg/g biomasa adsorbida	0.05	5h	Mayor capacidad de adsorción fue a pH 6. Escala laboratorio (100 mL)	(Pang <i>et al.</i> , 2011)
	<i>Ganoderma lucidum</i>	Zr	142.5 mg/g biomasa adsorbida	400	3d	Se inmovilizó el hongo, Se trabajó con biomasa muerta a pH ácidos y 30-70 °C. Escala Laboratorio (100 mL)	(Hanif <i>et al.</i> , 2015)

Metales pesados	<i>Penicillium citrinum</i>	U	127.3 mg/g biomasa adsorbida	0.05	5h	Mayor capacidad de adsorción fue a pH 6. Escala laboratorio (100 mL)	(Pang <i>et al.</i> , 2011)
	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Cr	10.75 mg/g biomasa adsorbida	93.54	720 min	Mejor adsorción a pH 2.5, Escala laboratorio (250 mL), 120 min tiempo ideal de adsorción	(Javaid <i>et al.</i> , 2011)
	<i>Auricularia polytricha</i>	Pb Cd	221 63.3	1000	120min	Mejores Valores de adsorción fue a pH 5, Escala laboratorio(25 mL)	(Huang <i>et al.</i> , 2012)
Fenoles	<i>Trametes versicolor</i> y <i>Pleurotus sajor caju</i>	Fenoles totales	72.9% Remoción	150µM	7d	El tratamiento con lacasa y hongos mostró la mayor remoción con Guayacol y Tyrosol. Escala Laboratorio (100 mL, reactores bacht)	(Justino <i>et al.</i> , 2010)
Parámetros operacionales en biosólidos	<i>Schizophillum commune</i>	Fenol <i>o</i> -clorofenol <i>p</i> -clorofenol	50 86 112 mg/g biomasa adsorbida	200	2h	Experimento llevado acabo e escala laboratorio(125 mL), los mejores valores adsorbidos adsorbida fueron a pH 5	(Kumar & Min, 2011)
	<i>A.niger, Mucor hiemalis and Galactomyces geotrichum</i>	DQO	Disminución 75%		24h	Experimento llevado a escala piloto (110 L) y a escala industrial 1000 L	Djelal & Amrare (2013)
	<i>Penicillium corylophilum and A. niger</i>	DQO y turbidez	Disminución 94% y 98.95%		2d	Experimentos conducidos a escala laboratorio (250 mL), se adicionó al medio harina de trigo y los mejores resultados se obtuvieron a pH ácidos	(Mannan <i>et al.</i> , 2005)
	<i>Mucor sp.</i> GY-1	Deshidratabilidad	Disminución 82.1%		6d	Experimento a escala laboratorio (1 L-2 L)	(Wang <i>et al.</i> , 2015b)

El tratamiento con hongos se ha empleado en residuales de colorantes el cual es uno de los más difíciles residuales de tratar (Akar *et al.*, 2013; Rangabhashiyam *et al.*, 2014). Se estima que la descarga anual de colorantes en el mundo es de $1.5 \times 10^8 \text{ m}^3$ (Ip *et al.*, 2010), estas tintas pueden ser mutagénicas o carcinogénicas (Shen *et al.*, 2009). Otros de los residuales proveniente de la industria de impresión, fotográfica, baterías, minas, electrónica son los metales pesados. Estos pueden causar daños severos a la salud si se acumulan en la cadena alimenticia (Fu & Wang, 2011). La gran capacidad de los hongos de adsorber metales pesados ha sido documentado en la literatura (Harms *et al.*, 2011; Rangabhashiyam *et al.*, 2014). En el caso de los compuestos fenólicos son elementos tóxicos (Hank *et al.*, 2014). La fuente de origen de estos compuestos proviene de la industria petroquímica fundamentalmente, la acción de hongos en la remoción de estos compuestos se ha reflejado en el trabajo de Santos & Linardi (2004) donde las cepas de *Graphium* sp y *Fusarium* sp, mostraron altas velocidades degradación de fenoles. En cuanto a parámetros operacionales como la deshidratación, estudios recientes han revelado que este proceso está regulado por diversos factores como el pH del lodo, carga superficial de las partículas del lodo, tamaño, forma de las partículas y secreción extracelular de sustancias poliméricas (Sheng *et al.*, 2010; Subramanian *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2014).

La eficiencia de los tratamientos fúngicos en la remoción de compuestos emergentes de la industria farmacéutica como antibióticos, antiinflamatorios, citostáticos, desinfectantes, bloqueadores (Luo *et al.*, 2014) y también en los compuestos que interrumpen el sistema endocrino, los cuales afecta la salud de la flora, la fauna y el ser humano; entre los que se encuentran las hormonas naturales estronas y 17β estradiol, estrógenos sintéticos, aditivos industriales como el bifenol A (Cajthaml *et al.*, 2009), que se detectan en concentraciones del orden de ng/ml, ha sido ampliamente abordado en la literatura (Cabana *et al.*, 2007, Marco-Urrea *et al.*, 2010a, 2010b, 2010c).

Como se observa en la Tabla 4, la mayoría de las investigaciones de aplicación de hongos en BSM ha sido a escala laboratorio, por lo que es necesario estudiar a escala piloto e industrial, el comportamiento de la biomasa fúngica en la degradación de xenobióticos (Park *et al.*, 2011; Rodarte-Morales *et al.*, 2012).

1.2.4.1. Mecanismos de acción de los hongos

El mecanismo de acción de los hongos sobre contaminantes, de diversas índoles como metales pesados, fenoles, pesticidas, compuestos orgánicos emergentes es un proceso complejo. Las estructuras químicas de estos compuestos son muy diversas, esto significa que los mecanismos imperantes en la acción de los hongos dependen del tamaño molecular, carga, solubilidad, hidrofobicidad y reactividad del contaminante, así como de la composición del agua residual. La bioadsorción y biodegradación se reportan como los procesos fundamentales en la interacción de los hongos con los contaminantes.

En la primera etapa de estos procesos interviene la pared celular la cual interacciona con el medio exterior, definiendo la interfase entre el microorganismo y su entorno. La pared celular constituye más del 30% del peso del hongo (Dhankhar and Hooda, 2011). Su composición varía marcadamente entre varias especies fúngicas. Estudios realizados demuestran que la pared celular del micelio fúngico contiene principalmente quitina; polímero de n-acetilglucosamina entre un 25–30% de peso seco celular, además contiene 29% glucano, 31% manosa, 13% proteína, 8.5% lípidos. Estos polímeros contienen varios grupos metálicos unidos a aminas, imidazol, fosfatos, sulfatos, sulfhidrilos e hidroxilos (Gadd, 2009). Grupos aminos, amida e hidroxilos se han encontrado en la superficie celular. Es por esta razón que los hongos presentan la propiedad única de enlazar tanto cationes como aniones a su pared celular. Dentro de los fenómenos que pueden ocurrir en estos procesos, se encuentran:

La adsorción física: los intercambios entre moléculas del contaminante y la superficie celular o las paredes celulares de las células a través de intercambios electrostáticos pueden ocurrir. Varias resistencias existen en este proceso, en primera instancia la resistencia de la película del medio donde se encuentre el contaminante y la resistencia a la difusión en el seno de la pared celular donde existe una reacción superficial.

Un estudio interesante en esta parte sería realizar estudios de fenómenos de transporte, de forma que se podría modelar este comportamiento.

Intercambio iónico: la pared celular de los hongos presenta grupos funcionales cargados e intercambian iones con los grupos funcionales de los contaminantes. Colorantes, compuestos aromáticos, presentan diversos grupos funcionales y enlaces insaturados, los cuales presentan potenciales de ionización diferentes a distintos pH. Con el incremento del pH, la electronegatividad neta puede incrementarse debido a la desprotonación de distintos grupos funcionales (Maurya *et al.*, 2006).

Coordinación: la formación de complejos sobre la superficie celular puede ocurrir, después de la interacción entre los grupos activos y metales. Enlaces de coordinación entre metales y grupos aminos, carboxílicos de la pared celular pueden ocurrir.

Precipitación: puede ocurrir por afinidad bioespecífica, un ligando determinado se une con los grupos funcionales de los contaminantes formando agregados. Otro mecanismo podría ser la liberación de polímeros, los cuales ejercen la disminución de la solvatación de los compuestos contaminantes, de esta forma cambiaría su patrón de cargas afectando su solubilidad. Microorganismos pueden excretar varios tipos de metabolitos que interacciona con metales y grupos funcionales del contaminante (Gadd, 2009).

En este tipo de procesos, donde existe tanta variabilidad de contaminantes en los biosólidos, los hongos deberían ser resistentes a altas cargas de contaminantes y no tener mecanismos que protejan una acumulación excesiva dentro de las células, de forma que los mecanismos intracelulares de transporte, excluyan a estos del proceso metabólico normal de la célula (Deng & Wilson, 2001; Koçberber & Dönmez, 2007). En base a esto dos aspectos la interacción de hongos extremófilos y la ingeniería genética, jugarán un papel importante. Enzimas extracelulares termoestables, psicrófilas, halófilas que secreten los hongos se utilizarían para incrementar la estabilidad a pH, salinidad y temperatura. En cuanto a la ingeniería genética una estrategia sería la regulación de genes que codifican a proteínas transportadoras, sitios de unión, la regulación de vías específicas también sería otra opción.

Un resumen de los posibles mecanismos de acción de los hongos en contaminantes, se muestra en la Figura 4. En esta figura se muestran los dos principales mecanismos de acción de los hongos sobre contaminantes: Bioadsorción y Biodegradación.

La capacidad de bioadsorción depende de varios factores como el tipo de biomasa (especie de donde proviene, edad), si la biomasa es muerta o viva, las condiciones de cultivo para la obtención de la biomasa (tamaño de inóculo, volumen de inóculo, tiempo de incubación, medio de cultivo); dentro de los factores físicos químicos se encuentran el pH, variable que más incide en este mecanismo, la cual influye en la composición química de los contaminantes, así como, en la actividad funcional de grupos en los bioadsorbentes y competición con iones presentes en la solución (Vijayaraghavan & Yun, 2008). La fuerza iónica es otra variable, la cual ejerce una reducción de la bioadsorción de los contaminantes cuando esta se incrementa, debido a la competencia de las sales con el adsorbato en los sitios de enlace del bioadsorbente (Fomina & Gadd, 2014). La temperatura por su parte mejora la remoción de contaminantes adsorbidos cuando se incrementa, aunque debe ser a una temperatura limitada, ya que puede dañar la estructura del bioadsorbente. La velocidad de agitación cuando se incrementa, mejora la velocidad de remoción de los contaminantes adsorbidos, disminuyendo la resistencia a la transferencia de masa, pero también tiene un límite ya que a altas velocidades podría dañar la estructura física del bioadsorbente (Park *et al.*, 2010).

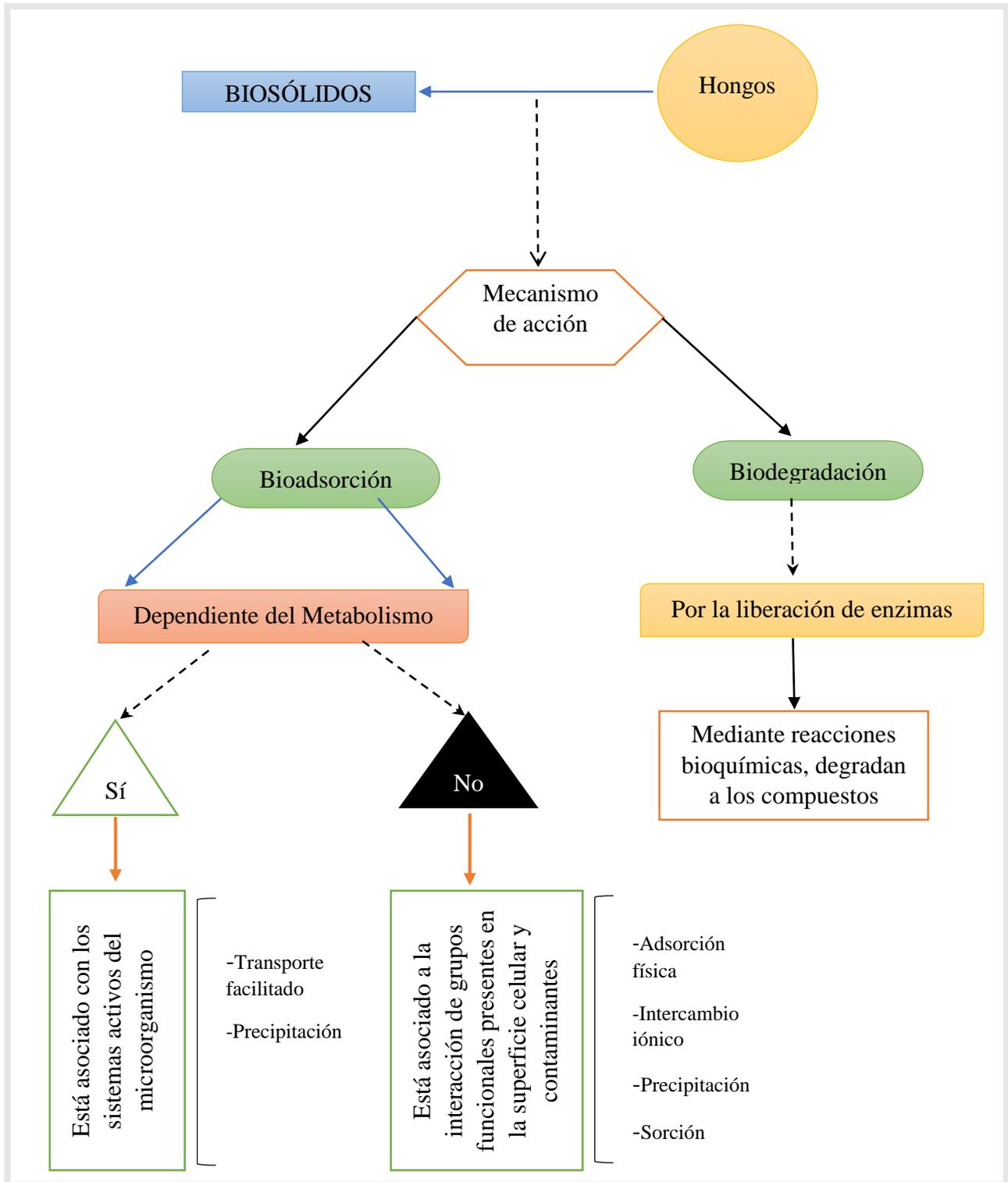


Figura 4. Mecanismos de acción de los hongos en biosólidos (Elaboración propia).

En el caso de la biodegradación los hongos emplean su sistema enzimático, secretando enzimas extracelulares para descomponer polímeros complejos a compuestos de carbono más simples para la biodisponibilidad de la célula. Dentro de los factores que inciden en la biodegradación están la temperatura, factor que coincide generalmente en la máxima degradación con la temperatura óptima de crecimiento del hongo (Wells *et al.*, 2006), el pH relacionado con el transporte del contaminante a través de la membrana celular, el cual es la etapa limitante de la biocatálisis (Kodam *et al.*, 2005); en el caso de la nutrición hay ciertos tipos de efluentes residuales como las tintas que presentan escaso nutrientes, requiriéndolos para mejorar la eficiencia de degradación del hongo, fuentes adicionales como carbono, nitrógeno han sido empleadas (Khan *et al.*, 2013). Otro aspecto es el empleo de mediadores para ciertas actividades de enzimas como lacasas y otras oxidasas que son capaces de oxidar compuestos químicos para formar radicales (Cañas & Camarero, 2010). Los radicales pueden actuar oxidando compuestos que de otra manera las enzimas no podrían oxidarlos.

1.2.4.2. Enzimas con potencial para oxidar contaminantes recalcitrantes

Peroxidasas: Citocromo C(CitC), Manganese Peroxidasa(MnP), Cloroperoxidasa(CPO)

Monooxigenasa: Citocromo P 450 (variante Cit P450 BM3)

Estas enzimas se caracterizan por tener un grupo hemo en su sitio activo. A pesar de las diferencias en las estructuras de las proteínas y en sus sitios activos, el mecanismo catalítico de todas las peroxidasas es similar (Battistuzzi *et al.*, 2010), siendo la reacción global:



Donde la oxidación del sustrato (RH) está acoplada con la reducción del H₂O₂ al H₂O.

Cit C (Citocromo C): Es una enzima que presenta actividad en un amplio intervalo de pH (2-12). Se utiliza como catalizador biológico en diversas reacciones de oxidación de compuestos tóxicos. Su actividad catalítica es similar a la de las hemoperoxidasas, en tanto que requiere de la presencia de peróxido de hidrógeno, contiene también un grupo hemo en su estructura como sitio catalítico, se inactiva por peróxido en ausencia de un sustrato

reductor y, finalmente, su ciclo catalítico está basado en los estados de oxidación del átomo de hierro del grupo prostético hemo.

Aunque no se ha descrito una actividad catalítica del citocromo c en los organismos vivos, se ha reportado su participación en la peroxidación de lípidos y en el rompimiento de hidroperóxidos. Esto sugiere la participación de estas proteínas en procesos celulares involucrados con el estrés oxidativo, en los cuales la oxidación de biomoléculas en presencia de peróxido de hidrógeno puede realizarse mediante un mecanismo de radicales libres, similar al que llevan a cabo los sistemas enzimáticos del citocromo P450.

Específicamente el citocromo c de corazón de caballo ha sido modificada químicamente con polietilenglicol 1 (PEG), mostrando estabilidad y actividad catalítica a temperaturas tan altas como 120 °C, siendo la máxima actividad a 70 y 80 °C (García-Arellano *et al.*, 2002). Estas propiedades hacen del Cit C un buen candidato para catalizar la oxidación de contaminantes recalcitrantes.

MnP (Manganeso Peroxidasa): Esta enzima la produce el hongo *Phanerochaete chrysosporium* en tres variedades de aproximadamente 380 aminoácidos cada una. La enzima requiere Mn(II) para su actividad, el mismo es oxidado a Mn(III), el cual difunde fuera del sitio activo como complejo quelado actuando como mediador difusible altamente reactivo, reaccionando con biopolímeros insolubles de alto peso molecular, como la lignina e iniciando su proceso de oxidación (Hofrichter *et al.*, 2010).

CPO (Cloroperoxidasa): Proviene del hongo *Caldariomyces fumago*, es de las peroxidases más versátiles que se conocen ya que no sólo cataliza las reacciones de halogenación sino también reacciones de transferencia de oxígeno, y peroxidases vía radicales libres, usando peróxido de hidrógeno como agente oxidante en las reacciones (Ruiz, 1998). Esta enzima presenta un alto número de recambio de alrededor de 10^6 (Manoj & Hager, 2001). La CPO es dos veces más rápida que la lignina peroxidasa y la versátil peroxidasa (Longoria *et al.*, 2008). En cuanto a su especificidad, en ausencia de haluros puede oxidar directamente fenoles y anilinas a través del mecanismo clásico de peroxidases. También oxida alcoholes y aldehídos (Hofrichter & Ullrich, 2006). Esta enzima gracias a su alto potencial redox así

como por su baja especificidad es candidata para ser usada en la oxidación de contaminantes recalcitrantes (Ayala & Vázquez-Duhalt, 2004).

LiP (Lignina peroxidasa): Fue descubierta por primera vez en el hongo de podredumbre blanca *Phanerochaete chrysosporium* (Janusz *et al.*, 2013). Son consideradas como verdaderas ligninasas, catalizando la oxidación de la lignina. LiPs son consideradas como glicoproteínas, dependiente del H₂O₂ oxida una amplia variedad de compuestos (Vazquez-Duhalt *et al.*, 1994).

VP (Versátil peroxidasa): enzima híbrida que posee propiedades de la MnP y de la LiP. Se ha obtenido de hongos del género *Pleurotus*, *Bjerkandera*. Ha sido capaz de oxidar Naranja II (OII) y Negro Reactivo 5 (RB5) (Knop *et al.*, 2016).

Oxidasa: Son enzimas que catalizan reacciones de oxidación usando oxígeno molecular como el aceptor de electrones y reduciéndolo a H₂O₂ o a H₂O, sin la incorporación de átomos de oxígeno en el sustrato. Dentro de esta familia tenemos a la lacasa.

Lacasa: La lacasa es una enzima multicobre oxidasa que presenta dos sitios importantes para la catálisis. En el sitio T1 se realiza la sustracción de un electrón del sustrato; en este sitio se encuentra un átomo de cobre coordinado a la proteína a través de residuos de histidina y cisteína. En el sitio T2/T3 se realiza la transferencia de electrones y protones a una molécula de oxígeno, formando agua como producto; en este sitio se encuentran tres átomos de cobre que interactúan entre ellos y que son coordinados a la proteína a través de residuos His-Cys-His. La lacasa cataliza reacciones de oxidación en una gran variedad de compuestos xenobióticos, incluyendo fenoles clorados, pesticidas e hidrocarburos aromáticos policíclicos (Baldrian, 2006). La especificidad de esta enzima puede disminuirse al ser empleada con mediadores, la ventaja de usar los mismos es que pueden oxidar compuestos no enzimáticamente oxidables por la lacasa debido a su alto potencial redox; por tanto, estos mediadores constituyen un vehículo de transporte de electrones ya que una vez oxidado por la enzima y estabilizados en forma de radicales, difunden lejos del centro activo oxidando a

sustratos que por su tamaño o reactividad no son sustratos de la enzima. El HBT (1-hidroxibenzotriazol) es uno de los más eficaces (Bourbonnais *et al.*, 1997).

Cit P450 (Monooxigenasa Citocromo p450): cataliza la hidroxilación de cadenas largas de ácidos grasos saturados e insaturados próximos a los carbonos de la cadena terminal (Jung, 2011). Es una proteína que juega un papel importante en la oxidación de compuestos xenobióticos lipofílicos y por tanto puede nominar a los sistemas enzimáticos OFM, que también se les llama enzimas P-450. El citocromo P-450 es una hemoproteína, contiene un grupo hemo (Fe-protoporfirina IX) como grupo prostético, igual que la hemoglobina. En el grupo hemo, el Fe forma un complejo con los 4 átomos de N de un anillo tetrapirrólico, los otros dos enlaces de coordinación los establece con el S de una CYS de la cadena peptídica y con una molécula de agua. Esta molécula es fácilmente sustituible por O₂ o por un sustrato (RH). El átomo de Fe puede estar oxidado Fe³⁺ o reducido Fe²⁺. El nombre de cit P-450 deriva de su habilidad para unir CO cuando está en la forma reducida (Fe²⁺), formando así un complejo con un máximo de absorbancia a 450 nm.

Un estudio realizado por Cirino & Arnold, 2003 reportó que la mutación por sitio dirigido de la enzima escindiendo el dominio reductasa de la misma implicó la erradicación del uso de cofactores como NADPH; esto permitió que la enzima *in vitro* usara H₂O₂ en lugar de oxígeno y cofactores para hidroxilar sustratos en los extremos de las cadenas (C₁₂-C₁₈) de ácidos grasos con una velocidad de 3000 min⁻¹, esta actividad fue correspondiente a la mutación F87A en el sitio activo. En la quinta generación se obtuvo una mutante, la 21B3, que es 20 veces más activa catalíticamente que la mutante F87A empleando concentraciones de 10 mM de peróxido de hidrógeno y logrando un número de recambio 24 veces mayor para el estireno y 4 veces mayor para el ácido láurico como sustratos, por lo que constituye una candidata para la oxidación de compuestos recalcitrantes en BSM por su especificidad hacia compuestos de cadena alifática larga.

Como se puede apreciar cada una de las enzimas responden a un objetivo particular sobre la acción de compuestos contaminantes recalcitrantes o sea generando grupos radicales, inserción de grupos funcionales como hidroxilos y formación de aductos, de manera que el contaminante sea más sensible al ataque de hongos. La tabla 5 resume lo antes expuesto y la

posible acción que se espera de la enzima sobre los compuestos contaminantes. Aunque las peroxidasas y lacasas presentan limitaciones considerando altas concentraciones de solventes orgánicos o de contaminantes que podrían inactivar las enzimas. La principal limitación de todas las hemoperoxidasas es su baja estabilidad operacional, principalmente por su rápida desactivación por el peróxido de hidrógeno u otros hidroperóxidos orgánicos (Nagababu & Rifkind, 1998; Timofeevski *et al.*, 1998; Van Deurzen *et al.*, 1997; Vazquez-Duhalt *et al.*, 1993). En base a esto se han llevado estrategias para incrementar la estabilidad de las enzimas frente al peróxido de hidrógeno, una es la de mantener el control de la concentración de este compuesto en el medio de reacción, la segunda es la mutagénesis sitio-dirigida (Villegas *et al.*, 2000).

En la Tabla 5, se muestra que el mecanismo mayoritario en estas enzimas es la formación de radicales libres. El oxígeno cuando actúa como agente oxidante acepta electrones de otros compuestos, lo que puede generar especies reactivas de oxígeno (ROS), cuya reactividad es elevada. La molécula de oxígeno puede transformarse en otras especies más reactivas como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo. Estas especies son muy inestables, conllevando a reacciones en cadenas, logrando así la descomposición del compuesto recalcitrante. Los radicales hidroxilo son electrófilos que reaccionan muy rápidamente con compuestos orgánicos ricos en electrones. Estos radicales exhiben velocidades superiores a oxidantes como H_2O_2 o $KMnO_4$ (Gogate and Pandit, 2004). Estos radicales son producidos por oxidantes primarios (O_3 , O_2 , H_2O_2), fuentes de energía (luz uv) o por catálisis (TiO_2), o incluso por reacciones muy específicas como la reacción de Fenton (Carrillo *et al.*, 2016).

En la Tabla 5 se muestra que el potencial redox de las peroxidasas es mayor que las lacasas, ofreciendo ventajas sobre éstas. Es de destacar que las cepas fúngicas, aunque presentan varias de estas enzimas, no todas son secretadas al mismo tiempo.

Tabla 5. Posible acción de las enzimas en contaminantes recalcitrantes en BSM.

Enzimas	Reacción que cataliza	Posible acción sobre el compuesto recalcitrante	Observaciones	Sustrato Mediador	Punto Isoeléctrico	Peso Molecular (kDa)	Potencial redox (ev)	Localización
Lacasa (EC 1.10.3.2)	Oxidación, usando O ₂ como aceptor de electrones, genera radicales libres	Formación de radicales o Formación de aductos	Mediadores para formar aductos con el polímero	Fenoles, mediador utilizado ABTS	3-4	54-80	0.4-0.8	Extracelular, Del 2-5% intracelular
Cit P450 (EC 1.14.14.1)	Inserción de un átomo de O ₂ en sustratos orgánicos usando NADH	Hidroxilación de moléculas alifáticas	Alta especificidad por la región alifática de ácidos insaturados	Ácidos grasos, amidas				Intracelular
Cit C (EC1.11.1.5)	Oxidación usando H ₂ O ₂ , genera radicales libres	Formación de radicales libres	Puede funcionar a altas temperaturas	Compuestos aromáticos y organozufrados		12.6		Intracelular
MnP	Oxidación usando H ₂ O ₂	Formación de radicales o Formación de aductos	Puede utilizar Mn(III) como agente oxidante difusible y puede utilizar mediadores de alto potencial redox	Mn, ácidos orgánicos, ácidos grasos insaturados	2.9-7.1	38-62.5	0.8	Extracelular
CPO (EC 1.11.1.10)	Oxidación usando H ₂ O ₂ , compuestos clorados, fenoles, anilinas	Formación de radicales libres	Peroxidasa más versátil, alta capacidad oxidante	Compuestos clorinados, ácido hipocloroso	4.0	42		Extracelular

LiP	Oxida anillos aromáticos empleando el Veratryl alcohol	Formación de radicales catiónicos	Puede completar el ciclo catalítico con dadores de electrones aromáticos no fenólicos	Veratryl alcohol	3.1-4.7	35-48	1.2	Extracelular
VP	Oxida Mn(II) a Mn(III), oxida compuestos fenólicos	oxida compuestos fenólicos y no fenólicos por radicales libres	Comparte característica de LiP y MnP	Mn, veranyl alcohol, lignina	3.4-3.9	40-45	1.4-1.5	Extracelular

En la Tabla 6 se muestra aplicaciones de enzimas secretadas por distintas cepas fúngicas en la remoción de contaminantes en biosólidos.

Tabla 6. Remoción de distintos contaminantes de varias industrias por enzimas de cepas fúngicas.

Industria	Cepa	Enzima	Sustrato	Observación	% Remoción	Referencias
Colorante	<i>Schizophyllum commune</i>	MnP. Lacasa,	Solar Golden Yellow R	pH 4.5, 6d, 35°C Adicionó glucosa 1%	100	(Asgher <i>et al.</i> , 2008)
	<i>Trametes versicolor</i>	LiP	Remazol Brilliant Blue R	Empleo de Veranyl alcohol	70-100	(Christian <i>et al.</i> , 2005)
Compuestos emergentes	<i>Coroliopsis gallica</i>	Lacasa	Bisfenol A	Se empleó lacasa inmovilizada, reactor de membrana agitado. La enzima poseía 383U/g.	>85	(Nair <i>et al.</i> , 2013)
			Diclofenaco		30	
	<i>Myceliophthora thermophila</i>	Lacasa	17-β Estradiol	Se usó reactor de membrana de 2 L por 100h De trabajo. Concentración de estrógenos De 0.29-1.52 mg/L. 100U/L de lacasa	98	(Lloret <i>et al.</i> , 2013)
			17-α Ethiny lestradiol		≥97	
Petróleo	<i>Trametes versicolor</i>	Cit P 450 MnP	Ibuprofeno	10 mg/L de cada sustrato, durante 7d a 25°C MnP: 300U/L Lacasa: 3000 U/L	100	(Marco-Urrea <i>et al.</i> , 2009)
	<i>Lupex lacteus</i>	Laccase	Ácido cloffbrico		91	
	<i>Ganoderma Lucidum</i>		Carbamazepina		58	
	<i>Phanerocheate chrysosporium</i>					
	<i>Caldaryomices fumago</i>	CPO	Thlantreno Pireno Monoclordiendona		El experimento duró 1h, con 20, 30, 100 μM de los sustratos según su orden de abajo hacia arriba	

1.2.5. Tendencias, retos y perspectivas del empleo de hongos en el tratamiento de biosólidos municipales

Aunque el tratamiento de biosólidos ha sido desarrollado y estudiado por muchos años, el empleo de hongos en el tratamiento del mismo es limitado.

En la Tabla 7 se muestran distintas patentes donde se han empleado hongos en el tratamiento de biosólidos y aguas residuales.

Tabla 7. Patentes registradas empleando hongos en BSM.

# Patente	Razón de ser	Observaciones	Referencia
CN 2918405 (Y)	Hongo de podredumbre blanca inmovilizado en un biorreactor para procesar aguas residuales de clorofenol industrial	Remueve el clorofenol en una gran proporción bajo condiciones aerobias. Se describe el diseño geométrico del bioreactor	Li, 2007.
CN 101264972	Método de fijación de hongos en el proceso de tratamientos de aguas residuales	Los hongos empleados permiten adsorber metales, nitrificar y desnitrificar eliminando nitrógeno. Llevado a cabo entre 5-15 d, en reactor de 130 L	Xiaochang, 2008
CN 101811781A	Métodos para producir agentes de putrefacción de contaminantes orgánicos mediante el uso de hongos de podredumbre blanca	El método trata con una gran variedad de desechos, es de bajo costo, fácil de operar. No se emplea a nivel industrial. pH 4.5-6.5, 28-33 °C	Hongsheng, 2010
CN 102268394A	Expansión de tratamiento de aguas residuales por tratamiento con microorganismos	Mezcla de hongo (<i>Pleurotus ostreatus</i>), bacterias del género <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , enzimas (Proteasa, amilasa, celulasa, lipasa, pectinasa, glucanasa, MnP, LiP) En la fase exponencial de crecimiento al añadir el hongo con las enzimas se acortó la fase lag o de aclimatización. Se comprobó la degradación de compuestos poliaromáticos, lignina.	Jie, 2011
CN 102442726A	Inmovilización de microalgas mediado por hongos en tratamiento de aguas residuales	Hongos empleados (<i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Morchella sp</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Agaricus bisporus</i> , <i>Mortierella isabellina</i> , <i>Aspergillus phoenicis</i> , <i>Trichoderma reesei</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i>).	Liu <i>et al.</i> , 2011

		pH 7, 20-45 °C, 120-200 h de crecimiento.	
		El proceso es simple, eficiente y de bajo costo	
CN 10270146413	Proceso ecológico de tratamiento de aguas residuales de lecho fungoso	Remoción de DQO, en un 60%, no libera H ₂ S, en reactor de 2000L, pH 7, 30-43 °C.	Yunfeng, 2012
PI 2010006186	Biodeshidratación por un proceso de bioconversión en estado líquido de una planta de lodos bajo condiciones naturales	Emplea hongos filamentosos en un biorreactor en condiciones naturales. El proceso mejora la sedimentación, bioseparación y acumulación de biosólidos del lecho. Los biosólidos producidos pueden ser usados como materiales pretratados para un rápido composteo en procesos de bioconversión en estado sólido	Fakhrul-Razi <i>et al.</i> , 2012
US 2012/0178144A1	Proceso de fermentación usando <i>Trichoderma reesei</i> , conteniendo como medio lodos para producir celulasas	Se obtuvo celulasa alcanzando 17 U/mL, en 5 d de fermentación en 300 L, a 31-33 °C, 0.3 vvm, pH 5, 36 rpm.	Alam <i>et al.</i> , 2012
US 2012/0034344 A1	Bioreactores con cepas fúngicas	Conversión de biomasa en biofuels. Aprovechando los lípidos y compuestos aromáticos como materia prima. C/N: 20/1-100/1, 28-43 °C, pH 5.5 en 100 L	Menon <i>et al.</i> , 2012
CN 103663724A	Método para degradar tinta de impresiones en agua residuales y disminución de la DQO a través de la flora mixta de <i>P. chrysosporium</i> y <i>Gloeophyllum trabeum</i>	La remoción de color y DQO fue de 92 y 95%, respectivamente. Tamaño de inóculo empleado fue del 20%, 30 °C, en 6 d, pH 7, 150 rpm	Xiaoling <i>et al.</i> , 2013
CN 10378749	Método de cultivo de lodo granular filamentoso aerobio	Separa más rápido y con más eficiencia la separación del lodo. El método incrementa la velocidad de crecimiento del cultivo. Realizado a escala de banco, 20 L, 13 d, pH 4.5, temperatura ambiente	Chunli <i>et al.</i> , 2014
CN 2016/102513453	Fertilizante orgánico obtenido de Biosólidos	Se describe la composición en partes de los componentes del fertilizante: lodo, polvo de paja, hongos, harina de arroz, aserrín, cenizas, CaCO ₃ . 40-80 °C, 15-32 d de operación	Jianguu, 2016

En la investigación realizada a las patentes registradas en el campo de estudio se tomó en cuenta un período menor a 20 años hasta la fecha. Las palabras claves en la búsqueda fueron Biosólidos, tratamiento con hongos. En Google patents se encontraron dos, en patentscope se obtuvieron 19 patentes, aunque cuando se cambió la palabra clave por Biosólidos municipales ascendió a 82 patentes. En el estudio se pudo comprobar que hay 4 sectores que

dominan los registros, siendo el área de producción de biofuels la de mayor registro con un 35%, seguido de métodos, equipos en Biosólidos con un 28%, la producción de biofertilizantes y tratamiento físico-químico, con 22 y 15%, respectivamente. Los tratamientos físicos químicos es el sector donde existen más patentes registradas desde el 2015 hasta la fecha. Una muestra de los resultados se observa en la tabla 7. Es de destacar que el número de patentes empleando hongos es muy reducida, dos factores podrían deberse a la deficiencia en:

1. Desconocimiento de los mecanismos implicados en el proceso.
2. Costo de operación de BSM.

En ese sentido es necesario explorar los nichos de investigación, respecto al punto 1:

- Competencia e interacciones entre sustratos y microorganismos, sinergia entre microorganismos: es necesario el estudio empleando técnicas moleculares, microscopía para elucidar los mecanismos de interacción.
- Mecanismos de regulación enzimática de floculación y formación de flóculos: la manipulación genética en este proceso conllevará a mayores rendimientos y facilidad de las operaciones en el tratamiento de BSM. Estudiar los factores que afectan la formación de pellets y la formación de los mismos daría un mayor entendimiento a este fenómeno de floculación.
- Estudios cinéticos y termodinámicos de los fenómenos de bioadsorción y biodegradación: se deben realizar estudios que correlacione la transferencia de oxígeno, velocidad de agitación, fracción de micelio en la biomasa, fuente de carbono con el crecimiento del hongo en estos procesos. La información cinética es necesaria para optimizar condiciones en procesos a escala industrial.
- Estudios de fenómenos de transporte, difusión, resistencia en reactores: el desarrollo de modelos dinámicos que simulen la difusión, resistencia transporte en la bioadsorción y biodegradación debe recibir una mayor atención.
- Estudio de reología en reactores: su estudio aportará conocimiento para el manejo del lodo, transporte, almacenamiento. Modelos matemáticos donde relacione el pH, temperatura, velocidad de agitación, concentración de sólidos suspendidos totales deben ser correlacionados con la viscosidad.

- Estudiar los mecanismos que gobiernan la remoción de metales pesados, compuestos emergentes, hidrocarburos policíclicos aromáticos y simular sus interacciones: modelos matemáticos aunado a la biología molecular son poderosas herramientas para conocer estos mecanismos. Los genes de los hongos pueden ser clonados para desarrollar modelaciones matemáticas en el control de vías metabólicas y así predecir cómo responde las vías metabólicas antes la manipulación. Estudiar vías catabólicas de degradación de compuestos recalcitrantes.
- Desarrollar expresiones de velocidad basadas en los mecanismos de reacciones enzimáticas: para conocer factores que favorecen o que limitan el crecimiento del hongo.
- Estudiar por ingeniería de proteínas enzimas oxidoreductasas con una mayor estabilidad en ambientes extremos: estudios que mejoren la estabilidad enzimática, modificación de especificidad por sustrato, propiedades cinéticas, el requerimiento de cumplir con estos objetivos, es la necesidad de conocer la estructura tridimensional de la enzima.
- Empleo de hongos extremófilos, estudiar su fisiología en el proceso de BSM: la optimización de vías metabólicas para el análisis del estado metabólico es necesario estudiarlo, el análisis metabolómico, transcriptómico bajo condiciones de stress, así como el desarrollo de nuevas cepas tolerantes al stress, se debe desarrollar.
- Aplicación de técnicas de microscopía, moleculares, transcriptómicas en el análisis del proceso en BSM: con el objetivo de elucidar las vías biosintéticas y catabólicas de los hongos, el estudio del mecanismo de secreción de enzimas, función de enzimas intracelulares, manipulación genética de vías homólogas para lograr mayores eficiencias de metabolitos de interés.

Respecto al punto 2, es necesario profundizar en:

- Estudios de pre-tratamiento combinados con el tratamiento con hongos, para así mejorar la acción del microorganismo: diseño de nuevos pre-tratamientos de forma que sea de bajo costo, eficiente y sustentable medioambientalmente.
- Métodos de recuperación de enzimas y otros productos de alto valor agregado: se debe estudiar la recuperación de enzimas (proteasas, amilasas, lipasas, esterases,

xilanasas, oxidoreductasas, pectinasas), hormonas de plantas, quitosanos, biopolímeros, carotenoides, glicerol.

- Optimización de parámetros: pH, T, velocidad de sedimentación, Oxígeno disuelto, velocidad de agitación, concentración de sólidos suspendidos, condiciones de operación, tiempo de incubación, concentración de esporas, tiempo de inóculo, bioaugmentación de distintas fuentes fúngicas).
- Desarrollo de sensores enzimáticos para monitorear operaciones unitarias involucradas en el tratamiento con hongos en BSM: se debe profundizar en métodos para detectar degradación de hongos, ensayos moleculares para determinar la variabilidad interna de regiones transcritas en los hongos.
- Inmovilización de hongos en bioreactores: optimizar parámetros como carga, relación en peso de hongo/soporte, ciclos de vida, volumen de operación, temperatura, costo de material, estabilidad química y mecánica, tipo de soportes. Tipos de bioreactores a emplear (cama fluidizada, cama empacada, burbujas, tanque agitado)
- Llevar a cabo distintas estrategias de escalado en diferentes bioreactores: desafortunadamente la mayoría de los estudios en este campo son a escala laboratorio por lo que se debe estudiar las limitaciones de la transferencia de masa causado por el probable crecimiento excesivo de los hongos dentro del biorreactor, la contaminación bacteriana y lograr la acción prolongada de las enzimas producidos por el hongo, una estrategia para esto es la inmovilización, se debe estudiar el efecto del esfuerzo mecánico sobre la biomasa fúngica, formas de diseño de impelentes, metodologías de operación, relación agitación/aireación, todos estos factores se deben evaluar bajo la evaluación económica del proceso.
- Mejorar parámetros de operación: lograr la extensión de la actividad de la biomasa por largos períodos de tiempo, minimizar el consumo de nutrientes, lograr cortos períodos de cultivo, métodos fáciles de cultivo y mínimo riesgo de contaminación.
- Desarrollo de un banco de datos para BSM: se debe recopilar bases de datos técnicos, económicos, ambientales e información social. Se puede emplear análisis espacial como GPS para el manejo de BSM.
- Simulación de procesos: esta es una herramienta que puede simplificar la complejidad del proceso, con variables como balances de masa, de energía, velocidades, relación

entre DQO, DBO, Fósforo, nitrógeno, realizar modelaciones matemáticas y optimizar estas variables.

- Simular los procesos involucrados en BSM: la optimización de sedimentación, activación, filtración, deshidratación con las variables sensibles en estas etapas (densidad, tiempo de retención, velocidad de flujo, carga residual), así como el diseño de bombas, zarandas, transportadores.
- Combinar la nanotecnología mediante reactores en miniatura: de forma que sea más específico y local la interacción enzima-contaminante, esta nueva tecnología presenta ventajas como su gran área superficial, alta reactividad, fuerte sorción y disolución rápida, aspectos necesarios para la remoción de contaminantes en BSM.
- Análisis de costo: basado en la sensibilidad de distintos escenarios.

CAPÍTULO 2. PLANTEAMIENTO GENERAL DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Planteamiento del problema de la investigación

Las plantas de tratamiento de aguas residuales municipales, en los últimos años, son más eficientes a nivel internacional y han reducido el contenido de contaminantes descargados al ambiente. Esta mejora obedece esencialmente a la implementación global de procesos biológicos de tratamiento de aguas residuales municipales. En consecuencia, en los próximos años, el volumen de biosólidos municipales producidos por las plantas de tratamiento de aguas residuales municipales continuará aumentando (Yu *et al.*, 2013; Maeda *et al.*, 2011). Los BSM están constituidos principalmente por materia orgánica (30-95%) (Hattori & Mukai, 1986; Shier & Purwono, 1994), y contienen proteínas (20-60%), lípidos (7-20%), azúcares (3-4%), hemicelulosa (7-10%), celulosa (0.2-4%) y lignina (10-30%), entre otros (Hattori & Mukai, 1986; Shier & Purwono, 1994). Su composición química los convierte en una materia prima excelente para la obtención de productos de valor añadido (Brar *et al.* 2008). Muchos países tienen como objetivo eliminar la deposición en vertederos y la quema de BSM, ya que se consideran maneras hostiles de manejo ambiental. La valorización de los BSM incluye producción de cementos, compostaje, entre otros. Su uso en la restauración de suelos agrícolas, forestales y de colas mineras, recibe especial interés ya que limitaría la adición de fertilizantes sintéticos (Hebert, 2015), otro desafío ambiental.

En Canadá y Francia, por ejemplo, se prohibirá en el 2020 el vertimiento de BSM. Como resultado, se espera que el uso de BSM como fertilizante agrícolas y forestales se triplique (de ~ 200,000 a ~ 600,000 ton/año). En México, la mayoría de las PTARM no tratan los BSM y disponen de ellos a través de los alcantarillados. Esta situación es muy alarmante porque se generan 230 m³/seg de aguas residuales y solo el 45.6% es tratado. Para los BSM la situación es aún más preocupante, 2,456 municipios reportaron en 2013 la existencia de PTARM; sin embargo, sólo el 5% tratan sus BSM (SERMANAT, 2015).

Los BSM contienen contaminantes regulados y no regulados (Hyland *et al.*, 2012), incluyendo, por ejemplo, contaminantes orgánicos, organismos patógenos y metales pesados (Rodríguez – Rodríguez *et al.*, 2012; Verlicchi *et al.*, 2012; Rodríguez – Rodríguez, 2010). Una vez diseminados en el suelo los contaminantes inducen la contaminación de aguas

subterráneas; afectan la biota, calidad y uso del suelo; y contribuyen a su acumulación en las cadenas tróficas. El uso como fertilizantes de BSM no tratados (Hart, 2011), puede implicar un riesgo ambiental y de salud cuando están contaminados con xenobióticos y patógenos (Goldfarb & Hopkins, 1999). Por consiguiente, las autoridades se enfrentan a crecientes presiones relacionadas con los costos del manejo, tratamiento y eliminación de los BSM.

Actualmente, entre el 25-60% de los costos operativos de las PTARM están relacionados con la eliminación o valorización de los BSM. Por tanto, se deben desarrollar tratamientos económicamente viables que incluyan: 1) la reducción del volumen de BSM y el costo de eliminación (Li *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2012) y 2) la obtención de productos de valor agregado (fertilizantes, enzimas, etc.) (Maeda *et al.*, 2011; Brar *et al.*, 2008) o energía (Yu *et al.*, 2013), para mejorar el balance económico del proceso. Uno de los productos económicamente atractivos es la producción de biocatalizadores utilizando los BSM como medio de crecimiento para microorganismos productores de enzimas, las cuales pueden reinyectarse al TARM (Ba *et al.*, 2013; Domarche *et al.*, 2012). La utilización de BSM mejoraría significativamente los precios de la producción enzimática, un cuello de botella en la aplicación de los tratamientos de aguas residuales municipales (TARM) respetuosos del medio ambiente (Domarche, 2014).

También es crítico que estas tecnologías puedan eliminar diferentes tipos de contaminantes en un enfoque simple para cumplir con las regulaciones actuales y futuras. Las aguas residuales son la principal fuente de contaminantes [(HPA), compuestos farmacéuticos (CF), productos de higiene personal, metales] para los ambientes acuáticos, sin embargo, las PTARM actuales no están diseñadas para remover algunos de estos. Para superar esta ineficiencia se necesitan con urgencia nuevos procesos de tratamiento y eliminación de estos contaminantes, que al final se concentran en los BSM.

Los tratamientos biológicos reciben un gran interés, ya que ofrecen el equilibrio adecuado entre versatilidad y renovabilidad. Uno de los procesos biológicos más prometedores para la remoción de COE es el uso de hongos ligninolíticos. Estos hongos producen una gran variedad de enzimas que modifican la lignina [incluyendo lignina peroxidasas (EC 1.11.1.14), manganeso peroxidasas (EC 1.11.1.13) y lacasas (EC 1.10.3.2)] pero que no sólo descomponen lignocelulosa, sino también una amplia gama de compuestos orgánicos,

incluyendo COE recalcitrantes (Verlicchi *et al.*, 2012), tanto en aguas residuales como en BSM. Esta capacidad también está asociada con enzimas intracelulares como: citocromos P450 (el sistema intracelular mejor estudiado), sulfotransferasas, quinona-reductasas, epóxido hidrolasas y tirosinasas. Además, el micelio de los hongos ha mostrado grandes propiedades de adsorción que los hace adsorbentes rentables para la eliminación de metales traza y COE en soluciones acuosas (Rodríguez-Rodríguez, 2010). Los BSM en muchas ocasiones presentan características de ambientes extremos: pH ácidos, alto contenido de contaminantes, se almacenan a elevadas temperaturas, alto contenido de sales, etc, es por ello que en este proyecto se propone evaluar las potencialidades de hongos extremófilos filamentosos, los cuales pueden crecer en las condiciones anteriores, para el tratamiento de BSM y la valorización de estos residuos mediante la producción de enzimas.

2.2. Justificación

La liberación de contaminantes al ambiente es una de las principales causas de la contaminación global; por lo que se ha convertido en un tema prioritario para todos los países. El pronóstico para los siguientes años define un aumento considerable de los volúmenes generados de biosólidos municipales y de aguas residuales industriales, de manera que es necesario desarrollar, evaluar e implementar tecnologías limpias para atender los problemas de contaminación ambiental y garantizar esquemas de desarrollo sostenible.

Existe un creciente interés en reutilizar las aguas industriales y los biosólidos municipales para el riego y como biofertilizantes en la agricultura. Sin embargo, estos usos están limitados por no disponer de tratamientos efectivos que permitan remover los grupos de contaminantes ambientales que lo impiden.

Los tratamientos químicos y físicos, mayormente usados, si bien logran disminuir la carga de contaminantes, también ocasionan contaminaciones colaterales. Los microorganismos, y en especial los hongos, son una alternativa ecológica y económica para ser integrados a estos procesos de remoción ambiental. Los hongos ligninolíticos producen fenol oxidasas (peroxidasa y lacasas) y citocromos útiles en la remoción de HPA, compuestos orgánicos

persistentes (COP) y plaguicidas. También son una alternativa muy atractiva, y prácticamente sin explorar, para la disminución del volumen de biosólidos. En especial los hongos extremófilos, permiten realizar tratamientos ambientales en condiciones extremas de alta salinidad y altas o bajas temperaturas, entre otras. El micelio fúngico también se realiza como un buen adsorbente para contaminantes inorgánicos como los metales pesados.

Hipótesis

El uso de hongos extremófilos filamentosos representa una alternativa ecológica y económica que permitirá implementar un tratamiento de bajo costo para la descontaminación de aguas residuales y biosólidos municipales, así como para la producción de enzimas.

2.3. Objetivos

2.3.1. Objetivo general

Evaluar la potencialidad de hongos extremófilos filamentosos en el tratamiento y valorización de biosólidos municipales.

2.3.2. Objetivos específicos

1. Obtener enzimas de interés industrial a partir de biosólidos municipales.
2. Evaluar la reducción de carga contaminante presente en biosólidos municipales mediante el empleo de hongos extremófilos filamentosos.
3. Evaluar la remoción de compuestos fenólicos presentes en biosólidos municipales mediante el empleo de hongos extremófilos filamentosos.
4. Evaluar la remoción de metales pesados presentes en biosólidos municipales mediante el empleo de hongos extremófilos filamentosos.

5. Evaluar la remoción de compuestos farmacéuticos presentes en biosólidos municipales mediante el empleo de hongos extremófilos filamentosos.
6. Evaluar la toxicidad de los mejores tratamientos en estudio.
7. Analizar el costo económico de la producción de enzimas a escala de laboratorio.

CAPÍTULO 3. DISEÑO Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

3.1. Diseño experimental

El diseño de experimentos es una técnica que puede ayudar a conocer un proceso. Permite averiguar la forma en la que diversos factores presentes en él influyen sobre la variable respuesta y ajustarlos en los niveles que optimicen los resultados (Izquierda *et al.*, 2007). El diseño de Plackett-Burman, es un diseño factorial fraccionado, de ‘screening’ (barrido), que permite establecer la relación entre variables de estudio y la variable respuesta. Es un diseño completamente ortogonal que reduce substancialmente el número de experimentos a realizarse con un elevado número de variables (Izquiero *et al.*, 2007). En este diseño cada factor se coloca a 2 niveles y el número de experimentos es múltiplo de 4. Las variables pueden ser de tipo cualitativa o cuantitativa. Los niveles se denotan como -1 y +1; pudiendo escribirse en forma simple como (-) y (+). Es muy simple de construir una matriz para este tipo de diseño. La ventaja que presenta los diseños de Plackett-Burman respecto a otros diseños de ‘screening’ (factoriales completos, factoriales fraccionarios y Taguchi), son su condición de completa ortogonalidad entre las variables y el número reducido de experimentos cuando se trabaja con muchos factores (Montgomery, 2005).

Para la realización de los experimentos en este estudio se utilizará un diseño Plackett-Burman con 4 factores y 12 corridas experimentales. En este diseño, se evaluarán los factores volumen de inóculo, peso de lodo, sustrato paja de trigo y pre-tratamiento (130 °C por 2h), los cuales se seleccionaron según lo reportado en la literatura.

De acuerdo con el trabajo de López-Miranda *et al.* (2009) y Prinsen (2010), la paja de trigo (16.85%) posee menos lignina que otros sustratos agroindustriales y esto posibilita una mayor accesibilidad a la celulosa, fuente de carbono para el crecimiento fúngico y síntesis enzimática (Chan *et al.*, 2016). El factor pre-tratamiento térmico aplicado en el lodo puede mejorar el rendimiento (en términos de degradación) del sistema y el crecimiento del hongo (More *et al.*, 2010), mientras que la influencia de los factores peso de biosólido y volumen de inóculo sobre la producción de enzimas y tratamiento de biosólidos resulta un aspecto de interés a investigar.

La Tabla 8 muestra los valores de los niveles alto y bajo para cada uno de los factores en estudio.

Tabla 8. Valor de los niveles de los factores empleados en el diseño Plackett-Burman para el tratamiento de biosólidos.

Tratamiento	X₁ (Volumen de inóculo, mL)	X₂ (Sustrato)	X₃ (Pre- tratamiento)	X₄ (Peso de biosólido, g)
1	1.5	No	No	30
2	3.0	Sí	No	30
3	1.5	No	Sí	20
4	3.0	No	Sí	30
5	3.0	No	No	20
6	1.5	Sí	No	30
7	3.0	Sí	Sí	20
8	3.0	No	Sí	30
9	3.0	Sí	No	20
10	1.5	Sí	Sí	20
11	1.5	Sí	Sí	30
12	1.5	No	No	20

Para el análisis de los datos obtenidos, se realizará un análisis de optimización de múltiples variables respuestas, que permite determinar las configuraciones de los factores experimentales que cubren las características deseadas para una o más respuesta simultáneamente. Este análisis se realiza mediante la Función de Deseabilidad, que se basa

en los valores de las variables respuesta, la cual se maximiza. Para utilizar el procedimiento, primero se deberán construir modelos para cada respuesta por separado (Domínguez, 2006).

Todos los análisis estadísticos se realizarán utilizando Statgraphics Centurion (software estadístico para el procesamiento de datos), versión XVII.I.

3.2. Estrategia experimental

La estrategia experimental propuesta fue modificada durante el desarrollo del proyecto, de acuerdo a los resultados obtenidos en cada una de las etapas. La estrategia experimental definitiva que se llevó al cabo para la realización del presente estudio, se presenta en la Figura 5.

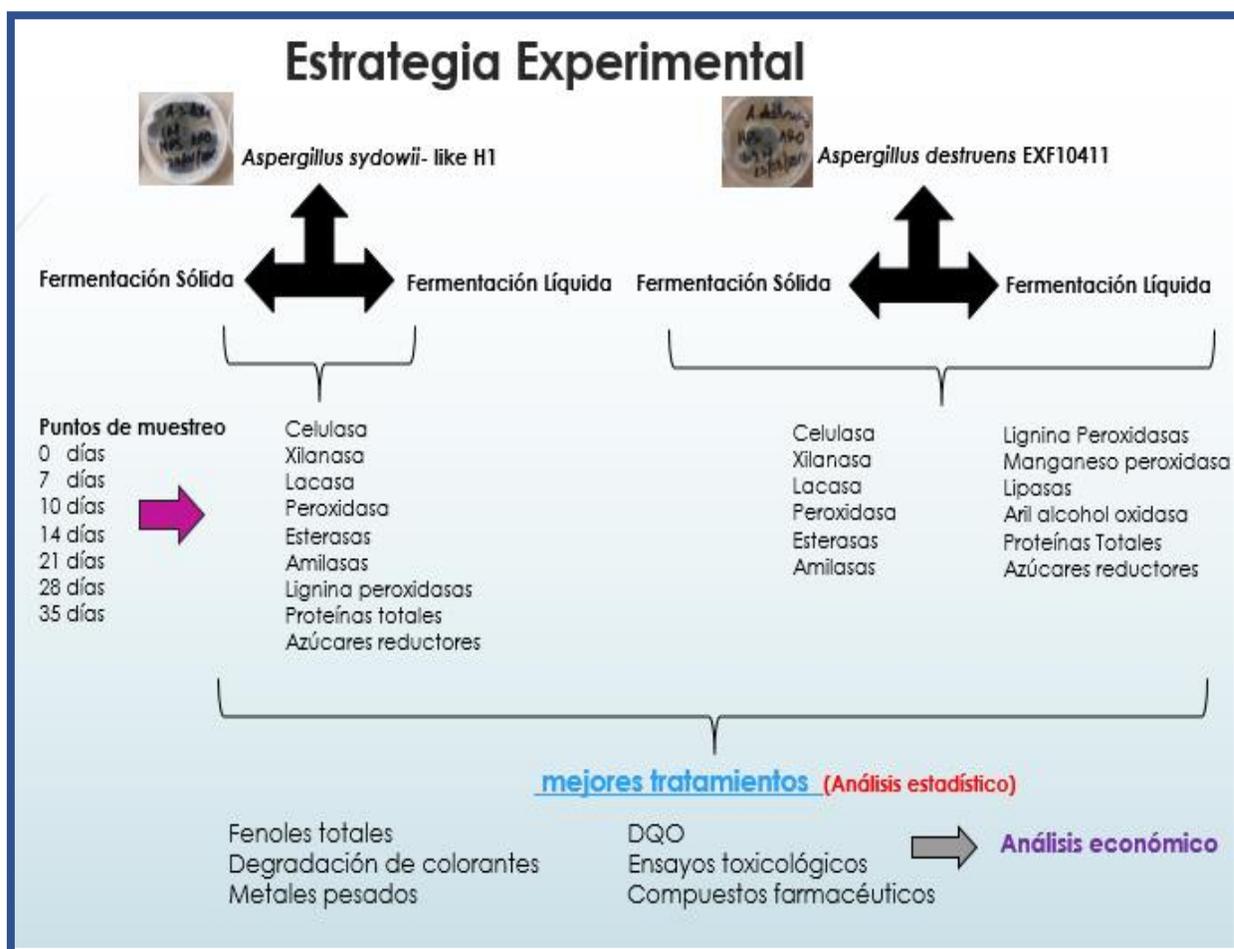


Figura 5. Diagrama de estrategia experimental.

3.3. Materiales y Métodos

3.3.1. Material fúngico

Las cepas fúngicas utilizadas en este trabajo fueron *Aspergillus sydowii*- like H1 y *Aspergillus destruens* EXF-10411, las cuales pertenecen al *phylum Ascomycota* y fueron aisladas de una fermentación en estado sólido de bagazo de caña de azúcar y de una pintura de caballete en Eslovenia, respectivamente. Estas cepas fueron conservadas en placas Petri sobre Agar Extracto de Malta (AEM) a 4 °C.

Para todos los experimentos se utilizó 1.0 y 1.9 M de NaCl, concentración óptima para el crecimiento de *A. sydowii* y *A. destrudens*, respectivamente.

3.3.2. Tratamiento de biosólidos municipales

A partir de cultivos de los hongos conservados en cajas de Petri con agar extracto de malta a 4°C, se obtuvieron cultivos de 7 días también en cajas Petri con medio agar extracto de malta. Los cultivos se incubaron a 28 °C durante 10 días. A partir de los nuevos cultivos, para la obtención del preinóculo, se inocularon 4 discos de 7 mm de diámetro en matraces Erlenmeyer de 500 mL que contenían 100 mL de medio extracto de malta, los cuales fueron agitados a 150 rpm durante 5 días a 28 °C. El medio de cultivo extracto de malta fue suplementado con 1 y 1.9 M de NaCl para el cultivo de *A. sydowii-like* y *A. destruens*, respectivamente, atendiendo a las concentraciones de NaCl para su crecimiento óptimo. De esta manera se obtuvieron los preinóculos que fueron inmediatamente utilizados como a continuación se describe.

Los inóculos obtenidos, se licuaron y seguidamente se transfirieron 50 mL a matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 50 mL de medio extracto de malta suplementado con las concentraciones de NaCl para el desarrollo óptimo de cada una de las cepas en estudio, para un volumen efectivo de 100 mL. Se incubaron a 28°C durante 7 días, en agitación, a

150 rpm. Así se obtuvo finalmente el inóculo, mismo que fue inmediatamente utilizado para los experimentos de biotratamientos.

Los biosólidos fueron obtenidos de plantas de tratamiento de aguas residuales de Magog, Canadá y Morelos, México, después de ser sometidos a un proceso de estabilización mediante una degradación biológica de carácter anaerobio. Para el tratamiento de estos residuos orgánicos se transfirieron, seguidamente, 1.5 y 3.0 mL respectivamente del inóculo obtenido, a placas de Petri, para la fermentación sólida, mientras que en el caso del proceso fermentativo líquido se añadieron a Erlenmeyer de 250 mL que contenían 100 mL de aguas residuales. Cada placa de Petri y Erlenmeyer representan, respectivamente, cada tratamiento descrito en el diseño factorial presentado en el acápite 3.1. Se incubaron estáticamente durante 35 días a 28 °C.

Semanalmente 36 placas y Erlenmeyer fueron sacrificados. También se usaron controles en cada uno de los experimentos conteniendo biosólidos sin inocular con hongos. En todos los casos se utilizó biosólido no estéril.

Todos los experimentos fueron realizados por triplicados. Una vez sacrificados las placas y Erlenmeyers, se recuperó el biosólido y se determinaron las siguientes variables.

3.3.3. Cuantificación de la actividad de enzimas extracelulares en tratamientos de biosólidos municipales

Las actividades enzimáticas se determinaron a partir de la pasta de sobrenadante extraído. Para los experimentos donde se desarrolló fermentación líquida, el sobrenadante colectado se centrifugó en tubos de 15ml a una velocidad de 4000 rpm durante 15 minutos a 4 °C; en el caso de los procesos de fermentación sólida, se obtuvo a partir de la adición de 10 mL de Buffer fosfato pH 6, y posteriormente se centrifugó en tubos de 50 mL a una velocidad de 4000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. En ambos casos se descartó cualquier resto de micelio que pudiese contener. Para la determinación de las actividades se emplearon microplacas de 96 pocillos, y se utilizó un espectrofotómetro automatizado modelo Epoch.

3.3.3.1. Cuantificación de la actividad aril alcohol oxidasa

La reacción de la actividad aril alcohol oxidasa se determinó por la oxidación de alcohol veratrílico a veratraldehído. El coeficiente de extinción molar para el veratraldehído es de $9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La absorbancia se determinó a 310 nm .

Reacción:

-115 μL de Buffer fosfato (pH=6), 0.1M

-35 μL de sobrenadante

-50 μL de alcohol veratrílico

El blanco consta de 115 μL de Buffer fosfato, 50 μL de alcohol veratrílico y 35 μL de agua destilada.

Las lecturas se iniciaron en el momento de adicionar el sustrato y se registraron cada 1 minuto durante 30 minutos.

3.3.3.2. Cuantificación de la actividad esterasa

La reacción enzimática consistió en 200 μL de sustrato para esterasa, y 100 μL de sobrenadante para un volumen final de 300 μL . Las reacciones se realizaron en placas de 96 pocillos. Una vez que se añadió el sustrato para esterasa a la reacción se monitorearon las absorbancias por triplicado a una longitud de onda de 538 nm durante 30 minutos y en intervalos de 1 minuto. El coeficiente de extinción molar utilizado fue de $23\,598 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Batista-García et al. 2014).

Reacción

-200 μL de sobrenadante

-100 μL de sustrato acetato de 2-naftilo

El blanco utilizado incluyó 200 μL de sustrato para esterasa y 100 μL de buffer PBS 1X-Triton (0.1%).

Las lecturas se iniciaron en el momento de adicionar el sustrato y se registraron cada 1 minuto durante 30 minutos.

3.3.3.3. Cuantificación de la actividad lacasa

La determinación de la actividad lacasa se monitoreó por la reacción del 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) en Buffer fosfato PBS 1X-Tritón 0.1%. En presencia de enzimas oxidativas como las lacasas, el ABTS se oxida dando una coloración verde. El coeficiente de extinción molar para el ABTS es de $36\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. La absorbancia se determinó a 420 nm (Batista et al., 2014).

Reacción:

-200 μl de sobrenadante

-90 μl de Buffer fosfato (PBS 1X) - Tritón 0.1%

-10 μl de ABTS a 30mM

El blanco utilizado incluyó 290 μL de Buffer fosfato (PBS 1X) - Tritón 0.1% y 10 μL de ABTS.

3.3.3.4. Cuantificación de la actividad lipasa

Para la determinación de lipasa se añadió en cada tubo de ensayo 800 μL de Buffer fosfato, 100 μL de sobrenadante y 100 μL de *p*-nitrofenil palmitato (PNPP). Posteriormente los tubos de ensayo se incuban, en la oscuridad, en baño de María, a una temperatura de 40°C durante 5 minutos y transcurrido el tiempo de incubación se añade 3 mL de Na_2CO_3 .

Reacción:

-800 μl de Buffer fosfato (pH=8)

-100 μl de sobrenadante

-100 μl de PNPP

Para el control se utilizó 800 μL de Buffer fosfato, 100 μL de PNPP de la solución stock, 3mL de Na_2CO_3 y 100 μL de agua destilada. El coeficiente de extinción molar para el PNPP es de $17500\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$.

Todas las muestras se aplicaron por triplicado y se realizó la lectura con una longitud de onda de 410 nm.

3.3.3.5. Cuantificación de la actividad peroxidasa

La reacción enzimática consistió en 80 μL de Buffer fosfato (PBS 1X) - Tritón 0.1%, 10 μL de ABTS, 10 μL de peróxido de hidrógeno al 0.005% y 200 μL de sobrenadante, para un volumen final de 300 μL . Una vez que se añadió el ABTS a la reacción, se monitorearon las absorbancias por triplicado a una longitud de onda de 420 nm durante 30 minutos y en intervalos de 1 minuto. El coeficiente de extinción molar del ABTS fue de 36,000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Haroune et al. 2014; Touahar et al. 2014).

Reacción:

- 200 μL de sobrenadante
- 80 μL de Buffer fosfato (PBS 1X) - Tritón 0.1%
- 10 μL de peróxido de hidrógeno al 0.005%
- 10 μL de ABTS a 30mM

El blanco utilizado incluyó 280 μL de Buffer fosfato (PBS 1X) - Tritón 0.1%, 10 μL de ABTS y 10 μL de peróxido de hidrógeno.

3.3.3.6. Cuantificación de la actividad lignina peroxidasa

La reacción de la actividad de lignina peroxidasa se monitoreó por la reacción de oxidación del 1,2-bis(3,4-dimetoxifenil)propano-1,3-diol a 3,4-dimetoxibenzaldehído y 1-(3,4-dimetoxifenil)etano-1,2-diol en presencia de peróxido de hidrógeno. La absorbancia se determinó a 310 nm.

Reacción:

- 100 μL de Buffer tartrato (pH=3)
- 30 μL de sobrenadante
- 35 μL de peróxido de hidrógeno
- 35 μL de veranyl alcohol

El blanco contiene 100 μL de Buffer tartrato, 35 μL de peróxido de hidrógeno, 35 μL de veranyl alcohol y 30 μL de agua destilada.

Las lecturas se iniciaron en el momento de adicionar el sustrato y se registraron cada 1 minuto durante 30 minutos.

3.3.3.7. Cuantificación de la actividad manganeso peroxidasa

La reacción enzimática consistió en 100 μL de Buffer tartrato (pH=5), 35 μL de sulfato de manganeso (40mM), 30 μL de sobrenadante y 35 μL de peróxido de hidrógeno (0.29 mM), para un volumen final de 200 μL . Una vez que se añadió el peróxido de hidrógeno a la reacción, se monitorearon las absorbancias por triplicado a una longitud de onda de 238 nm durante 30 minutos y en intervalos de 1 minuto. El coeficiente de extinción molar del peróxido de hidrógeno fue de $6500\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Reacción:

-30 μl de sobrenadante

-100 μl de Buffer tartrato (pH=5), 200mM

-35 μl de sulfato de manganeso, 40mM

-35 μl de peróxido de hidrógeno, 0.29mM

El blanco utilizado incluyó 130 μL de Buffer tartrato, 35 μL de sulfato de manganeso y 35 μL de peróxido de hidrógeno.

3.3.3.8. Cuantificación de la actividad amilasa, celulasa y xilanasas

Para la determinación de amilasa, celulasa y xilanasas se utilizó el método de azúcares reductores a partir de sustratos poliméricos como lo son almidón, carboximetilcelulosa y xilano de avena respectivamente. Se utilizó además el ácido 3, 5- dinitrosalicílico, el cual permitió determinar la presencia de grupos carbonilos libres (C=O) y reaccionó con ellos para producir la oxidación de los azúcares.

Se utilizaron almidón, carboximetilcelulosa (CMC) y xilano diluido al 2% en 50mM de Buffer citrato (pH 5) como sustratos para la medición de las actividades amilasas, celulasas y xilanasas respectivamente. Se realizó una reacción enzimática en una microplaca con 96 pocillos, que contenía 50 μl de fracción proteínica (muestra), 100 μl de Buffer citrato y 150 μl de almidón, CMC y xilano respectivamente para un total de 300 μl , esta mezcla fue incubada a 50°C. Luego, se tomó una alícuota de 25 μl cada 5 minutos durante 30 minutos. A estas alícuotas se les adicionaron 25 μl de una solución de DNS, se calentaron durante 5

minutos a 90°C y se añadieron 200 µl de agua. Inmediatamente, se midió su absorbancia a 540 nm (Batista et al., 2014).

Los experimentos se realizaron por triplicado, con tres mediciones independientes en cada caso. Las mediciones se expresaron como actividad volumétrica (U/L), para los resultados obtenidos en los experimentos de fermentación líquida, la cual se define como la cantidad de enzima que produce 1µmol de producto en la unidad de volumen (L); en el caso de los obtenidos en los procesos fermentativos sólido se expresaron en U/kg de lodo, cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1µmol de sustrato en 1 minuto en unidad de masa.

Se graficaron los valores de absorbancia obtenidos en el equipo (eje y) contra la unidad de tiempo (eje x). Los datos se ajustaron a una línea recta garantizando un $R^2 > 0.99$. Se determinó la pendiente en cada caso y se utilizaron las siguientes fórmulas para determinar las actividades enzimáticas:

Fermentación Líquida

$$\text{Actividad (U/L)} = \frac{\frac{\Delta \text{Absorbancia}}{\text{minuto}} * V_T}{\epsilon * l * V_E} \quad (3)$$

Fermentación sólida

$$\text{Actividad (U/kg de lodo)} = \frac{\frac{\Delta \text{Absorbancia}}{\text{minuto}} * V_T}{\epsilon * l * V_E} * \frac{V_{\text{Extracción}}}{\text{peso de lodo}} \quad (4)$$

donde:

ϵ : coeficiente de extinción molar de la absorbancia que absorbe a la λ del análisis

l : trayectoria óptica = 1cm

V_T : volumen total de la reacción

V_E : volumen de reacción enzimática

3.3.3.9. Cuantificación de proteínas totales

Las proteínas totales se determinaron utilizando una placa de 96 pocillos, en cada pocillo se aplicaron 200 μ L de reactivo Ácido bicinonínico (BCA) y 25 μ L de las enzimas presentes en el sobrenadante. Posteriormente se incubó la placa a 60°C durante 15 minutos en la oscuridad.

Para el control se utilizó 200 μ L de BCA y 25 μ L de agua destilada.

Todas las muestras se aplicaron por triplicado y se realizó la lectura con una longitud de onda de 562 nm.

3.3.3.10. Cuantificación de azúcares reductores

En tubos de ensayo se aplicaron 1.25 mL de agua destilada, 250 μ L de sobrenadante y 1.5 mL de DNS. Posteriormente los tubos de ensayo se incubaron a una temperatura de 90 °C durante 15 minutos, inmediatamente después de terminar el período de incubación se le añadió 1 mL de tartrato de sodio potasio al 40%.

El control contiene 1.5 mL de DNS de la solución stock y 1.5 mL de agua destilada.

Todas las muestras se aplicaron por triplicado y se realizó la lectura a una longitud de onda de 575 nm.

3.3.4. Degradación de colorantes Rojo Congo y Naranja II

Los cultivos se mantuvieron a 30 °C en una sala termostática aproximadamente 48 horas a 150 rpm. La degradación de los colorantes en el medio líquido se registró midiendo la absorbancia de las muestras de cultivo filtradas o de la mezcla de enzimas, resultante de los mejores tratamientos en la producción de oxidoreductasas.

La disminución de la absorbancia a 500 nm (longitud de onda de absorción máxima) se utilizó para establecer la capacidad de decoloración de las enzimas para el Rojo Congo, en el caso de Naranja II la longitud de onda fue de 485 nm. Las muestras se diluyeron hasta alcanzar un valor de % de decoloración inferior a 100. Los resultados se refieren al % de disminución

de la absorbancia o la concentración de colorante residual (mg/L) (Bosco *et al.*, 2016). Todos los experimentos se realizaron por triplicado. La concentración inicial de Congo Rojo y Naranja II a 30 °C fue de 100 mg/L.

3.3.5. Reducción de demanda química de oxígeno (DQO) en biosólidos municipales

Los análisis de DQO se realizaron mediante un kit comercial (14555, Merck, Alemania). Para realizar el procedimiento primeramente se retiró el tapón de rosca revestido de teflón del vial, se agregaron 2 mL de muestra, se volvió a colocar el tapón de rosca y se agitó el vial. Posteriormente se colocaron los viales en un digestor de bloque DigiPREP CUBE a 150°C durante 2 horas. Una vez terminado el proceso las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se procedió a determinar la DQO en un fotómetro COD de analito (CHEMetrics). El rango analítico para el método espectrofotométrico es de 20-1500 ppm (medido a 620 nm). Todas las muestras se aplicaron por triplicado.

El porcentaje de reducción de DQO se calculó mediante la fórmula:

$$\% \text{ de reducción} = \frac{DQO_1 - DQO_r}{DQO_1} \quad (5)$$

Donde DQO_1 : concentración de DQO en tiempo cero de fermentación.

DQO_r : concentración de DQO en el mejor tiempo de fermentación de producción de enzimas.

3.3.6. Remoción de fenoles en biosólidos municipales

La cuantificación de la remoción de compuestos fenólicos se basó en el método colorimétrico de la 4-aminoantipirina (4-APP). Este método es muy sensible y está particularmente bien adaptado para contenidos entre 0.1 mg/L y 5 mg/L. Permite la determinación de fenoles y de los compuestos sustituidos en orto y meta, pero no la de los compuestos sustituidos en para (por ejemplo, los *p-cresoles*).

La técnica consiste en que los materiales fenólicos reaccionan con 4-aminoantipirina en presencia de ferrocianuro de potasio a un pH de 10 para formar un tinte antipirina de color

marrón rojizo estable. La cantidad de color producida es una función de la concentración de material fenólico.

En tubos de ensayo se añadieron 2 mL de sobrenadante, de los mejores tratamientos que resultaron de los procesos fermentativos, posteriormente se ajusta el pH de la muestra a 10 utilizando NH_4OH (0.5 N), luego se añade 20 μL de 4-APP al 2% y 20 μL de ferrocianuro de potasio al 8%. Se agita y se deja incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.

El control consta de 2 mL de agua destilada, se ajusta el pH a 10 con NH_4OH de la solución stock, 20 μL de 4-APP (2%) y 20 μL de ferrocianuro de potasio al 8%.

Todas las muestras se aplicaron por triplicado y se realizó la lectura con una longitud de onda de 510 nm.

El porcentaje de remoción de compuestos fenólicos se calculó mediante la fórmula:

$$\% \text{ de remoción} = \frac{CF_1 - CF_r}{CF_1} \quad (6)$$

Donde CF_1 : concentración de fenoles en tiempo cero de fermentación.

CF_r : concentración de fenoles en el mejor tiempo de fermentación de producción de enzimas.

3.3.7. Remoción de metales pesados en biosólidos municipales

La determinación de metales pesados presentes en los biosólidos municipales se basó en la espectrometría masas por plasma acoplado inductivamente ICPMS. Esta técnica es altamente sensible y capaz de determinar de forma cuantitativa casi todos los elementos presentes en la tabla periódica que tengan un potencial de ionización menor que el potencial de ionización del argón a concentraciones muy bajas (nanogramo/litro o parte por trillón, ppt). Se basa en el acoplamiento de un método para generar iones (plasma acoplado inductivamente) y un método para separar y detectar los iones (espectrómetro de masas).

Para realizar el procedimiento se pesaron entre 150 y 200 mg de muestras, las cuales se sometieron previamente a un proceso de liofilización durante 48 horas. Posteriormente se adicionaron en tubos de teflón, se añadieron 10mL de ácido nítrico y se sometieron a un

proceso de digestión durante 1 hora. Finalmente se colectó el extracto en falcons de 15 mL y se aforó a 10 mL con agua destilada. Todas las muestras se aplicaron por triplicado.

El porcentaje de remoción de metales pesados se calculó mediante la fórmula:

$$\% \text{ de remoción} = \frac{CM_{p_1} - CM_{p_r}}{CM_{p_1}} \quad (7)$$

Donde CM_{p_1} : concentración de metales pesados en tiempo cero de fermentación.

CM_{p_r} : concentración de metales pesados en el mejor tiempo de fermentación de producción de enzimas.

3.3.8. Remoción de compuestos farmacéuticos en biosólidos municipales

Se extrajeron alícuotas (1 g) de muestras de biosólidos, las cuales se liofilizaron, previamente, durante 48 horas utilizando una solución mixta de metanol, ácido acético 0.1 M y Na₂-EDTA al 5% (2: 1: 1). Los extractos se limpiaron y se concentraron mediante extracción en fase sólida empleando cartuchos Strata-X (Phenomenex Inc., Torrance, CA) (200 mg, 6 ml). (Chenxi *et al.*, 2008).

Los análisis de concentración de compuestos farmacéuticos se realizaron utilizando una fuente de ionización por electrospray positiva (ESI +) en modo Multi-Reaction-Monitoring en un espectrómetro de masas Acquity UPLC XEVO TQ (Waters Corporation, Milford, MA) equipado con una columna Acquity UPLC HSS-T3 (100 mm x 2.1 mm, 1.8 μm). No se observó ningún efecto significativo de la matriz y la LOQ determinada se situó por encima de 2 ng*L⁻¹.

El porcentaje de remoción de compuestos farmacéuticos se calculó mediante la fórmula:

$$\% \text{ de remoción} = \frac{CC_{f_1} - CC_{f_r}}{CC_{f_1}} \quad (8)$$

Donde CC_{f_1} : concentración de compuestos farmacéuticos en tiempo cero de fermentación.

CC_{f_r} : concentración de compuestos farmacéuticos en el mejor tiempo de fermentación de producción de enzimas.

3.3.9. Ensayos toxicológicos

Para evaluar la toxicidad se realizaron bioensayos de acuerdo a Zucconi *et al.* (1981) y Torres *et al.* (2015) en semillas de lechuga (*Lactuca sativa*). Los ensayos de germinación de semillas de lechuga y de longitud de la radícula se realizaron en cajas de Petri las cuales contenían los sobrenadantes de los mejores tratamientos de biosólidos que resultaron del análisis estadístico. A continuación, se muestra en detalle cómo se realizaron estos experimentos.

Bajo un diseño completamente al azar con tres réplicas se colocaron en cada caja de Petri con papel de filtro 20 semillas de lechuga y se humedecieron con 8 mL de los sobrenadantes obtenidos a los 35 días de proceso fermentativo de los experimentos de biotratamientos, en relación 1:5 (biosólidos, agua destilada). Seguidamente se cubrieron las cajas de Petri con papel metálico y se incubaron en la oscuridad a una temperatura de 22 ± 2 °C durante 120 horas. Posteriormente se contaron las semillas germinadas en cada caja Petri para determinar el porcentaje de germinación.

Para determinar la longitud de la radícula de las plántulas se realizó un experimento previo, similar al planteado anteriormente, pero solamente añadiendo 6.67 mL de agua destilada, es decir en ausencia de sobrenadante, con el objetivo de seleccionar las plántulas que presentaron un crecimiento notable y lo más similar posible. Transcurrido el tiempo de incubación se seleccionaron las mejores semillas y se humedecieron con 1.33 mL de sobrenadante de biosólido. Se cubrieron con papel metálico y se incubaron en la oscuridad durante 120 horas a una temperatura de 22 ± 2 °C. Posteriormente se midió la longitud de la radícula con un instrumento de medición. Los controles utilizados en este experimento fueron los siguientes: control testigo (agua destilada) y control negativo (sobrenadantes de biosólidos sin inocular).

3.3.10. Análisis económico

3.3.10.1. Costo de producción de enzimas a escala de laboratorio

Con el fin de conocer la factibilidad de implementar la tecnología de obtención de cócteles enzimáticos en métodos de bioprocesos no esterilizados, mediante fermentación en estado sólido y en estado líquido de *Aspergillus sydowii* - like y *Aspergillus destruens* respectivamente utilizando como sustrato biosólidos municipales, se realizó un análisis económico sobre el costo de producción de enzimas, a escala de laboratorio.

A continuación, se detalla el análisis de costos sobre una base de 1 kg de lodo ó 1 L en dependencia del tipo de fermentación. Todos los precios se encuentran en dólares estadounidenses (\$).

El costo total de producción de enzimas se determinó a partir del costo de medio de cultivo (C_{MC}), costo de equipamiento (C_{eq}), costo de operación (C_{op}), actividad máxima de la enzima producida y peso de biosólido empleado.

Para evaluar el costo de los medios de cultivo, el costo de producción de biosólidos municipales se consideró insignificante y por tanto este término se asumió que era nulo.

El costo de equipamiento se representó como la suma de los costos de los equipos empleados (Ecuación 9), en este caso flujo laminar modelo ECOSHEL-1300, centrífuga modelo HERMLE Z 300K, horno modelo FUMACE 30400 e incubadora modelo INNOVA-44, para la producción de cocteles de enzimas.

$$C_{eq} = C_{eq\text{flujo laminar}} + C_{eq\text{centrífuga}} + C_{eq\text{horno}} + C_{eq\text{incubadora}} \quad (9)$$

Para obtener el costo de cada equipo fue necesario conocer su capacidad máxima, su período de garantía (PG) o tiempo de vida útil, datos otorgados por el proveedor, y su precio. La capacidad máxima de cada equipo se tuvo en cuenta para determinar el número máximo de cultivos que pueden tener lugar en cada ciclo durante un período de un año.

Tomando en consideración las suposiciones anteriores, se calculó el costo de cada equipo por cultivo mediante la ecuación 10.

$$C_{eq} = \frac{P}{\frac{365}{D_{max}} \times PG \times C_{ap}} \quad (10)$$

Donde D_{max} : el tiempo necesario para obtener la máxima actividad enzimática en un cultivo específico.

El costo de mano de obra del proceso dado no se consideró teniendo en cuenta que el proceso es automático y no requiere mano de obra calificada.

Similar al costo de equipamiento el costo de operación tiene que representar las condiciones reales de obtención de enzimas con el objetivo de simplificar el cálculo (Ecuación 11).

$$C_{op} = C_{opflujo\ laminar} + C_{opcentrífuga} + C_{ophorno} + C_{opincubadora} \quad (11)$$

Este término relaciona el tiempo diario de operación y el consumo de electricidad de cada equipo, así como el tiempo requerido para obtener la máxima expresión de actividad enzimática (Ecuación 12).

$$C_{op} = \frac{E \times (24 \times D_{max})}{C_{ap}} \quad (12)$$

Donde E representa el costo de la electricidad (Ecuación 9)

$$E = \text{Precio de la energía eléctrica } (\$/kW \times h) \times \text{Potencia}(kW) \times \text{tiempo de operación}(h) \quad (13)$$

El costo de producción de enzimas se representó mediante la suma del costo de medios de cultivo, costo de equipamiento y costo de operación dividido por el producto de actividad enzimática máxima y peso o volumen de biosólido en dependencia del proceso fermentativo (Ecuación 14).

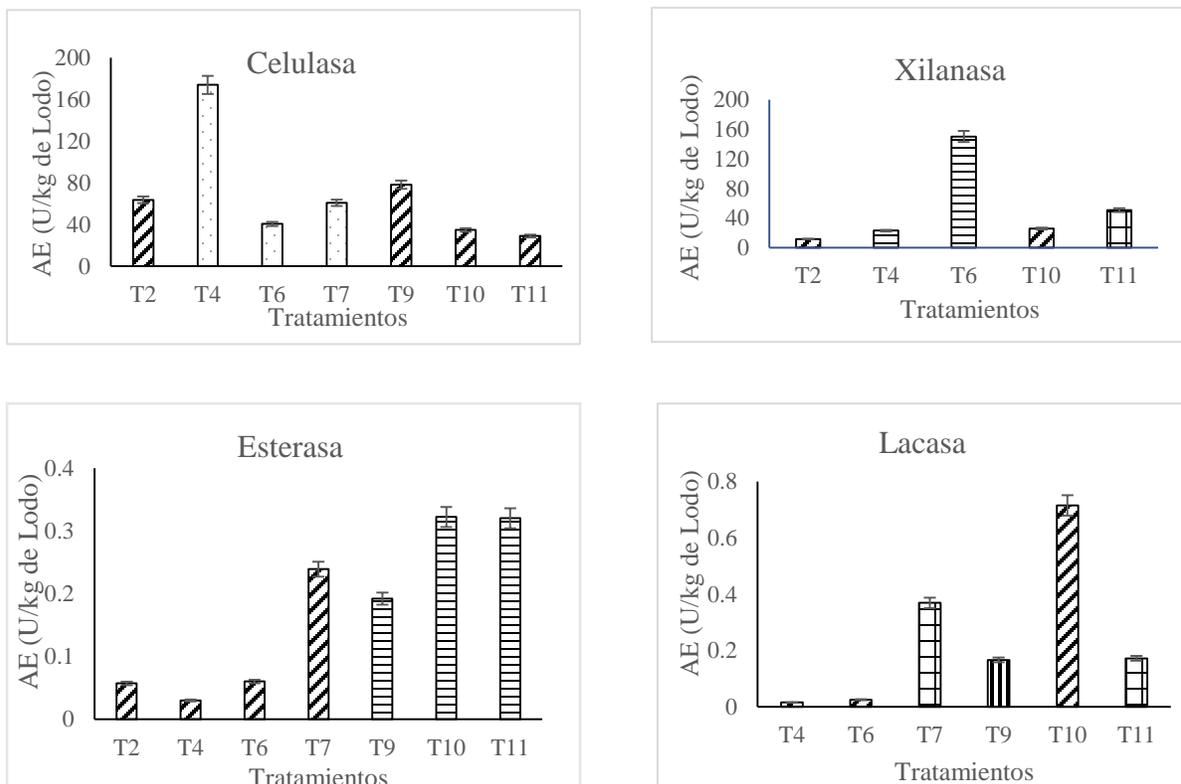
$$Costo_{producción\ de\ enzimas} = \frac{C_{MC} + C_{eq} + C_{op}}{Actividad_{máxima\ de\ la\ enzima\ producida} \times Peso\ biosólido} \quad (14)$$

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Tratamiento de biosólidos municipales. Fermentación en estado sólido *Aspergillus sydowii*-like

4.1.1. Cuantificación de enzimas extracelulares

Los hongos capaces de biodegradar utilizan su sistema enzimático, el cual secreta enzimas extracelulares, para descomponer polímeros complejos en compuestos de carbono más simples para la biodisponibilidad de la célula. Esto resulta de gran interés para obtener subproductos valiosos, con un alto valor agregado a partir de aguas residuales o biosólidos, por las ganancias económicas que se pueden obtener y la mitigación de residuos que contaminen el medio ambiente (Ang *et al.*, 2013). En la Figura 6 se muestran los mejores resultados de producción de cada enzima en estudio, teniendo en cuenta los tratamientos experimentales y los días donde se obtuvo la mayor actividad enzimática por kg de lodo.



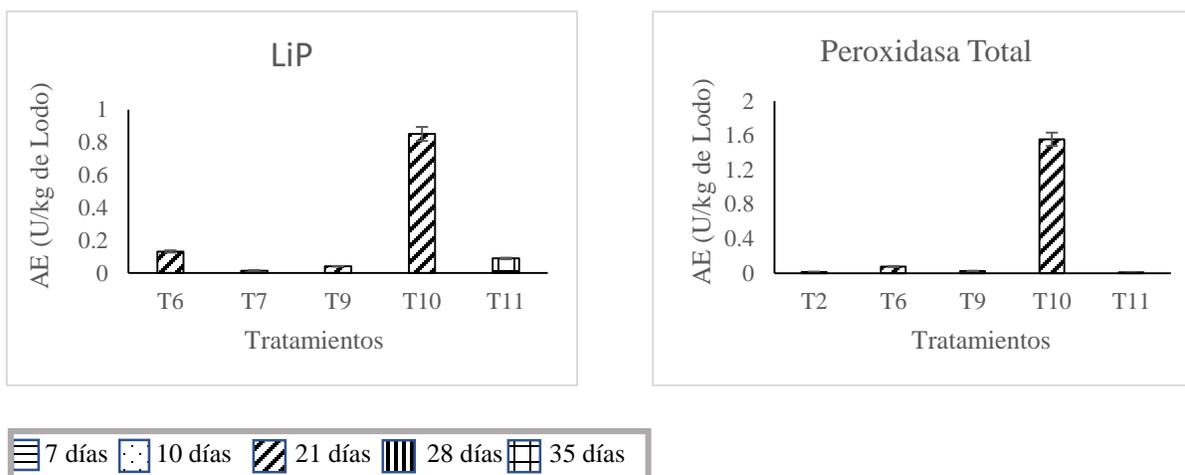
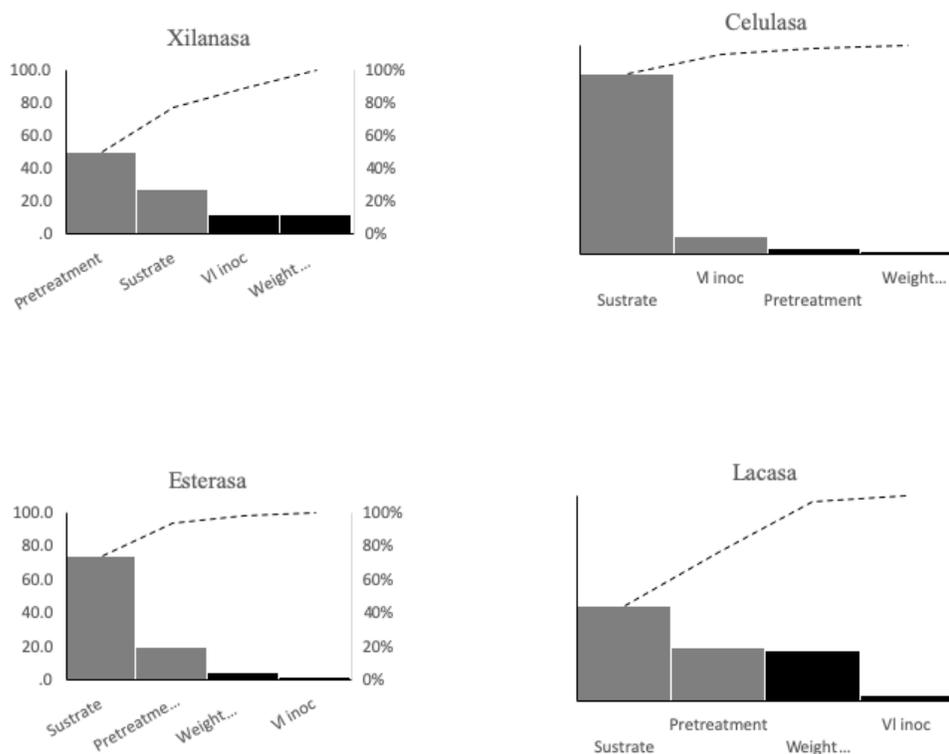


Figura 6. Máxima producción enzimática de diferentes tratamientos de biosólidos utilizando fermentación en estado sólido y la cepa *Aspergillus sydowii* - like.

En la Figura 6 se observa que los tratamientos T4, T6 obtuvieron los mejores valores de actividad enzimática por kg de lodo de celulasas y xilanasas. Para lacasa, esterasa, lignina peroxidasa (LiP), peroxidasa total fue el tratamiento 10. Los valores mayores de actividad se alcanzan con xilanasas y celulasas (150.40 y 174.00 U/kg de lodo) a los 7 y 10 días, respectivamente. El menor tiempo de máxima producción fue para la xilanasas y esterasa siendo de 7 días. Para lacasa, LiP y peroxidasa total fue a los 21 días. En el caso de la actividad amilasa en ninguno de los tratamientos se obtuvo producción de esta enzima.

Uno de los retos fundamentales en la producción y aplicación de enzimas a nivel industrial es su alto costo de producción, donde la materia prima incide directamente en este. La obtención de enzimas comerciales del lodo en este trabajo infiere como una posible fuente de materia prima barata para la obtención de productos de alto valor agregado. Los resultados obtenidos demuestran que bajo las condiciones de estudio las producciones de xilanasas y celulasas son respectivamente 96 y 111 veces superiores a la producción obtenida en el resto de las enzimas. Los tratamientos T2, T4, T6, T7, T9, T10, T11, produjeron en su mayoría estas enzimas. No fue el caso para los tratamientos T1, T3, T5, T8, T12 donde se obtuvieron actividades de algunas enzimas y en cantidades insignificantes. Es interesante que estos tratamientos no presentaron sustrato en su diseño experimental, aunque este aspecto no es concluyente ya que el T4 no presenta sustrato y obtuvo altos valores de actividad enzimática.

Para estudiar el efecto de las variables sobre la actividad enzimática se realizó un diagrama de Pareto representado en la Figura 7. A excepción de xilanasa el resto de las enzimas muestran al factor sustrato como el de mayor incidencia en la producción enzimática. El pretratamiento y el sustrato actúan de forma proporcional a la producción enzimática, en cambio, el volumen de inóculo y peso de lodo ejercen un efecto negativo en la producción, excepto en celulasa donde el volumen de inóculo ejerce un efecto positivo. La desproporción del efecto del sustrato es notable con respecto a las otras variables, en xilanasa, celulasa y esterasa sobrepasa el 50% de incidencia en la producción. Para peroxidasa total es más equitativa la incidencia de cada factor.



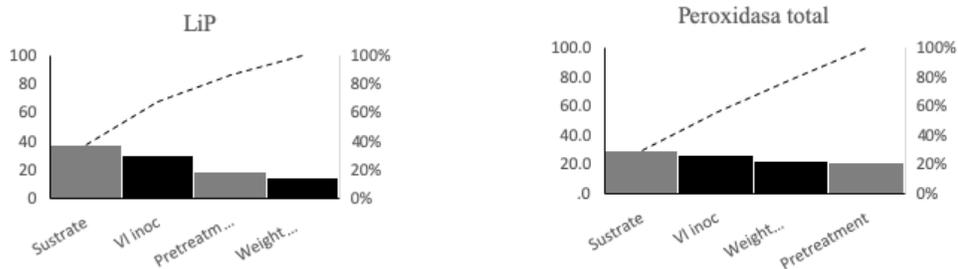
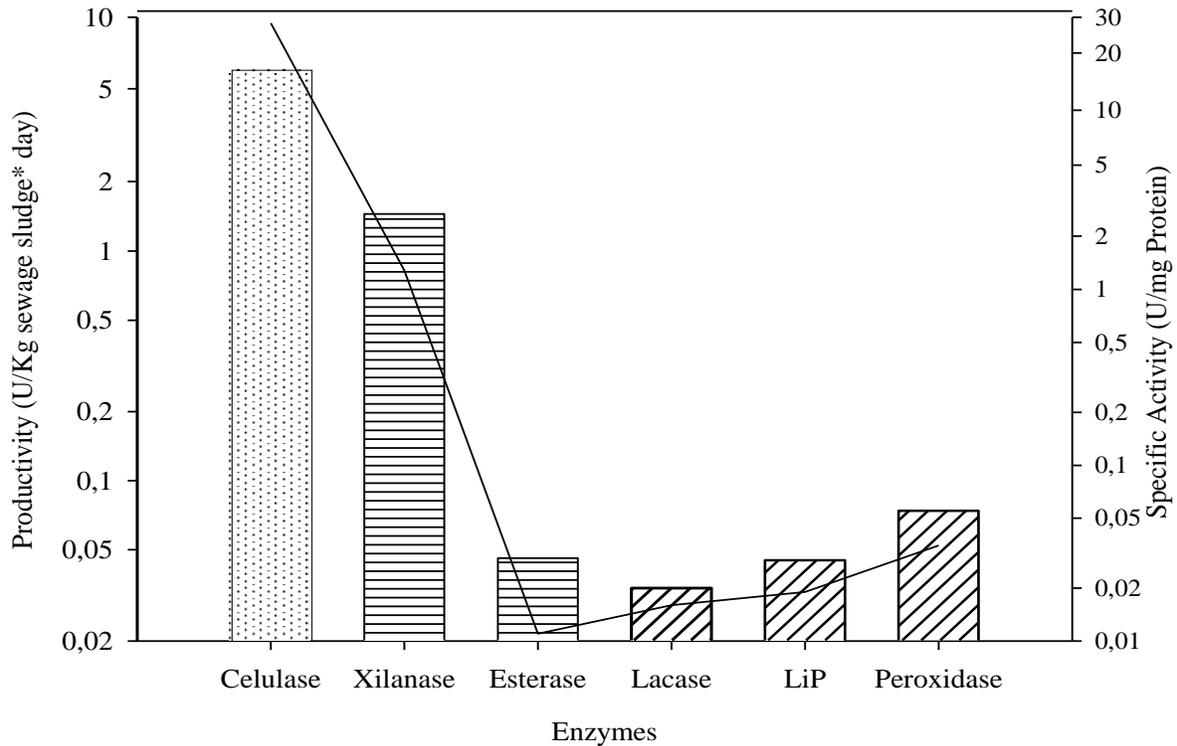


Figura 7. Diagrama de Pareto para todos los factores en la producción de enzima para $\alpha = 5\%$.

La combinación sustrato y pre-tratamiento representa alrededor del 80 % en la producción enzimática a excepción de las peroxidadas totales. Estos dos factores inciden en la secreción de enzimas extracelulares, el pre-tratamiento puede hidrolizar regiones en el material lignocelulósico haciendo más fácil el ataque enzimático, por otra parte, el sustrato puede actuar como inductor y fuente de carbono para el crecimiento del hongo, ventaja que presentan estos con respecto a las bacterias de crecer en condiciones adversas (More *et al.*, 2010).

Dos parámetros importantes en la producción se muestran en la Figura 8 la productividad y la actividad específica de cada enzima en función de los días donde se obtiene la mayor actividad enzimática.



Los resultados que se muestran son los mejores resultados de los tratamientos los días correspondientes a su mayor actividad de cada enzima.

7 días
 10 días
 21 días (Productividad)
 Actividad específica

Figura 8. Productividad y actividad específica de las enzimas de estudio.

Los mejores resultados de productividad se obtuvieron con celulasa y xilanasas siendo de 6,07 y 1,45 U*kg de lodo⁻¹*día⁻¹. El resto de las enzimas de estudio su productividad fue menor a 0,1 U*kg de lodo⁻¹*día⁻¹. Una tendencia similar mostró la actividad específica donde las celulasas y xilanasas obtuvieron las mayores actividades específicas (28,13 y 1,28 U/mg de proteína).

En la literatura se reporta que las lacasas y peroxidadas poseen baja especificidad lo que puede provocar ataques oxidativos en una amplia gama de contaminantes. Es interesante observar que el incremento del peso de lodo para todas las producciones enzimáticas ejerce un efecto negativo. Factor a tener en cuenta debido a que, si analizamos la actividad es reflejada en base al peso de lodo, por lo que podría haber un compromiso de optimización en

esta variable. Las actividades específicas de esterasa, lacasa, LiP y peroxidasas son bajas mientras que los valores de actividad específica de celulasa y xilanasas son altos (Figura 8). Resultados que podrían incidir en una mayor recuperación y un procedimiento más fácil que para las otras enzimas de estudio. La productividad de celulasas y xilanasas fue superior al resto de las enzimas (6,07 y 1,45 U*kg de lodo⁻¹*día⁻¹, respectivamente), valores significativos que requieren un análisis económico, para estudiar la factibilidad de obtención de estas enzimas. Para esterasa, lacasa, LiP y peroxidasas la productividad fue menor a 0,1 U*kg de lodo⁻¹*día⁻¹, valores que podría comprometer su obtención. Estos valores bajos de productividad son debido a su baja actividad enzimática en el lodo.

Los resultados infieren que el sistema expresa su maquinaria enzimática para degradar el material lignocelulósico como celulasa y xilanasas desde los primeros días del cultivo. Desde los 4 días de tratamiento de biosólidos se obtiene actividad celulasa, alcanzando su mayor producción a los 10 días, por su parte, la actividad xilanasas se obtiene desde los 7 días, actuando posteriormente las oxidoreductasas (21 días), esto puede explicarse por el acceso que podrían tener las oxidoreductasas una vez que las paredes del material lignocelulósico es parcialmente hidrolizado por la acción de las celulasas y xilanasas.

Los resultados obtenidos confirman trabajos preliminares de otros autores como Smit *et al.* (1980), donde demostró que el lodo es capaz de producir altas actividades enzimáticas. Verma *et al.* (2005), estudió la producción de proteínas y enzimas empleando *Trichoderma* sp. llegando a concluir que es factible producir productos de alto valor agregado con lodos. Alam *et al.* (2003b) empleando *Penicillium corylophilum* y *Aspergillus niger* durante 4 días concluyó que el lodo conteniendo un sustrato como fuente de carbono fue mejor que sin usar sustrato para la producción enzimática. El sustrato de mejor resultado fue con paja de trigo. Michelin *et al.* (2017) reportó un incremento en un 20% en la producción de celulasas con previo tratamiento que sin pretratar.

4.1.2. Optimización de múltiples respuestas

La Figura 9 muestra la optimización de múltiples respuestas para cada uno de los grupos de enzimas. Se aprecia que el mayor valor de deseabilidad lo presenta T10, para enzimas ligninolíticas. Esto significa que la combinación volumen de inóculo de 1.5 mL y un peso de lodo de 20 g pre-tratados con la adición de sustrato paja de trigo es la idónea para obtener la máxima producción de lacasa, lignina peroxidasa y peroxidasa total (Figura 9 (A)). Para la obtención de enzimas lignocelulolíticas el mejor tratamiento es T6, deseabilidad 1.000 con un volumen de inóculo 1.5 mL y 30 g de biosólido suplementado con 1 g de paja de trigo, mientras que T4, como se aprecia en el gráfico de contorno, Figura 9 (C), es el que presenta la combinación de factores más idóneos (volumen de inóculo 3 mL y 30 g de biosólido pre-tratado) para la obtención máxima de enzimas esterazas con una deseabilidad de 0.500.

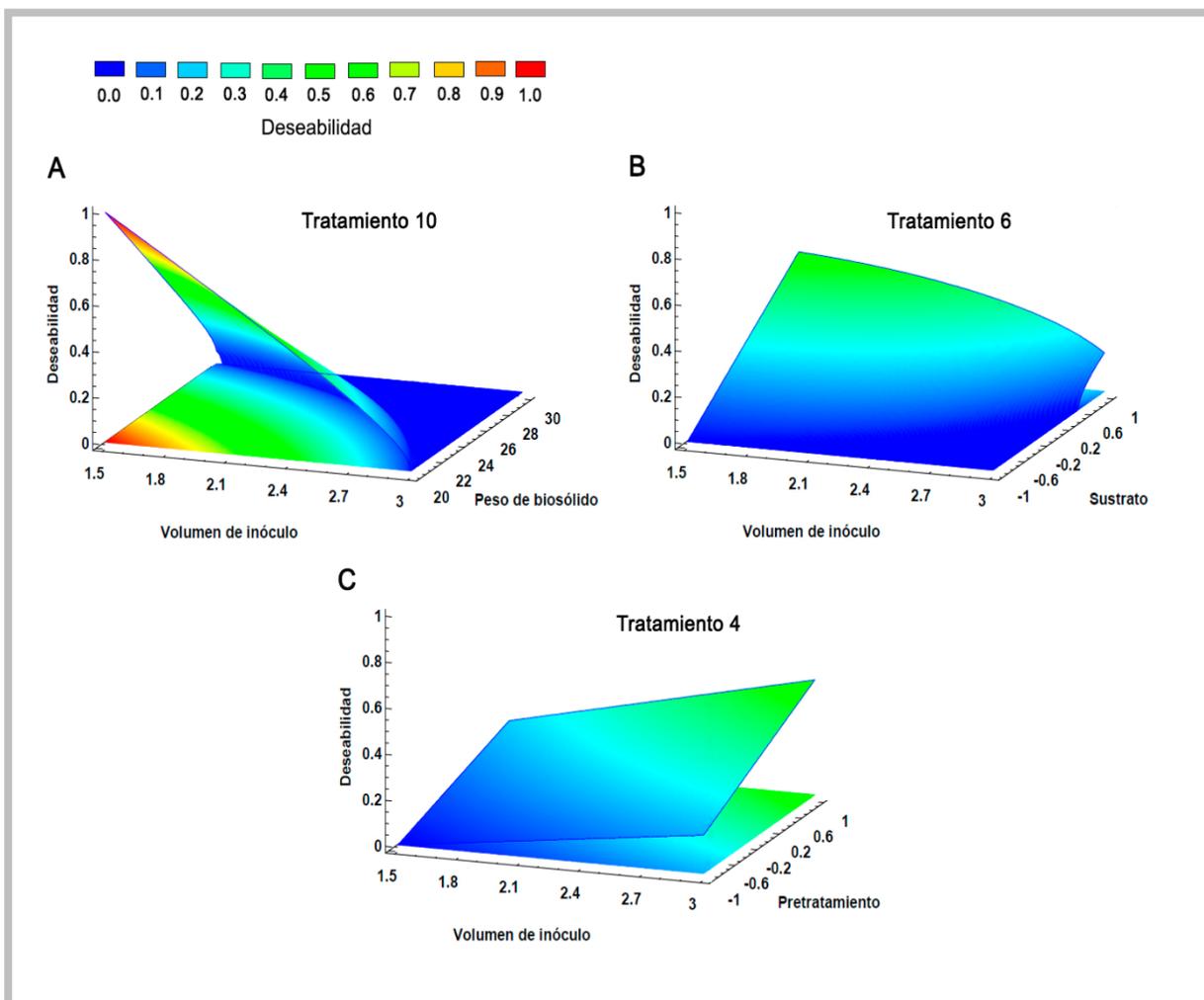


Figura 9. Gráficos de Superficie de Respuesta Estimada. A) Enzimas ligninolíticas; B) Enzimas lignocelulolíticas; C) Esterazas.

4.1.3. Degradación de colorantes Congo Rojo y Naranja II

La demanda de enzimas industriales se encuentra en continuo aumento debido a sus propiedades bioquímicas y a la creciente necesidad de alternativas sostenibles. Enzimas con alta actividad catalítica y alta estabilidad aparejado con la reducción de los costos de producción a escala industrial, son aspectos deseados (Godoi *et al.*, 2011). Con el objetivo de demostrar las características mencionadas en el cóctel enzimático obtenido, conformado por las enzimas lacasa, lignina peroxidasa, peroxidasa, celulasa, xilanasas y esterasa de los mejores tratamientos que resultaron del análisis estadístico se realizó un experimento de aplicación, de decoloración de colorantes empleados en la industria textil.

En la Figura 10 se muestra la tendencia en el tiempo del porcentaje de decoloración del Rojo Congo y Naranja II respectivamente. En ambos colorantes se obtuvo un incremento a través del tiempo del porcentaje de decoloración, aunque en el Congo Rojo desde las primeras horas del experimento, se logró un 19% de decoloración. El 100% de decoloración se obtuvo a las 48h, en el caso del Naranja II se obtuvo en este mismo tiempo un 19% de decoloración.

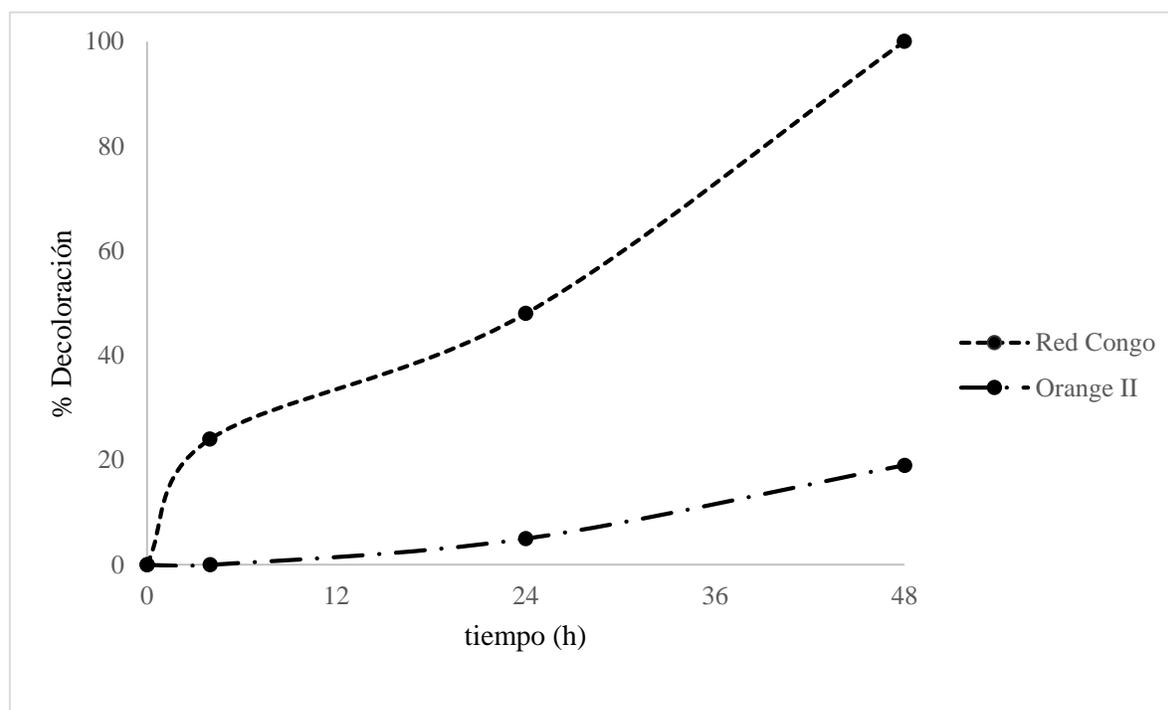


Figura 10. Decoloración de Congo Rojo y Naranja II empleando un cóctel enzimático de los mejores tratamientos en estudio.

Los colorantes Rojo Congo y Naranja II, corresponden a la clase azo, los que representan más del 50% de los cien mil tipos de colorantes que se producen (Palacios *et al.*, 2016). Entre estos dos colorantes existen diferencias en la estructura química, geometría y polaridad de las moléculas. La estructura química determina el color y las propiedades además proporciona la única base racional para la clasificación de estos compuestos (Kiernan 2001). Estos aspectos podría ser la diferencia de la pendiente en los tiempos iniciales del experimento de los dos colorantes (Figura 10). La pendiente en el Rojo Congo es más pronunciada que en el Naranja II, esto infiere un ataque enzimático más acentuado en el Rojo Congo. Bajo las condiciones de experimentación a pH neutro las enzimas lacasas, LiP, esterasas, peroxidasas tendrán carga negativa por sus puntos isoelectricos característicos, por lo que la afinidad de ataque al Rojo Congo en un pKa de 4.1 (liberando protones), podría interactuar con las enzimas. En el caso del Naranja II el pKa es básico, esto podría implicar una menor afinidad por carga de las enzimas con este colorante. Es interesante que a la concentración de estudio (100 mg/L) los colorantes no ejercieron inhibición en las enzimas manteniendo un 90 % y superior de actividad enzimática remanente, en otros trabajos reportados la concentración sí influyó en la producción enzimática, lo cual afectó la degradación de colorantes (Cardona *et al.*, 2009), por otra parte, el tiempo de experimentación fue menor que otros artículos. Cardona *et al.* (2009) empleando *P. chrysosporium* y *P. sórdida* obtuvieron un porcentaje de degradación del 80% del Naranja II en 6 días. Resultados similares al presente trabajo se obtuvieron con el Rojo Congo, empleando *Geobacillus catemuluss* MSS con un 9 % de decoloración en 32 h (Verma & Shirkot, 2014). Suwannawong *et al.* (2010) empleando *Lentinus polychrous* obtuvo un 75 % de decoloración del Rojo Congo, Ivam *et al.* (2003) por su parte, obtuvo un 19% de decoloración usando *Thelephora* sp. en el Naranja II. Bosco *et al.* (2016), determinó que el porcentaje de decoloración está relacionado con la concentración de enzima, el mejor valor lo obtuvo a 200 U/L de LiP, veinte veces superior a la concentración de LiP obtenida en este trabajo. A pesar que la actividad enzimática de las oxidoreductasas en este trabajo es baja se demuestra que para la decoloración de tintes juegan un papel importante. Su mecanismo de degradación de contaminantes es a través de radicales libres. Enzimas como lacasas y otras oxidasas pueden oxidar compuestos químicos para formar estos radicales (Cañas &

Camarero, 2010), los mismos pueden actuar oxidando compuestos que, de otro modo, las enzimas no podrían oxidar.

Se ha reportado también, que la adsorción de colorantes en varios materiales lignocelulósicos puede ser un método alternativo para eliminarlos. Sin embargo, este método puede crear otro problema de contaminación. Nigam et al. (2000) propusieron un método de dos pasos, adsorción, y luego fermentación en estado sólido, para retirar y biorremediar los colorantes presentes en aguas residuales. Ellos demostraron que los materiales lignocelulósicos fermentados podrían ser utilizados como fertilizantes y además degradar los colorantes presentes y utilizar estos sustratos lignocelulósicos absorbentes para la producción de enzimas de importancia biotecnológica. Por otra parte, Ozmen y Yesilada (2012) demostraron la producción de lacasa y la decoloración del tinte Astrazon de *T. versicolor* ATCC 200801 y *T. troglia* ATCC 200800 utilizando este método de dos pasos. Mientras que *T. troglia* mostró un 80% de degradación de Negro Astrazon y un 69% de Azul Astrazon empleando salvado de trigo como sustrato, *T. versicolor* mostró una decoloración de 86% y 84% de Negro Astrazon y Azul Astrazon, respectivamente, bajo las mismas condiciones. Este proceso pudiese ser una forma económica y fácil de biorremediación de aguas residuales.

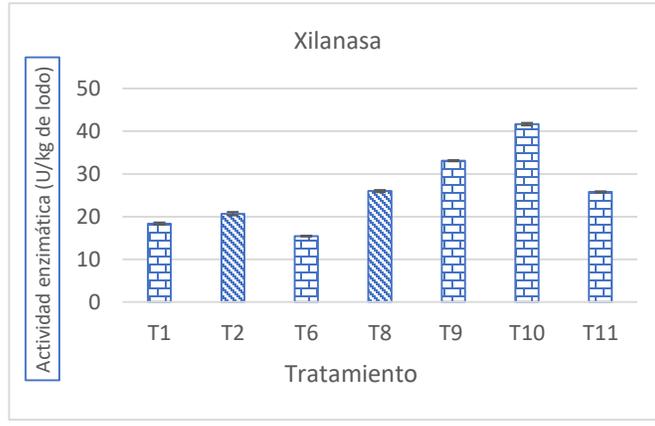
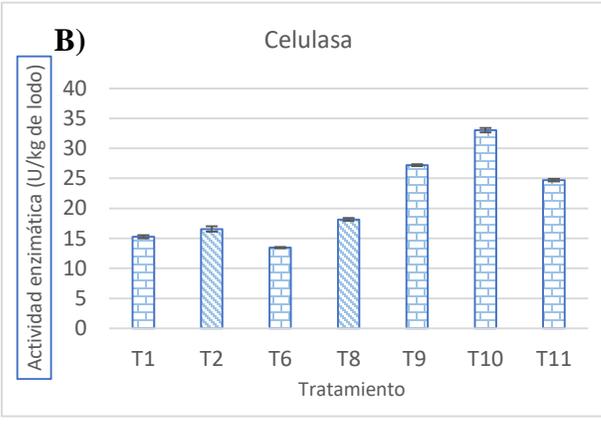
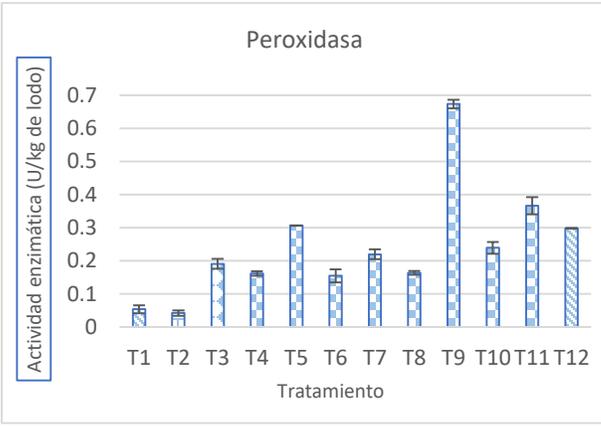
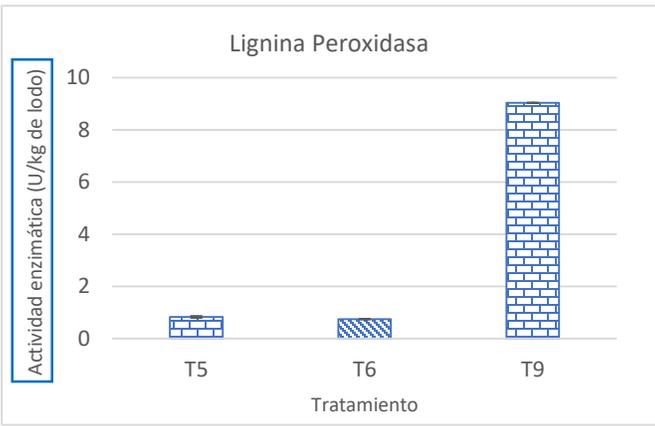
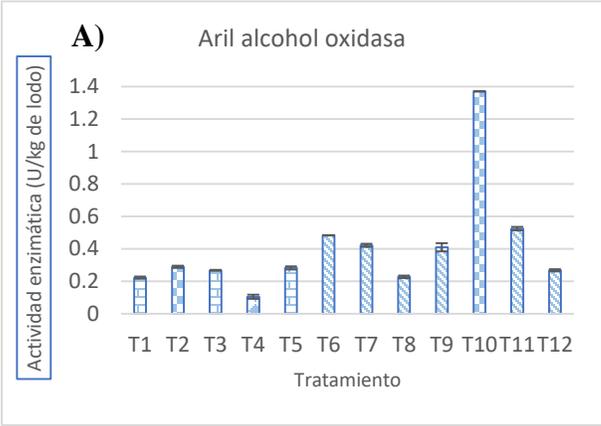
Los métodos físicos y químicos son los que se utilizan comúnmente para el tratamiento de aguas residuales que contienen colorante. Sin embargo, estos métodos suelen ser muy costosos, y la acumulación de lodo concentrado crea un problema de eliminación después de la eliminación del colorante (Yesilada *et al.*, 2018). Algunos métodos también pueden producir subproductos más serios, como las aminas aromáticas tóxicas (Robinson et al. 2001). Dado que los colorantes sintéticos están diseñados para resistir la degradación, los sistemas biológicos convencionales no son eficientes para su biorremediación y decoloración. Si bien algunos microorganismos anaeróbicos tienen el potencial de degradar varios colorantes, estos microorganismos pueden producir aminas aromáticas tóxicas que pueden tener un efecto más devastador. Los hongos y sus enzimas tienen un potencial prometedor para la biorremediación de diversos xenobióticos y aguas residuales. Por lo tanto,

pueden ser una alternativa a la biorremediación tradicional de colorantes textiles (Prasad 2017)

4.2. Tratamiento de biosólidos municipales. Fermentación en estado sólido *Aspergillus destruens*

4.2.1. Cuantificación de enzimas extracelulares

La tecnología de fermentación en estado sólido, en los últimos años ha ganado una gran atención debido a su importancia creciente para la producción de productos de alto valor agregado, por ejemplo, enzimas, a partir de subproductos agroindustriales (Bakry *et al.*, 2015, Buck *et al.*, 2015). Este proceso implica el crecimiento de microorganismos en sustratos húmedos sólidos en ausencia de agua que fluye libremente. En la Figura 11 se exponen las cuantificaciones máximas de actividades enzimáticas obtenidas a partir de tratamientos fúngicos de biosólidos, procedentes de la planta de tratamiento de aguas residuales de Magog, Quebec, en diferentes días de proceso fermentativo. Se aprecia que los mejores tratamientos en la producción de enzimas ligninolíticas fueron T9, T10, T11 y T12, alcanzando T9 en lignina peroxidasa 9.04U/kg de lodo a los 14 días de fermentación, mientras que en T10 a los 21 días de tratamiento fúngico se obtuvieron 1.37 U/kg de lodo de actividad enzimática aril alcohol oxidasa. Las menores producciones se obtuvieron en la actividad enzimática peroxidasa, alcanzando 0.67 U/kg de lodo T9 a los 21 días de proceso fermentativo. Las producciones de lacasa y manganeso peroxidasa en ningún tratamiento fueron significativas. Por otra parte, el tratamiento 10 fue el mejor en cuanto a producción de enzimas lignocelulolíticas obteniéndose 33.04 U/kg de lodo en la actividad celulasa y 41.67 U/kg de lodo en xilanasas respectivamente a los 14 días de proceso fermentativo. Los tratamientos 2 y 12 presentaron los máximos valores de actividades enzimáticas amilasa y esterasa respectivamente obteniéndose en T2 la mayor producción de U/kg de lodo en las actividades determinadas 311.45 en solo 14 días de tratamiento fúngico mientras que en T12, se alcanzaron 2.19 U/kg de lodo de actividad esterasa en un tiempo similar de fermentación.



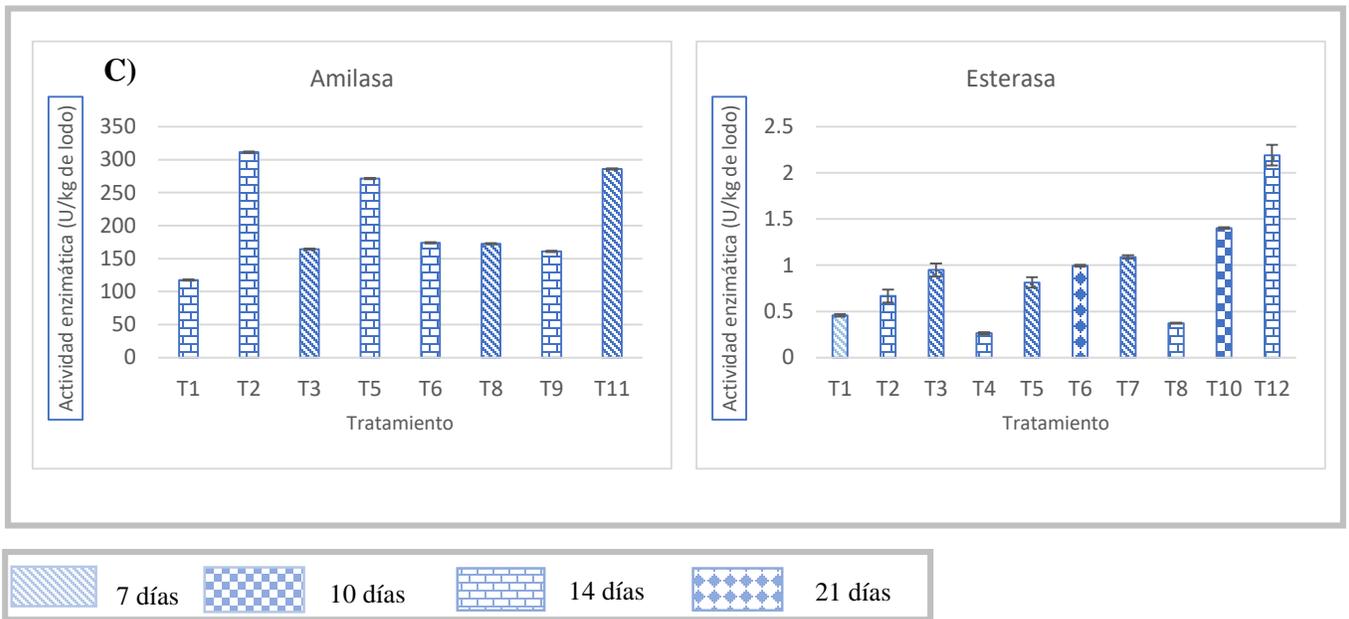


Figura11. Máxima producción de enzimas de diferentes tratamientos de biosólidos mediante fermentación en estado sólido con la cepa *Aspergillus destruens*. A) Enzimas ligninolíticas; B) enzimas lignocelulolíticas; C) Otras enzimas.

Varios hongos como *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Fusarium solani*, *Humicola insolens*, *Penicillium brasilianum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, *Trametes versicolor*, *Penicillium sp.*, se han empleado para la producción de celulasa, mediante fermentación en estado sólido (Behera *et al.*, 2016). Quiroz-Castaneda y colaboradores en 2011 analizaron el crecimiento y la producción de enzimas celulolíticas por dos hongos basidiomicetos *Bjerkandera adusta* y *Pycnoporus sanguineus* cultivados en materiales lignocelulósicos (paja de trigo, cáscara de arroz, rastrojo de maíz, cáscara de semilla de jatropha molida, y sierra de cedro y roble), en este estudio se compararon las tasas de crecimiento y los niveles de actividad celulolítica y xilanolítica. De manera similar, se desarrolló un proceso fermentativo sólido en orujo de tomate con los hongos de pudrición blanca *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor*, utilizando tallos de sorgo sustrato para la producción lacasa, proteasa y xilanas (Iandolo *et al.*, 2011). Por otra parte, Deswal y colaboradores (2011) informaron la optimización de diversos parámetros fisiológicos y nutricionales para la producción de celulasa a partir del hongo de la putrefacción marrón recién aislado *Fomitopsis sp.* (RCK2010) utilizando sustratos de bajo costo como paja de trigo y paja de arroz en condiciones fermentativas sólidas. En 2013 un

grupo de científicos liderados por Ang aislaron un hongo lignocelulósico degradante, *Aspergillus fumigatus* SK1 de estiércol de vaca y afirmaron que la cepa SK1 era la productora de xilanasas más potente con un alto nivel de secreción de celulasa en comparación con otros 16 hongos seleccionados, utilizando un tronco de palma de aceite no tratado como sustrato mediante fermentación en estado sólido.

4.2.2. Optimización de múltiples respuestas

Los mejores tratamientos que resultaron del análisis estadístico optimización de múltiples respuestas se observan en la Figura 12. Se aprecia que para la producción máxima de enzimas ligninolíticas es necesario que 20 g de biosólido se encuentren suplementado con paja de trigo y que se inoculen 3 ml de las cepas de estudio, condiciones presentadas por T9. La combinación de factores óptima para la producción máxima de enzimas celulasa y xilanasas lo presenta el tratamiento 10 con una deseabilidad de 1.000, mientras que T12 conformado por todos los factores en su nivel bajo es el óptimo para obtener las mayores producciones de actividades enzimáticas amilasa y esterasa.

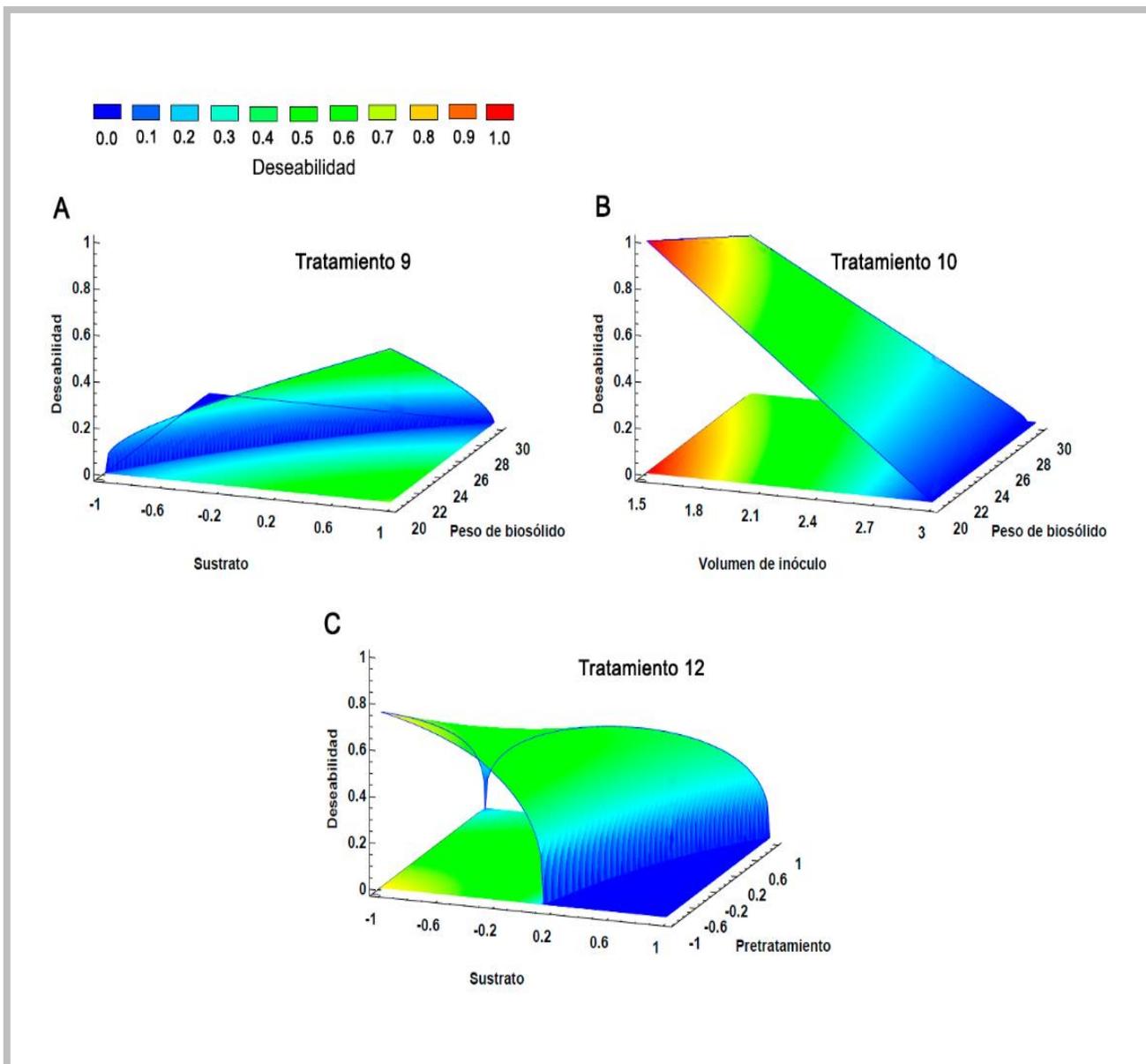


Figura 12. Gráficos de Superficie de Respuesta Estimada. A) Enzimas ligninolíticas; B) Enzimas lignocelulolíticas; C) Otras enzimas.

4.3. Tratamiento de biosólidos municipales mediante fermentación en estado líquido con las cepas *Aspergillus sydowii* – like y *Aspergillus destruens*

4.3.1. Cuantificación de enzimas extracelulares

Las enzimas tienen actualmente diversas aplicaciones industriales (Colla *et al.*, 2016). El mercado industrial de enzimas continúa creciendo debido al desarrollo de nuevas tecnologías de producción, el uso de ingeniería genética durante la producción y el surgimiento de nuevos campos de aplicación. El mercado global de enzimas en 2007 fue de 2.3 mil millones de dólares y se espera que sea de 2.7 mil millones de dólares en 2012 (Iyer & Ananthanarayan., 2008).

Las enzimas de interés industrial se producen principalmente a través de la fermentación sumergida en cultivos batch y fed batch empleando hongos filamentosos. Los procesos sumergidos tienen algunas ventajas sobre los procesos en estado sólido, como una mayor homogeneidad del medio de cultivo y una mayor facilidad para controlar parámetros como la temperatura y el pH (Pandey *et al.*, 2000). En la Figura 13 se muestran las máximas producciones de enzimas, para cada cepa, obtenidas en diferentes días de proceso fermentativo por cada uno de los tratamientos en estudio. Se aprecia que los mejores tratamientos para la obtención de enzimas ligninolíticas con *A. sydowii* – like fueron T11 (aril alcohol oxidasa, lacasa y peroxidasa) y T12 (lignina peroxidasa) mientras que con *A. destruens* en estos mismos tratamientos se alcanzaron 2.4 veces la producción de lignina peroxidasa obtenida en *A. sydowii* – like (T12) y 2.5 veces de aril alcohol oxidasa (T11) respectivamente. La producción de peroxidasa en el tratamiento 2 con *A. destruens* fue 1.7 veces superior a la obtenida por T11 con *A. sydowii* – like. En ambas cepas las producciones de lacasa fueron similares mientras que las U/L de enzima manganeso peroxidasa no fueron apreciables. Los mejores tratamientos en la obtención de enzimas lignocelulolíticas fueron, para *A. sydowii* – like T2 y para *A. destruens* T4, siendo superiores los resultados alcanzados en *A. sydowii* – like, sin embargo, con *A. destruens* se lograron las máximas producciones de celulasa y xilanas en los primeros días de tratamiento fúngico. Por otra parte, los valores obtenidos de actividades amilasas fueron aproximadamente 5.8 veces superiores en

Aspergillus destruens (T1) que en *A. sydowii* – like (T8), mientras que con la cepa *A. sydowii*-like se obtuvo el máximo valor de actividad esterasa 3.38 U/L (T9), no obstante, el tratamiento 4 con *A. destruens* en solo 10 días alcanzó 2.57 U/L de actividad esterasa. En ambas cepas no se alcanzaron producciones significativas de lipasas, excepto en T11 con *A. sydowii* - like que se lograron 0.17 U/L.



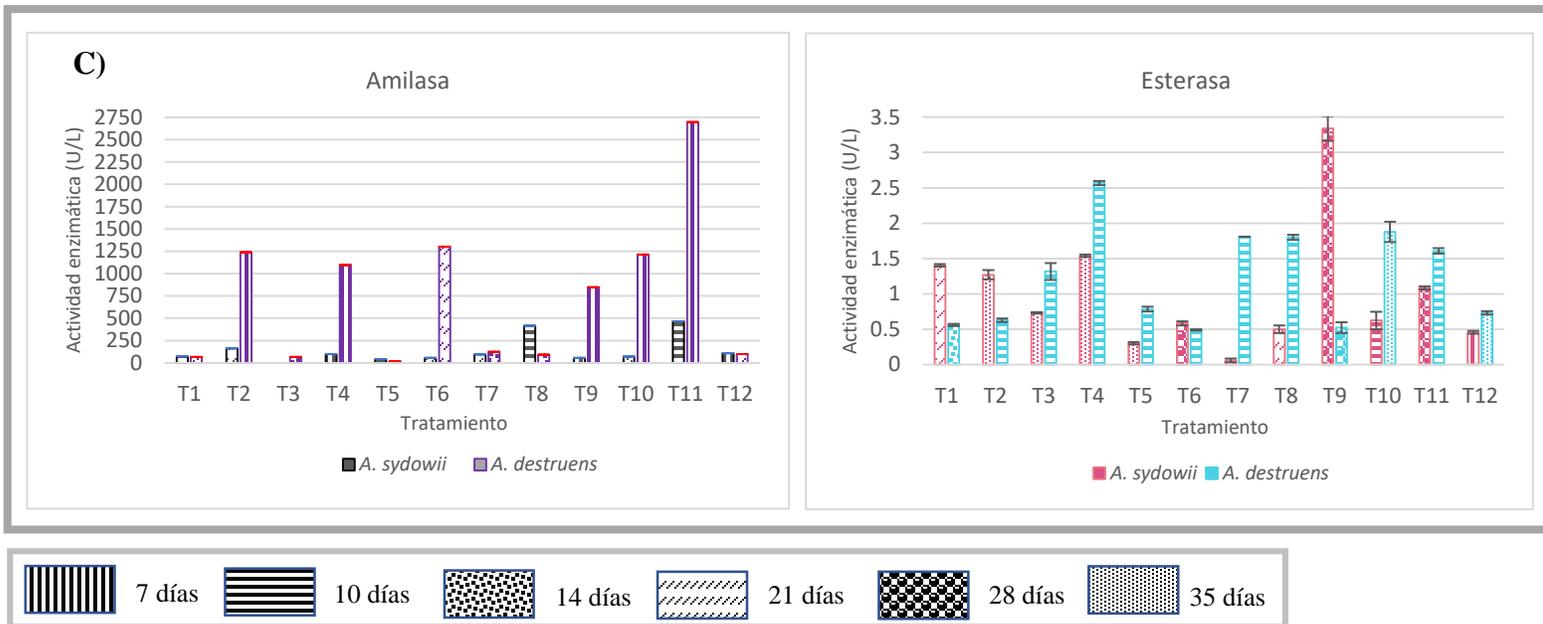


Figura 13. Máxima producción de enzimas de diferentes tratamientos de biosólidos en fermentación líquida con las cepas *Aspergillus sydowii* – like y *Aspergillus destruens*. A) Enzimas ligninolíticas; B) enzimas lignocelulolíticas; C) Otras enzimas.

Como se aprecia, las mayores producciones enzimáticas se obtienen con los tratamientos que presentan sustrato y/o pre-tratamiento, excepto T1 y T12 donde varía el peso de biosólidos. Esto puede deberse a que el pre-tratamiento permite disociar el complejo formado por la hemicelulosa, celulosa y lignina y hace que la celulosa sea más accesible a las enzimas celulolíticas, lo que a su vez reduce los requerimientos de enzimas y, por lo tanto, el costo de producción, mientras que el sustrato paja de trigo es un material lignocelulósico que suministra la fuente de carbono necesaria a las cepas en estudio para sostener su crecimiento e inducir la producción del complejo enzimático.

Reportes sobre *Trametes ochracea* mostraron que esta cepa es capaz de producir enzimas lacasa y manganeso peroxidasa a partir de aguas residuales procedentes de una biorefinería de aceite de oliva. En este estudio realizado por Vaydia y colaboradores en 2019 se alcanzaron producciones de 270 U/L de actividad lacasa y 87.2 U/L de actividad manganeso peroxidasa respectivamente en reactores de tanque agitado equipados con turbinas Rushton o impulsor marino. Alam y colaboradores en 2009 demostraron que *Phanerochaete chrysosporium* (*Basidiomycota*) produjo 687 U/L de lignina peroxidasa utilizando como

sustrato biosólidos municipales. Pese a que estos resultados son superiores a los obtenidos es necesario aclarar que ambos estudios se realizaron a una escala mayor, es decir en reactores, mientras que en este proyecto el proceso fermentativo se realizó en Erlenmeyers sin agitación.

4.3.2. Cuantificación de azúcares reductores

Actualmente, la producción de azúcares reductores enfrenta una crisis socio-energética ya que estos se derivan exclusivamente del sector alimenticio, una alternativa atractiva es la producción a partir de materiales lignocelulósicos, residuos que no compiten directamente con los alimentos destinados al consumo humano y animal y, además, permite aprovechar grandes cantidades de biomasa que generan los procesos agroindustriales (Rojas *et al.*, 2011). Los biosólidos contiene en su composición química celulosa, hemicelulosa y lignina es por ello que se procedió a determinar la producción de azúcares reductores en paralelo con la realización de actividades enzimáticas. En la Figura 14 se muestra la cuantificación de azúcares reductores obtenidos a los días 28 y 35 días de fermentación por cada uno de los tratamientos fúngicos. Como se observa la producción de azúcares reductores fue superior en *Aspergillus destruens* que en *Aspergillus sydowii* – like, alcanzando su mayor valor en T7 con 2.8mg/ml, mientras que la máxima producción con *Aspergillus sydowii* – like se obtuvo en T10 siendo 3.5 veces inferior a la concentración alcanzada en T7.

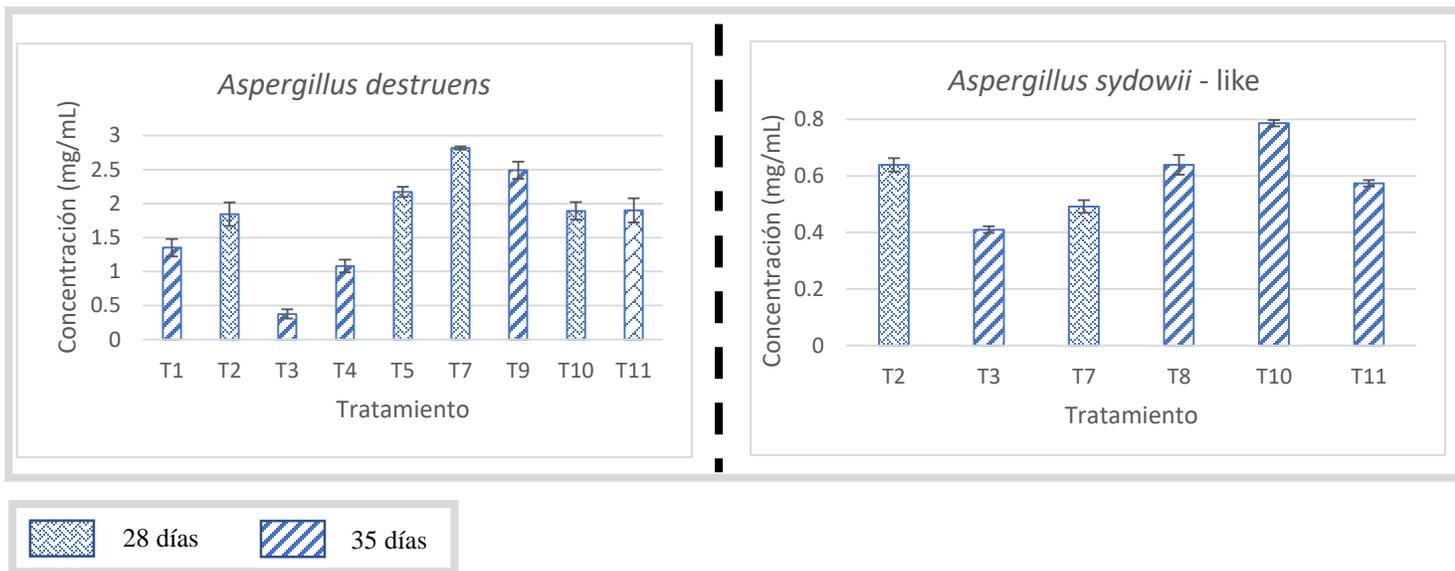


Figura 14. Máxima producción de azúcares reductores de diferentes tratamientos de biosólidos con las cepas *Aspergillus sydowii* - like y *Aspergillus destruens*.

4.3.3. Optimización de múltiples respuestas

Se muestra el efecto de cada variable de estudio en la superficie generada para la optimización de las variables respuestas (producciones enzimáticas) por medio del estadístico deseabilidad (Figuras 15 y 16). Se aprecia que para la mayor producción de enzimas ligninolíticas las combinaciones idóneas son las que presentan T11 para el caso de *Aspergillus sydowii* – like y T2 para *Aspergillus destruens*. Para la obtención de enzimas lignocelulolíticas los mejores tratamientos fueron T2 y T4, con una deseabilidad de 1.000 en ambos casos, en estos tratamientos los factores volumen de inóculo, pre-tratamiento y peso de lodo se encuentran en su nivel alto. Los tratamientos 8 y 1 fueron los mejores en cuanto a la producción de enzimas amilasa, esterasa y lipasa a partir del tratamiento de biosólidos con las cepas de estudio, presentando una deseabilidad cercana a 0.600.

Aspergillus sydowii - like

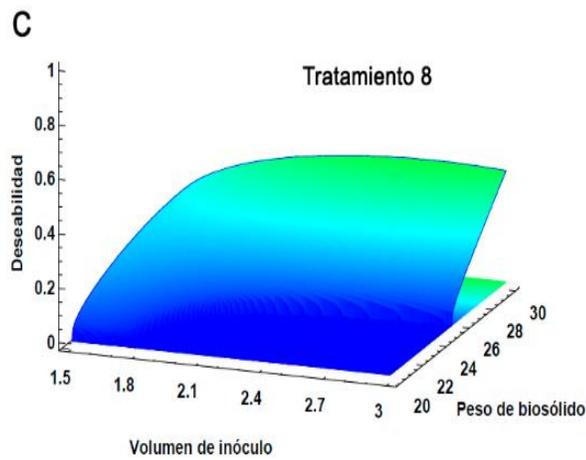
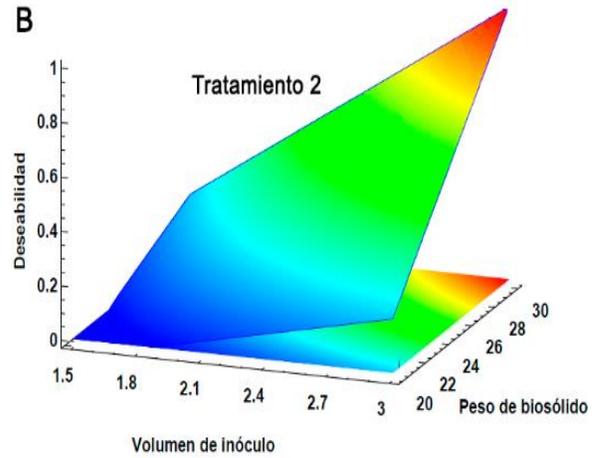
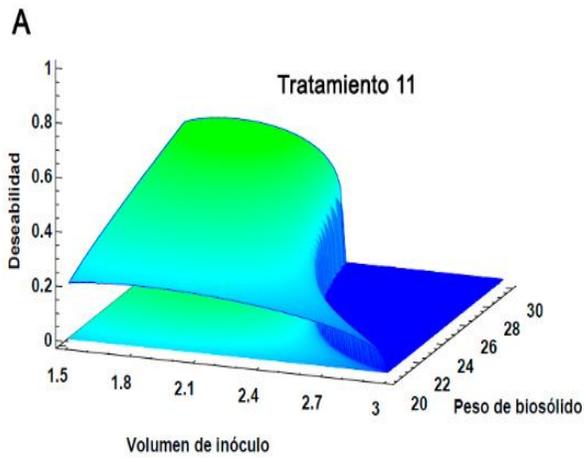


Figura 15. Gráficos de Superficie de Respuesta Estimada. A) Enzimas ligninolíticas; B) Enzimas lignocelulolíticas; C) Otras enzimas. Mejores tratamientos de *Aspergillus sydowii* – like.

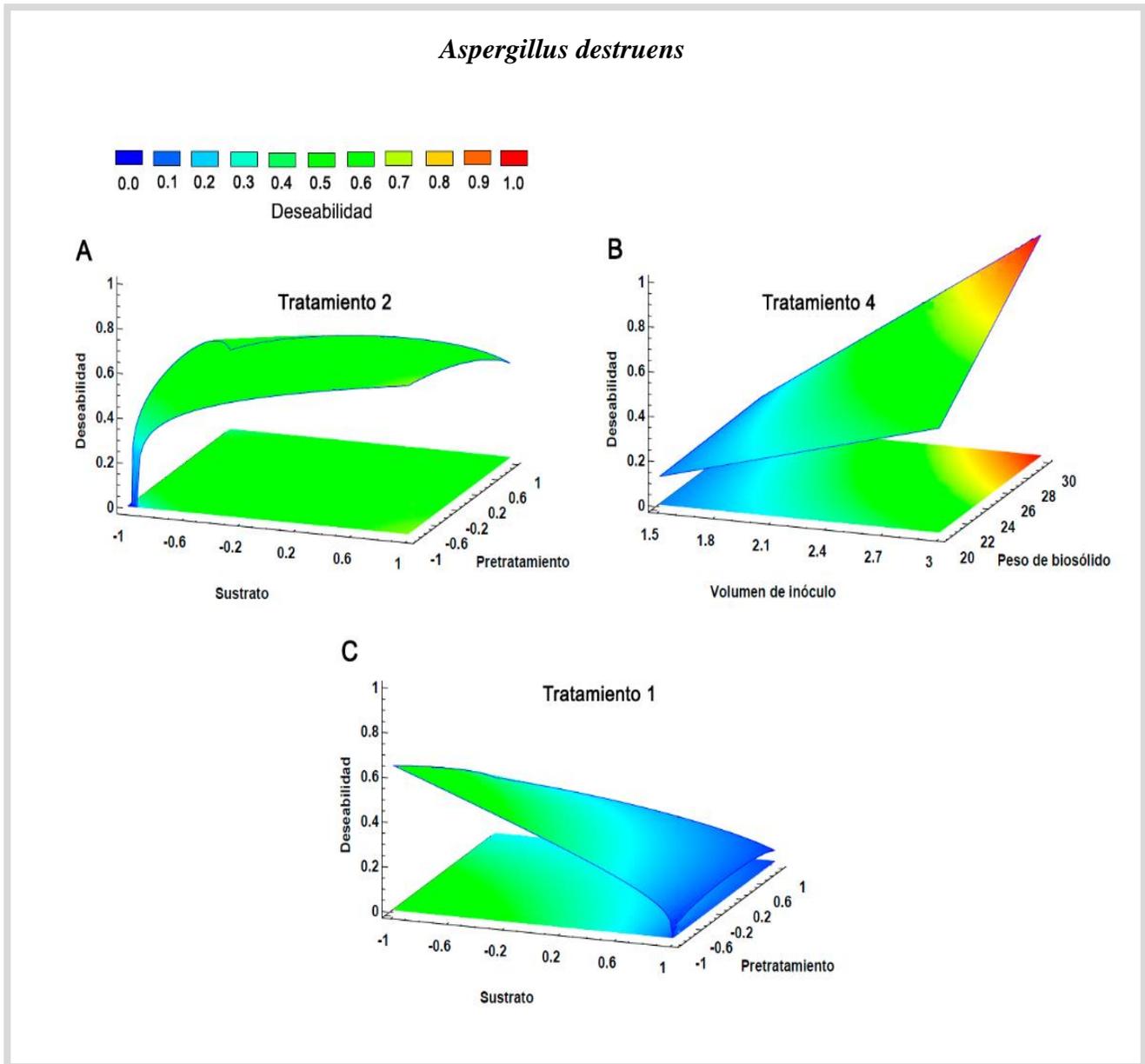


Figura 16. Gráficos de Superficie de Respuesta Estimada. A) Enzimas ligninolíticas; B) Enzimas lignocelulolíticas; C) Otras enzimas. Mejores tratamientos de *Aspergillus destruens*.

4.3.4. Reducción de demanda química de oxígeno (DQO) en biosólidos municipales

Ciertos hongos tienen la capacidad de descomponer o transformar los materiales orgánicos presentes en biosólidos. La biomasa fúngica se puede utilizar para la reducción y/o eliminación de carbono y fuentes de nutrientes, componentes de estos residuos orgánicos

(More *et al.*, 2010). Con el propósito de demostrar que las cepas en estudio *Aspergillus sydowii* – like y *Aspergillus destruens* son capaces de reducir la carga contaminante en biosólidos municipales se procedió a realizar un experimento con los mejores tratamientos que resultaron de la producción de enzimas entre 0 y 21 días de fermentación (Figura 17). Nótese que los mayores porcentajes de reducción de carga contaminante presentados por los tratamientos T2 (*A. sydowii* – like) y T1 (*A. destruens*) son similares, aunque existen diferencias significativas entre los resultados alcanzados, obteniéndose valores levemente superiores con la cepa *A. sydowii* – like. Los % de remoción alcanzados se encontraron entre 26.72 y 39.74%, máximo valor obtenido correspondiente a T2, biosólido suplementado con paja de trigo y tratado con *Aspergillus sydowii* - like.

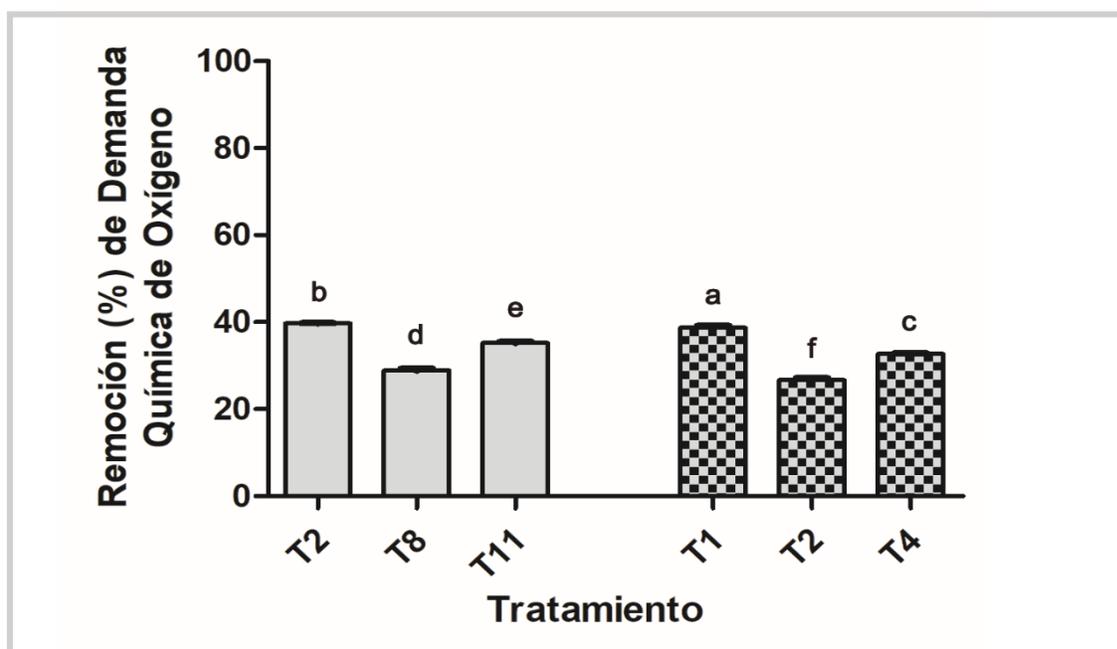


Figura 17. Remoción de demanda química de oxígeno en tratamientos de biosólidos con *Aspergillus sydowii* – like y *Aspergillus destruens* entre 0 y 21 días de fermentación.

Alam y colaboradores en el año 2003 realizaron un estudio para la degradación de lodos empleando un cultivo fúngico mixto de *Aspergillus niger* y *Penicillium corylophilum*, el porcentaje de remoción de DQO fue 92% después de días de tratamiento. Esta reducción se obtuvo a un pH inicial de 4.5-5.5, mientras que los valores mínimos de remoción de DQO se registraron a pH 8, este comportamiento podría deberse a que el crecimiento de hongos

conduce a la excreción de metabolitos ácidos, lo que podría suprimir el crecimiento en pH alcalino de los lodos, por ende, podría ser la causa de un crecimiento desfavorable y una disminución de la función metabólica de las cepas fúngicas (Alam *et al.*, 2003b). Mannan *et al.*, (2005) realizaron un estudio con las cepas mencionadas anteriormente empleando lodos como sustrato. La cepa *Penicillium corylophilu* mostró un porcentaje de remoción de DQO de 94.4% mientras que con *Aspergillus niger* se alcanzó un 80.4% después de dos días de tratamiento fúngico. Por su parte, Fakhru'l-Razi & Molla en el año 2007 informaron que con una concentración de 3.03-106 esporas/mL de *Mucor hiemalis* después de 6 días de fermentación se eliminó el 87% de la DQO con un 98% de reducción de sólidos suspendidos.

También se han empleado otras cepas para disminuir la carga orgánica en aguas residuales. Singh (2006) informó una reducción del 90% de la DQO por parte de *Trametes versicolor* en residuos de plantas digeridas anaeróbicamente, mientras Zhang y colaboradores en 2008, informaron una reducción de DQO en el orden de 86 a 91% para *Trichoderma viride*. En una investigación realizada por Hultberg & H. Bodin (2017) la cepa *Trichoderma harzianum* mostró capacidad para proporcionar reducciones de DQO de 79 a 89% en pequeños sistemas de tratamiento de aguas residuales, específicamente los de las cerveceras, objeto de estudio de este artículo. Aunque todos los valores de remoción de DQO expuestos anteriormente son superiores a los alcanzados en esta investigación, es necesario aclarar que los estudios mencionados se realizaron en reactores, escala superior a la abordada en este proyecto; no obstante los resultados obtenidos sugieren que tanto *Aspergillus sydowii* – like como *Aspergillus destruens* son especies interesantes para el tratamiento de biosólidos municipales debido a sus capacidades para remover la carga orgánica presentes en estos lodos.

4.4. Remoción de fenoles en biosólidos municipales

La estructura de los fenoles, es similar a la de la lignina, a pesar de la estructura compleja que presentan, existen hongos capaces de degradar tales compuestos (Fountoulakis *et. al.*, 2002). Una vez demostradas las potencialidades de las cepas *Aspergillus sydowii* – like y *Aspergillus destruens* para valorizar biosólidos municipales mediante la producción de enzimas se procedió a explorar sus capacidades para la remoción de fenoles presentes en

estos residuos orgánicos. Los experimentos se realizaron con los mejores tratamientos que resultaron del análisis estadístico entre 0 y 21 días de tiempo de fermentación, excepto para el proceso fermentativo sólido con *Aspergillus destruens* que se efectuó entre 0 y 14 días (Figura 18).

Al analizar los resultados obtenidos se puede evidenciar que los mayores valores de remoción se alcanzaron en la fermentación líquida con *A. sydowii* – like, siendo T8 el mejor tratamiento con un 95.93%. Los tratamientos 2 y 11 presentaron porcentajes superiores al 67.03%, mostrándose este valor para T11, mientras que en el proceso sólido se obtuvieron resultados de 55.83 y 56.13% para T6 y T10 respectivamente. El tratamiento 4 mostró el menor valor con un 31.03% de remoción. *Aspergillus destruens* demostró resultados inferiores al 47.39%, en todos los tratamientos, correspondiendo este valor a T10 en el proceso fermentativo sólido.

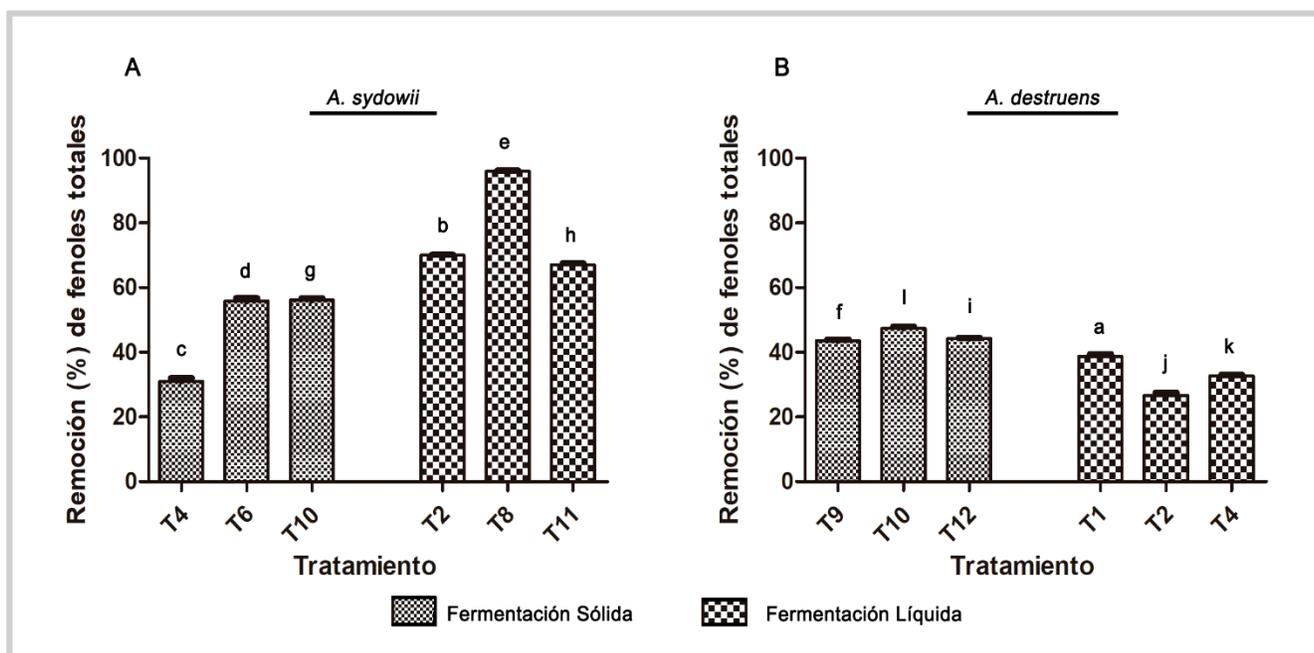


Figura 18. Remoción de fenoles totales en biosólidos municipales mediante las cepas *A. sydowii* – like (A) y *A. destruens* (B).

Solo un pequeño grupo de enzimas son capaces de escindir los anillos aromáticos de los fenoles (Fuchs *et al.*, 2011), debido a que a la energía de resonancia que estabiliza sus sistemas es la base principal de estos compuestos recalcitrantes, la cual confiere un alto potencial redox a las reacciones de transferencia de electrones (Batista *et al.*, 2017).

Se ha reportado que enzimas dioxigenasas, dihidroxigenasas, monooxigenasas, fenol hidroxilasas, serina hidrolasas y aldolasas están involucradas en la degradación bacteriana de compuestos fenólicos a través del metabolismo o el cometabolismo (Moody *et al.*, 2004; Rentz *et al.*, 2008), en el caso de la transformación xenobiótica mediada por hongos solo se han descrito dos mecanismos principales. Estos mecanismos son la ruta de la monooxigenasa del citocromo P-450 y las enzimas extracelulares del catabolismo de la lignina, como lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y lacasa (Lac) (Aranda, 2016; Cerniglia, 1997; Krastanov *et al.*, 2013; Mhuantong *et al.*, 2015).

Estas tres enzimas ligninolíticas oxidan una amplia gama de compuestos orgánicos (incluidas varias fracciones de aceite, fenoles e hidrocarburos policíclicos aromáticos) en virtud de su baja especificidad (Andriani *et al.*, 2016; Pang *et al.*, 2015; Zafra y Cortes-Espinosa, 2015). Se podría inferir, a partir de lo mencionado anteriormente, que los mayores porcentajes de remoción de fenoles corresponden a los tratamientos con mayor producción de estas enzimas. Sin embargo, solo en los tratamientos 10 y 11 de las fermentaciones sólida y líquida con la cepa *Aspergillus sydowii* – like se obtuvieron producciones apreciables. En el tratamiento 10 se produjeron 0.72 y 0.85 U/kg de lodo de lacasa y lignina peroxidasa respectivamente, mientras que en T11 se alcanzaron 0.40 U/L de lacasa y 0.71 U/L de lignina peroxidasa. Las mayores actividades Lac, LiP y MnP se obtuvieron en el proceso fermentativo líquido de *Aspergillus destruens*, específicamente en T2, no obstante, fue el tratamiento que menor porcentaje de remoción presentó, solo un 26.72%. A este respecto, algunos informes sugieren que no existe una relación clara entre las actividades de las enzimas ligninolíticas y la degradación de algunos compuestos fenólicos, como los diclorofenoles, e incluso en algunos casos (por ejemplo, especies de *Coprinopsis*), las lacasas y algunas peroxidases no están necesariamente involucradas en la biotransformación de fenoles (Singh, 2006).

Basados en los reportes existentes se puede comparar la remoción de fenoles realizadas por las cepas en estudio con las informadas hasta el momento. Se aprecia que en todos los tratamientos se obtuvieron porcentajes de remoción superiores al 26.72%, siendo estos valores mayores a los reportados por Batista y colaboradores en 2017, los cuales exploraron el potencial de seis cepas de hongos *Pseudogymnoascus* sp., *A. caesiellus*, *T. hirsuta* IBB 450, *P. chrysosporium* ATCC 787, *P. ostreatus* MTCC1804 y *Cadophora* sp con el objetivo

de remover compuestos fenólicos en aguas residuales, en dos condiciones: en ausencia de glucosa y suplementadas con 0.1 mM de glucosa. Los resultados obtenidos, en este estudio, demostraron que solo *Cadophora* sp fue capaz de remover fenoles (5% de remoción) en los tratamientos de aguas residuales en ausencia de glucosa. Sin embargo, cuando las aguas residuales se complementaron con 0.1 mM de glucosa, todos los hongos analizados, excepto *A. caesiellus*, mostraron la capacidad de eliminar los compuestos fenólicos, siendo *Pseudogymnoascus* sp el mejor de las cepas con un porcentaje de remoción de 15.5% en 12 días de cultivo. En otro estudio, Jiang y colaboradores en 2015 aislaron e identificaron una cepa halófila del género *Debaryomyces*, la cual en condiciones óptimas (pH 6.0, 200 rpm, 1% de salinidad, sin metales pesados) fue capaz de degradar el 96.7% de 500 mg/L de concentración inicial de fenoles presentes en aguas residuales en solo 24 h, resultado superior a los obtenidos en esta investigación. Es importante destacar que en la literatura no existen reportes sobre *A. sydowii* – like y *A. destruens* removiendo compuestos fenólicos en biosólidos municipales, por lo que este es el primer estudio que demuestra las potencialidades de estas cepas para la remoción de fenoles en residuos orgánicos procedentes del tratamiento de aguas residuales.

4.5. Remoción de metales pesados en biosólidos municipales

Los hongos poseen la capacidad de absorber metales en su pared celular, o por limo de polisacárido extracelular. Para corroborar el planteamiento anterior se procedió a realizar un experimento con el propósito de investigar si *Aspergillus sydowii* – like y *Aspergillus destruens* presentan el potencial para remover siete metales pesados (cromo, níquel, cobre, arsénico, plomo, cadmio y zinc), los cuales están presentes en la composición química de los tratamientos de biosólidos de interés (Figura 19).

La presencia de una alta concentración de algunos metales pesados es perjudicial para los hongos, sin embargo, estos pueden utilizarlos en bajas concentraciones como fuente de micronutrientes (Das *et al.*, 2009). Las paredes celulares de los hongos contienen un alto contenido de grupos funcionales como amino, amida, hidroxilo, carboxilo, sulfhidrilo y fosfato. La capacidad de unión de los metales en los hongos se debe a la presencia de estos

grupos funcionales, que están implicados en la unión de estos elementos químicos. (More *et al.*, 2010).

Al analizar los resultados obtenidos se pudo evidenciar que en el tratamiento 10 del proceso fermentativo sólido con la cepa *Aspergillus destruens* se alcanzaron porcentajes de remoción superiores a 95.73% en todos los metales, observándose este valor para el cobre. Los valores de remoción, en la fermentación líquida, de níquel y zinc fueron mayores en *A. sydowii* – like que en *A. destruens*, sin embargo, en la remoción de arsénico y cadmio en todos los tratamientos *Aspergillus destruens* presentó mejores resultados. Los menores porcentajes de remoción de metales se alcanzaron en T4, tratamiento correspondiente a la fermentación sólida con la cepa *A. sydowii* – like.

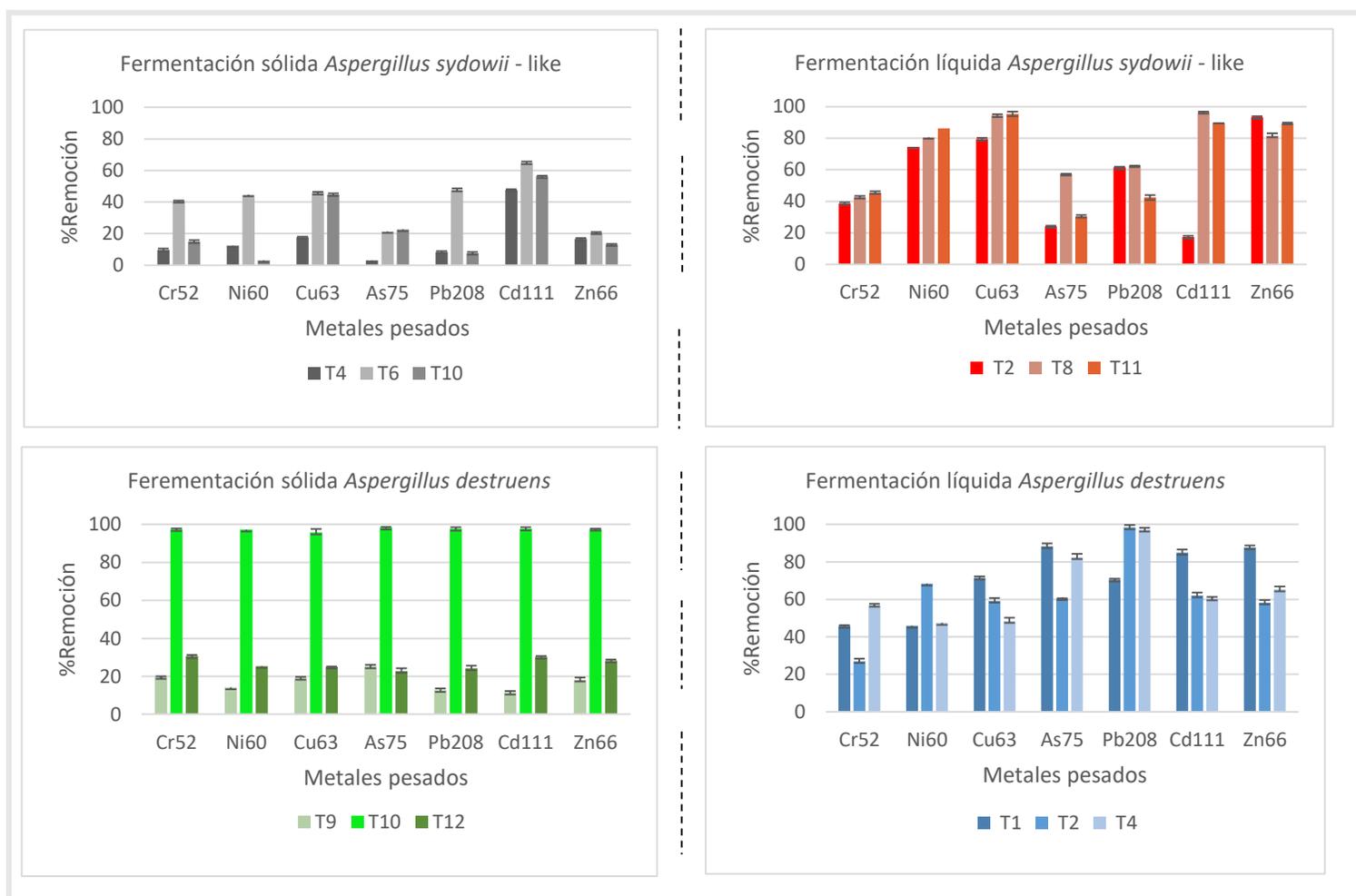


Figura 19. Remoción de metales pesados presentes en biosólidos municipales mediante las cepas *Aspergillus sydowii* – like y *Aspergillus destruens*.

Los hongos pueden facilitar la biotransformación de metales a través de reacciones químicas como la oxidación, reducción, metilación y desalquilación. Estas reacciones pueden conducir a la volatilización del metal y reducir la toxicidad del elemento químico. Los metales también pueden transferirse a otras partes del micelio fúngico y simbiontes de plantas por vesículas citoplasmáticas y vacuolas. Shafiquzzaman y colaboradores (2015) han reportado que las células vivas y muertas de los hongos son capaces de eliminar los iones de metales pesados de las soluciones acuosas. Los microorganismos fúngicos absorben los iones de los metales y ofrecen un método alternativo para eliminarlos.

En un estudio realizado en 2018 por Bano y colaboradores se obtuvieron resultados inferiores a los alcanzados en el tratamiento 10 (proceso fermentativo sólido de *Aspergillus destruens*). En esta investigación se emplearon cuatro cepas de hongos halófilos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus gracilis*, *Aspergillus penicillioides* (sp. 1) y *Aspergillus restrictus* para la remoción de cadmio, cobre, manganeso, plomo y zinc. Para el crecimiento de las cepas se suplementó el medio PDA con 10% de NaCl y la concentración de metales correspondientes y posteriormente se incubaron durante 14 días. El sobrenadante y la biomasa se obtuvieron por el método de digestión ácida. *Aspergillus flavus* mostró el mayor potencial para la eliminación de metales pesados con un porcentaje de remoción de 85%, mientras que *A. penicillioides* mostró una remoción aproximada de un 67%.

Se han reportado especies de hongos filamentosos, como *Trichoderma autoviride*, *T. harzianum*, *T. virens* y *Aspergillus niger*, las cuales han sido empleadas en la remoción de metales pesados (Shafiquzzaman *et al.*, 2015) presentes en lodos. En un estudio realizado por Pathak y colaboradores (2009) se utilizaron las cepas *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium* para la lixiviación de metales pesados a partir de estos residuos orgánicos. En este artículo se manifiesta que la lixiviación del metal se produce debido a la producción de ciertos ácidos orgánicos (ácido oxálico, ácido cítrico y ácido málico) que pueden suministrar tanto protones como aniones complejantes de metales; y que los hongos pueden sobrevivir en un ambiente ácido y llevar a cabo la oxidación del compuesto de hierro y azufre. De este modo, los sulfuros metálicos de NiS, CuS, ZnS, etc., presentes en el lodo de aguas residuales se pueden solubilizar. Por su parte, Dacera & Babel en 2008 utilizaron *Aspergillus niger* para eliminar

metales pesados de lodos contaminados y afirmaron que esta cepa fue capaz de remover el cromo, el cobre, el plomo, el níquel y el zinc (Zn) de los lodos digeridos anaeróbicamente mediante el método de extracción química, donde se utilizó el líquido crudo fermentado de *Aspergillus niger* de los residuos de piña. Además, Akhtar & Mohan informaron en, 1995, que este hongo tenía una excelente capacidad para concentrar iones de plata.

Los resultados obtenidos demuestran la capacidad que poseen *Aspergillus sydowii* – like y *Aspergillus destruens* para remover metales pesados presentes en biosólidos municipales, lo que constituye una solución viable en esta era de calentamiento global y cambio climático. La naturaleza impone más desafíos y exige estudios más profundos para explotar aún más el potencial de estos hongos en la biotecnología ambiental.

4.6. Remoción de compuestos farmacéuticos en biosólidos municipales

Los productos farmacéuticos constituyen un grupo de riesgo potencial de productos químicos multiclase de creciente preocupación, ya que son extremadamente frecuentes en todos los entornos y han comenzado a exhibir efectos negativos en la micro y macro fauna, así como en la salud humana (Olicón-Hernández *et al.*, 2017). Actualmente el creciente aumento de los estudios dedicados a los hongos indica que estos microorganismos pueden transformar muchas estructuras de compuestos farmacéuticos, incluidos los antiinflamatorios, los bloqueadores beta y los antibióticos. Esto es posible debido a diferentes mecanismos en combinación con las enzimas extracelulares e intracelulares, que tienen una amplia gama de aplicaciones biotecnológicas. Es por ello que se decidió probar la potencialidad de *Aspergillus sydowii* – like y *Aspergillus destruens* para la remoción de once compuestos farmacéuticos (acetaminofen, cafeína, ibuprofeno, naproxeno, carbamazepina, ketoprofeno, atenolol, TPP, ciprofloxacino, indometacina y fenofibrato) presentes en los tratamientos de biosólidos de interés. Al analizar los resultados obtenidos (Figura 20) se aprecia que en los procesos fermentativos líquidos de ambas cepas se obtuvo 100% de remoción de acetaminofen, mientras que para el compuesto farmacéutico carbamazepina se alcanzaron porcentajes de remoción superiores a 93.75%, observándose este valor para los tratamientos 1 y 11 respectivamente, alcanzando, en los tratamientos restantes 100% de remoción. En el

caso de los procesos sólidos los mejores tratamientos fueron T6, para *A. sydowii* – like y T9 para *A. destruens*, logrando en ambos tratamientos 100% de remoción de acetaminofen. En el tratamiento 6 se removió completamente ibuprofeno mientras que en T9 los fármacos atenolol y ketoprofeno presentaron porcentajes de remoción de 94.19 y 94.44% respectivamente.

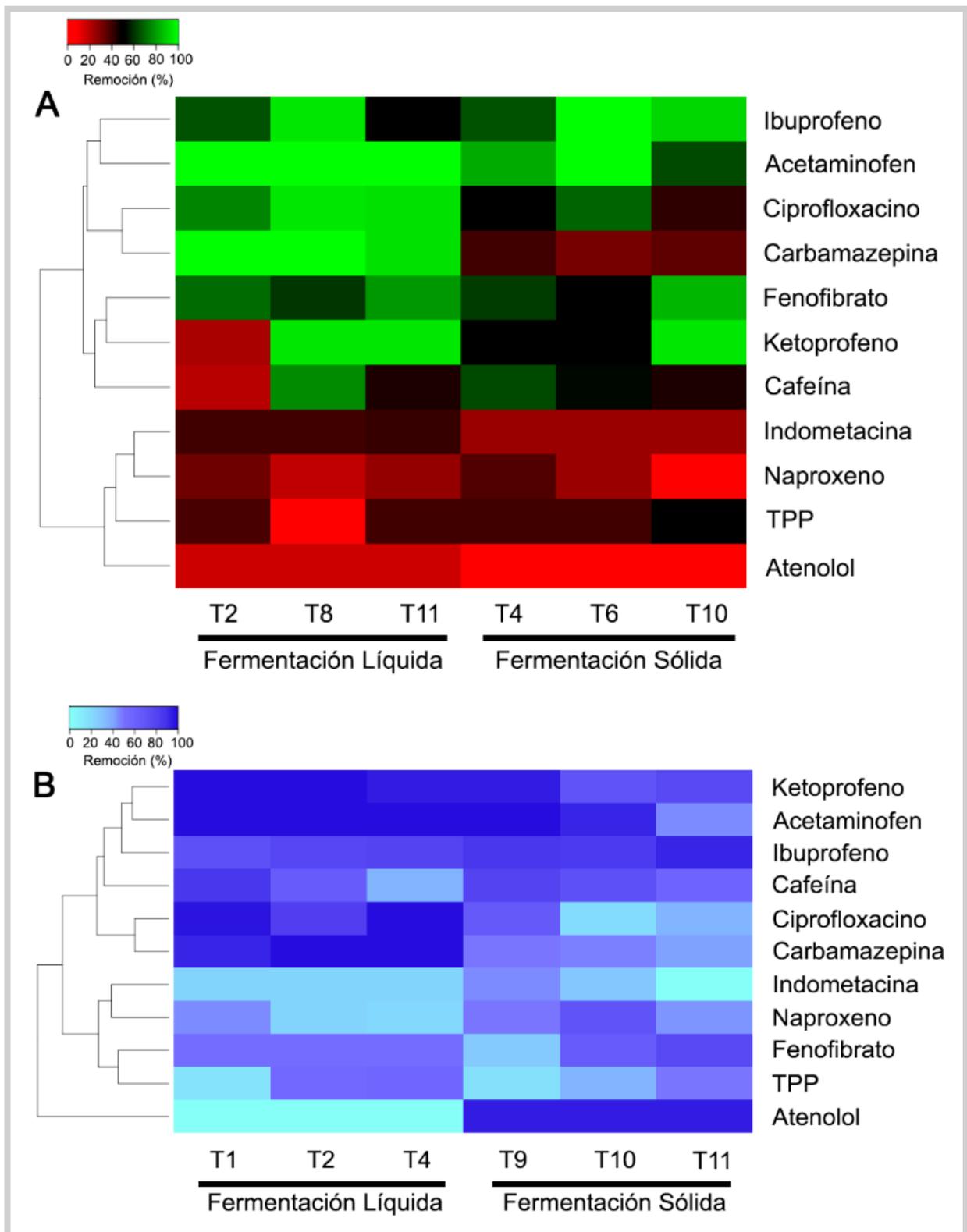


Figura 20. Remoción de compuestos farmacéuticos en biosólidos municipales mediante las cepas *A. sydowii* – like (A) y *A. destruens* (B).

Basados en los estudios existentes hasta la fecha se pueden comparar los resultados obtenidos en la remoción de compuestos farmacéuticos por las cepas en estudio con los existentes en la literatura con hongos de la división *Basidiomycota*. Rodarte-Morales y colaboradores en 2011 mencionan que *Phanerochaete chrysosporium* removió completamente a los catorce días de incubación ibuprofeno, carbamazepina y naproxeno. De igual manera Marco-Urrea y colaboradores en 2008 informaron que *Trametes versicolor*, partiendo de una concentración de 10mg/L de ibuprofeno, ácido clofíbrico y carbamazepina fue capaz de degradar, después de siete días de tratamiento fúngico, un 58% de carbamazepina y un 91% de ácido clofíbrico. En investigaciones anteriores, Carballa *et al.* (2004) reportaron degradaciones de 55 y 70% para naproxeno e ibuprofeno, respectivamente, después de un tratamiento secundario en reactores biológicos utilizando el proceso convencional de lodo activado en una planta de tratamiento de aguas residuales; mientras que Kosjek *et al.* (2007) reportaron degradaciones entre 59 y 87% en una planta piloto de tratamiento de aguas residuales. Suárez *et al.* (2009) aplicaron procesos de coagulación-floculación y flotación para el tratamiento previo de las aguas residuales de un hospital, y se logró una degradación limitada (23–46%). Gagnon *et al.* (2008) estudiaron la degradación de varios fármacos, incluidos ibuprofeno y naproxeno, utilizando diferentes procesos de desinfección, como la radiación UV, la ozonización y la inyección de una mezcla de ácido performático. Se lograron eficiencias de eliminación del 70% para estos dos compuestos cuando se utilizó una concentración óptima de ozono. Los resultados obtenidos en este proyecto se comparan favorablemente con estos hallazgos anteriores y se lograron mayores tasas de degradación, para el fármaco ibuprofeno, con la cepa *Aspergillus destruens* en el proceso fermentativo sólido.

El uso de hongos *Ascomycota* ha sido poco estudiado en la degradación de compuestos farmacéuticos. La capacidad de degradación de este grupo de hongos se ha estudiado en sustancias aromáticas como hidrocarburos policíclicos aromáticos, hidrocarburos clorados y diversos compuestos xenobióticos (Marco-Urrea *et al.*, 2015; Aranda, 2016; Bovio *et al.*, 2017). Se caracterizan por la participación del sistema enzimático intracelular mediado por el CYP, y algunas especies también pueden secretar enzimas modificadores de lignina como lacasa o manganeso peroxidasa. En este contexto, la complejidad total de la vía metabólica

de conversión no está bien establecida. Algunas enzimas apenas exploradas, como la UPO, también podrían desempeñar un papel principal en la hidroxilación extracelular. En este sentido, se estima que las UPO están ampliamente distribuidas en *Ascomycota*, las cuales realizan una amplia gama de reacciones enzimáticas en compuestos aromáticos y metabolitos de fármacos (Poraj-Kobielska *et al.*, 2011; Hofrichter *et al.*, 2015). En un estudio reciente realizado por Abradelo y colaboradores en 2019 se demostró que las cepas en estudio *Aspergillus sydowii* – like y *Aspergillus destruens* se pueden utilizar con éxito para el procesamiento de residuos recalcitrantes en condiciones de alta salinidad. En esta investigación ambos hongos eliminaron totalmente ibuprofeno y ácidos mefenámicos, mientras que la indometacina y el paracetamol fueron los fármacos más recalcitrantes en ambos micotratamientos con menores porcentajes de remoción 93 y 60% para *A. sydowii* y *A. destruens* respectivamente.

4.7. Ensayos toxicológicos

Los biosólidos dependiendo de su origen pueden estar constituidos por compuestos que generan toxicidad a las plantas, es por ello de la necesidad de evaluar el nivel de toxicidad de los biosólidos, así como la posible interferencia de estos en los índices de germinación. Los bioensayos de toxicidad con semillas de especies vegetales permiten evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos puros o mezclas complejas que pueden generar efectos perjudiciales en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento (Gariglio *et al.*, 2002).

Con el objetivo de corroborar la remoción de fenoles totales, metales pesados y compuestos farmacéuticos en los biotratamientos de biosólidos de municipales, se llevaron a cabo ensayos toxicológicos con el fin de evaluar la toxicidad de estos contaminantes en la germinación de lechuga (*Lactuca sativa*).

Al analizar el comportamiento obtenido en la germinación de semillas de lechuga a los 35 días de proceso fermentativo (Tabla 9), se evidenció que las plántulas germinadas en los sobrenadantes tratados con *A. destruens* en ambas fermentaciones mostraron mejores porcentajes de crecimiento con respecto a los controles negativos (sobrenadante sin inocular)

que los tratados con *A. sydowii*-like, obteniéndose los menores porcentajes de germinación en el proceso fermentativo líquido con la cepa *A. sydowii*-like. El mejor tratamiento fue T4 con un 115.4% de germinación con respecto al control negativo correspondiente. Este resultado nos proporciona que en este tratamiento y en T6, T2, T11, T10, T1, T10 ambas cepas fueron capaces de eliminar satisfactoriamente la toxicidad presente en estos biosólidos y que los sobrenadantes resultantes de la cinética no produjeron metabolitos más tóxicos que los contaminantes degradados. En los resultados obtenidos en las longitudes de la radícula de las plántulas, ambas cepas mostraron valores superiores a la longitud de la radícula de los controles negativos. Los mayores valores se alcanzaron con *A. sydowii* en T6, T11 y T10 no existiendo diferencias significativas entre los mismos.

Tabla 9. Valores de germinación (%) y longitud de la radícula (%) de las plántulas de lechuga en biosólidos municipales a tiempo final de fermentación (Tiempo 35) tratados con *Aspergillus sydowii* y *Aspergillus destruens*.

Fermentación	Cepa	Tratamiento	Germinación (%)	Longitud de la radícula (%)
Sólida	<i>A. sydowii</i>	T4	87.3±4.4 ^a	107.1±0.1 ^d
		T6	100.0±0.0 ^{b,c}	127.7±0.3 ^g
		T10	87.7±9.1 ^a	127.6±3.0 ^g
Líquida	<i>A. sydowii</i>	T2	106.2±4.1 ^b	101.0±0.0 ^a
		T8	96.2±5.4 ^{a,b}	114.8±0.4 ^e
		T11	100.0±0.0 ^{b,c}	127.6±3.0 ^g
Sólida	<i>A. destruens</i>	T9	96.9±3.0 ^b	106.1±0.1 ^{c,d}
		T10	104.6±0.0 ^{b,c}	115.4±0.3 ^e
		T12	97.2±3.9 ^b	104.1±0.2 ^{b,c}
Líquida	<i>A. destruens</i>	T1	101.3±4.9 ^{b,c}	102.7±0.3 ^{a,b}
		T2	106.7±0.0 ^{b,c}	101.3±0.2 ^a
		T4	115.4±0.0 ^c	118.5±1.2 ^f

Media ± DE. Diferentes letras indican diferencias significativas. Se realizó un ANOVA simple (n = 3) y se determinaron las diferencias significativas empleando una prueba de F de Fisher (p <0.05).

Estudios realizados para evaluar el crecimiento de plántulas de tomate al aplicarle biosólidos en un suelo demostraron que los indicadores relacionados con el crecimiento de las plántulas respondieron positivamente a la aplicación de biosólidos, donde se observó un evidente incremento en las magnitudes de todas las variables evaluadas, con resultados similares y

superiores a las del tratamiento con fertilizante mineral, lo que indicó que estos residuos tienen potencialidades para ser utilizados en sistemas de producción de plántulas en cultivos que necesiten de una fase de semillero antes de ser llevados al campo (Utria-Borges *et al.*, 2008). Por otra parte, Maciel-Torres *et al.* (2015) realizaron estudios de fitotoxicidad de biosólidos en semillas de rábano concluyendo que los biosólidos en estudio eran aptos para uso agrícola debido a que el índice de germinación de las plántulas fueron superiores al 80% por lo que el material no presentó fitotoxicidad de acuerdo a Emino & Watson (2004).

4.8. Análisis económico

4.8.1. Costo de producción de enzimas a escala de laboratorio

La estrategia de reducción de costos que se ha desarrollado en el presente estudio se refiere a la capacidad que presentan las cepas *Aspergillus sydowii* – like y *Aspergillus destruens* para producir cócteles enzimáticos utilizando como sustrato biosólidos municipales. Al utilizar un residuo como materia prima el costo de producción de las enzimas se abarata considerablemente (Tabla 12). En este sentido, se definieron dos términos principales: costo de equipamiento y costos operativos. En todos los casos, el costo de operación representó la mayor contribución al costo total, mientras que el costo de equipo fue significativamente menor, representando menos del 1% del costo total.

Las enzimas que presentaron un menor precio fueron celulasa, xilanasas y amilasa, en todos los procesos fermentativos con ambas cepas. En las dos primeras semanas de tratamiento fúngico se obtuvieron producciones de enzimas lignocelulolíticas mayores a 33 U/kg de lodo para el caso de la fermentación sólida, alcanzando 173.330 U/kg de lodo, valor apreciado en la enzima celulasa obtenida a partir del biosólido tratado con *Aspergillus sydowii* – like. El menor precio se obtuvo a partir de la fermentación líquida de biosólido con *Aspergillus destruens* en la enzima hidrolasa amilasa con 0.003 \$/U, debido a que se alcanzaron 2695.780 U/L en solo 7 días. Las enzimas lacasa y peroxidasas totales presentaron una actividad inferior a 1 U/kg de lodo o 1U/L en dependencia del proceso fermentativo, lo que influyó en que los precios de las mismas fueran superiores a los 18.977 \$/U. Los mayores precios

obtenidos 179.852, 451.310 y 457.807 \$/U respectivamente corresponden a los menores valores de actividad enzimática alcanzados a los 21 y 35 días de tratamiento fúngico.

La máxima producción de lignina peroxidasa se obtuvo a los 21 días con *Aspergillus destruens* (fermentación líquida) con 21.050 U/L. Este valor de actividad repercutió notablemente en la disminución del precio final de esta enzima (1.930 \$/U). Los menores precios de esterasa y aril alcohol oxidasa se obtuvieron con esta cepa 4.641 (fermentación líquida) y 29.648 \$/U (fermentación sólida) a los 10 y 21 días de fermentación respectivamente.

Tabla 12. Análisis de costos de varias enzimas producidas a partir de diferentes tratamientos de biosólidos municipales con las cepas *Aspergillus sydowii* – like y *Aspergillus destruens*.

Cepa	Fermentación	Enzimas	AE (máx) (U/kg o U/L)	Tiempo (d)	Cop (\$)	Ceq (\$)	Ctotal (\$)	Precio final (\$/U)
<i>Aspergillus sydowii</i> - like	Sólida	Xilanasa	150.370	7	6.920	0.015	6.935	0.046
		Celulasa	173.330	10	11.907	0.021	11.928	0.069
		Esterasa	0.192	21	13.524	0.045	13.568	70.670
		Lacasa	0.715	21	13.524	0.045	13.568	18.977
		Peroxidasa	0.131	21	13.524	0.045	13.568	103.578
		Lignina peroxidasa	1.558	21	13.524	0.045	13.568	8.709
	Líquida	Xilanasa	50.350	21	40.573	0.045	40.618	0.807
		Celulasa	45.530	21	40.573	0.045	40.618	0.892
		Esterasa	3.340	28	67.306	0.059	67.365	20.169
		Lacasa	0.400	10	11.907	0.021	11.929	29.821
		Peroxidasa	0.350	14	20.444	0.029	20.474	58.496
		Lignina peroxidasa	8.740	21	40.573	0.045	40.618	4.647
		Amilasa	465.010	10	11.907	0.021	11.928	0.026
Aril alcohol oxidasa	0.220	35	100.644	0.073	100.717	457.805		
<i>Aspergillus destruens</i>	Sólida	Xilanasa	50.670	14	20.444	0.029	20.474	0.404
		Celulasa	33.040	14	20.444	0.029	20.474	0.620
		Esterasa	2.190	14	20.444	0.029	20.474	9.349
		Lacasa	0.090	21	40.573	0.045	40.618	451.310

	Peroxidasa	0.670	21	40.573	0.045	40.618	60.624
	Lignina	9.040	14	20.444	0.029	20.474	2.265
	peroxidasa						
	Amilasa	311.450	14	20.444	0.029	20.4745	0.066
	Aril alcohol	1.370	21	40.573	0.045	40.618	29.648
	oxidasa						
	Lipasa	0.090	7	6.920	0.015	6.935	77.051
Líquida	Xilanasa	43.170	7	6.920	0.015	6.935	0.161
	Celulasa	31.150	7	6.920	0.015	6.935	0.223
	Esterasa	2.570	10	11.907	0.021	11.928	4.641
	Lacasa	0.370	10	11.907	0.021	11.928	32.239
	Peroxidasa	0.600	7	6.920	0.015	6.935	11.558
	Lignina	21.050	21	40.573	0.045	40.618	1.930
	peroxidasa						
	Amilasa	2695.780	7	6.920	0.015	6.935	0.003
	Aril alcohol	0.560	35	100.644	0.073	100.717	179.852
	oxidasa						

A partir de la evaluación de la micorremediación en el tratamiento eficaz de biosólidos municipales, los cuales presentan un alto contenido de contaminantes, se puede inferir que este bioprocesamiento asistido por hongos es adecuado para valorizar estos residuos a través de la producción de enzimas comerciales incluso a escala industrial (Batista *et al.*, 2017). La aplicación de operaciones de micorremediación a gran escala posibilitaría que todo el proceso fuese ecológico y económicamente valioso, ya que reduciría significativamente los gastos y los costos operativos. El presente estudio no se centra en la optimización del proceso mediante la ingeniería y la producción rentable de enzimas, no obstante, el proyecto realizado aporta conocimientos sobre el análisis económico del costo de producción de enzimas obtenidas a partir de tratamientos fúngicos de biosólidos municipales. Sería necesario realizar otro trabajo para estudiar y, en última instancia, optimizar las condiciones de crecimiento de los hongos en estudio, así como la ampliación del proceso. Por estas razones, el uso de los sistemas de micorremediación, incluso si es potencialmente ventajoso para el tratamiento de biosólidos en comparación con las estrategias que se aplican actualmente, aún requiere esfuerzos adicionales de investigación para encontrar soluciones efectivas para garantizar la aplicabilidad a escala industrial.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio nos permitieron concluir que se cumplió la hipótesis mencionada, la cual plantea que, las cepas *Aspergillus sydowii*-like y *Aspergillus destruens* presentan las potencialidades para el tratamiento de biosólidos municipales, al poseer la capacidad de remover contaminantes presentes en estos y para otorgarle valor agregado a estos residuos mediante la obtención de enzimas de interés comercial.

- *A. sydowii* y *A. destruens* ambas cepas halófilas produjeron enzimas de interés comercial utilizando como sustrato biosólidos municipales, obteniéndose producciones de 150.40 y 174.00 U/kg de lodo de xilanasas y celulasas respectivamente en la fermentación sólida con la cepa *A. sydowii* mientras que en el proceso fermentativo líquido con la cepa *A. destruens* en los biotratamientos de biosólidos se obtuvieron 2695.78 U/L de amilasas.
- Estas cepas redujeron la carga contaminante presente en biosólidos, mostrando *A. sydowii* – like porcentajes de reducción levemente superiores, obteniéndose el mejor resultado con el tratamiento 8 con un 39.34% de remoción de demanda química de oxígeno.
- Se evidenció las potencialidades de estas cepas para la remoción de compuestos fenólicos y metales pesados, obteniéndose en T8 con la cepa *A. sydowii* un 95.93% de remoción de compuestos fenólicos mientras que en T10 con la cepa *A. destruens* se alcanzó un porcentaje de remoción de 95.93 de metales pesados.
- Se demostró que ambas cepas remueven eficientemente once compuestos farmacéuticos presentes en biosólidos municipales, removiendo ambas cepas en los procesos fermentativos sólidos en T6 (*A. sydowii*) y T9 (*A. destruens*) completamente Acetaminofen.
- Las cepas *A. sydowii* y *A. destruens* en los tratamientos 4, 6, 11 y 10 fueron capaces de eliminar satisfactoriamente la toxicidad presente en los biosólidos. Los mayores valores de porcentaje de longitud de la radícula de las plántulas de lechuga se alcanzaron con *A. sydowii* en T6, T11 y T10 no existiendo diferencias significativas entre los mismos.

- El análisis económico evidenció que la producción de enzimas comerciales utilizando como sustrato biosólidos municipales representa una alternativa factible para abaratar los costos de producción.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abelleira-Pereira, J. M., Pérez-Elvira, S. I., Sánchez-Oneto, J., de la Cruz, R., Portela, J. R., and Nebot, E. (2015). Enhancement of methane production in mesophilic anaerobic digestion of secondary sewage sludge by advanced thermal hydrolysis pretreatment. *Water Res.* 71, 330–340. doi:10.1016/j.watres.2014.12.027.
- Akar, T., Arslan, S., and Akar, S. T. (2013). Utilization of *Thamnidium elegans* fungal culture in environmental cleanup: A reactive dye biosorption study. *Ecol. Eng.* 58, 363–370. doi:10.1016/j.ecoleng.2013.06.026.
- Ali, H., Khan, E., and Anwar, M. (2013). Phytoremediation of heavy metals — Concepts and applications. *Chemosphere*, 869–881. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075.
- Andrade, M. L., Marcet, P., Reyzábal, M. L., y Montero, M. J. (2000). Contenido, evolución de nutrientes y productividad en un suelo tratado con lodos residuales urbanos. *Edafología*, 7(3), 21-29.
- Anastasi, A., Spina, F., Romagnolo, A., Tigini, V., Prigione, V., and Varese, G. C. (2012). Integrated fungal biomass and activated sludge treatment for textile wastewaters bioremediation. *Bioresour. Technol.* 123, 106–111. doi:10.1016/j.biortech.2012.07.026.
- Appels, L., Baeyens, J., Degreè, J., and Dewil, R. (2008). Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Prog. Energy Combust. Sci.* 34, 755–781. doi:10.1016/j.peccs.2008.06.002.
- Aranda, E. (2016). Promising approaches towards biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons with Ascomycota fungi. *Curr. Opin. Biotechnol.* 38, 1–8. doi:10.1016/j.copbio.2015.12.002.
- Asgher, M., Kausar, S., Bhatti, H. N., Hassan Shah, S. A., and Ali, M. (2008). Optimization of medium for decolorization of Solar golden yellow R direct textile dye by *Schizophyllum commune* IBL-06. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 61, 189–193. doi:10.1016/j.ibiod.2007.07.009.

- Ayala, M., Robledo, N. R., Lopez-Munguia, A., and Vazquez-Duhalt, R. (2000). Substrate specificity and ionization potential in chloroperoxidase- catalyzed oxidation of diesel fuel. *Environ. Sci. Technol.* 34, 2804–2809. doi:10.1021/es991270o.
- Ba S., Arsenault A., Hassani T., Jones, J., Cabana, H. (2013). Laccase immobilization and insolubilization: from fundamentals to applications for the elimination of emerging contaminants in wastewater treatment *Critical Reviews in Biotechnology* 33, 4, pp :404-418.
- Badia-Fabregat, M., Lucas, D., Gros, M., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., Caminal, G., et al. (2015). Identification of some factors affecting pharmaceutical active compounds (PhACs) removal in real wastewater. Case study of fungal treatment of reverse osmosis concentrate. *J. Hazard. Mater.* 283, 663–671. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.10.007.
- Baldrian, P. (2006). Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 215–42. doi:10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x.
- Banuelos, G. S., Pasakdee, S., Benes, S. E., y Ledbetter, C. A. (2007). Long-Term Application of Biosolids on Apricot Production. *Communications in soil science and plant analysis*, 38(11-12), 1533-1549.
- Batista-García, R. A., Balcázar-López, E., Miranda-Miranda, E., Sánchez-Resí, A., Cuervo-Soto, L., Aceves-Zamudio, D., Atriztán-Hernández, K., Morales-Herrera, C., Rodríguez-Hernández, R., and Folch-Mallol, J. (2014). Characterization of Lignocellulolytic Activities from a Moderate Halophile Strain of *Aspergillus caesiellus* Isolated from a Sugarcane Bagasse Fermentation. *PLoS One* 9, e105893. doi: 10.1371/journal.pone.0105893.
- Battistuzzi, G., Bellei, M., Bortolotti, C. A., and Sola, M. (2010). Rojoox properties of heme peroxidases. *Arch. Biochem. Biophys.* 500, 21–36. doi:10.1016/j.abb.2010.03.002.
- Bautista, Cristóbal., R. (2005). Análisis del crecimiento en plántulas de maíz (*Zea mays* L.) aplicando biosolidos. México: Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”. Tesis Doctoral.
- Bergauer, P., Fonteyne, P. A., Nolard, N., Schinner, F., and Margesin, R. (2005).

- Biodegradation of phenol and phenol-related compounds by psychrophilic and cold-tolerant alpine yeasts. *Chemosphere* 59, 909–918. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.11.011.
- Betancor L., Johnson GR., Luckarift HR. (2013). Stabilized laccases as heterogeneous bioelectrocatalysts. *ChemCatChem* 5, pp: 46–60. doi:10.1002/cctc.201200611.
- Bitton, G. (2011). *Wastewater microbiology - Part A: Fundamentals of microbiology*. doi:10.1002/0471717967.ch8.
- Blackwell, M. (2011). The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *Am. J. Bot.* 98, 426–438. doi:10.3732/ajb.1000298.
- Bolzonella, D., Cavinato, C., Fatone, F., Pavan, P., and Cecchi, F. (2012). High rate mesophilic, thermophilic, and temperature phased anaerobic digestion of waste activated sludge: A pilot scale study. *Waste Manag.* 32, 1196–1201. doi:10.1016/j.wasman.2012.01.006.
- Boocock, D. G. B., Konar, S. K., Leung, A., and Ly, L. D. (1992). Fuels and chemicals from sewage sludge. 1. The solvent extraction and composition of a lipid from a raw sewage sludge. *Fuel* 71, 1283–1289. doi:10.1016/0016-2361(92)90055-S.
- Bougrier, C., Battimelli, A., Delgenes, J. P., and Carrere, H. (2007). Combined ozone pretreatment and anaerobic digestion for the Rojunction of biological sludge production in wastewater treatment. *Ozone Sci. Eng.* 29, 201–206. doi:10.1080/01919510701296754.
- Bougrier, C., Delgenès, J. P., and Carrère, H. (2008). Effects of thermal treatments on five different waste activated sludge samples solubilisation, physical properties and anaerobic digestion. *Chem. Eng. J.* 139, 236–244. doi:10.1016/j.cej.2007.07.099.
- Bourbonnais, R., Paice, M. G., Freiermuth, B., Bodie, E., and Borneman, S. (1997). Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4627–4632.
- Brar, S., Verma, M., Tyagi, R., Valéro J., Surampalli, R. 2008. *Bacillus thuringiensis* fermentation of wastewater and wastewater sludge - Presence and characterization of

- chitinases. *Environmental technology* 29, 2,161-170.
- Cabana, H., Jones, J. P., and Agathos, S. N. (2007). Elimination of endocrine disrupting chemicals using white rot fungi and their lignin modifying enzymes: A review. *Eng. Life Sci.* 7, 429–456. doi:10.1002/elsc.200700017.
- Cajthaml, T., Křesinová, Z., Svobodová, K., and Möder, M. (2009). Biodegradation of endocrine-disrupting compounds and suppression of estrogenic activity by ligninolytic fungi. *Chemosphere* 75, 745–750. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.01.034.
- Cano, R., Pérez-Elvira, S. I., and Fdz-Polanco, F. (2015). Energy feasibility study of sludge pretreatments: A review. *Appl. Energy* 149, 176–185. doi:10.1016/j.apenergy.2015.03.132.
- Cañas, A. I., and Camarero, S. (2010). Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnol. Adv.* 28, 694–705. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.05.002.
- Catherine, H., Penninckx, M., and Frédéric, D. (2016). Product formation from phenolic compounds removal by laccases: A review. *Environ. Technol. Innov.* 5, 250–266. doi:10.1016/j.eti.2016.04.001.
- Chen, M., Blanc, D., Gautier, M., Mehu, J., and Gourdon, R. (2013). Environmental and technical assessments of the potential utilization of sewage sludge ashes (SSAs) as secondary raw materials in construction. *Waste Manag.* 33, 1268–1275. doi:10.1016/j.wasman.2013.01.004.
- Chen, P., Xie, Q., Addy, M., Zhou, W., Liu, Y., Wang, Y., et al. (2016). Utilization of municipal solid and liquid wastes for bioenergy and bioproducts production. *Bioresour. Technol.* 215, 163–172. doi:10.1016/j.biortech.2016.02.094.
- Chen, T., and Yan, B. (2012). Fixation and partitioning of heavy metals in slag after incineration of sewage sludge. *Waste Manag.* 32, 957–964. doi:10.1016/j.wasman.2011.12.003.
- Christian, V., Shrivastava, R., Shukla, D., Modi, H., and Vyas, B. R. M. (2005). Mediator role of veratryl alcohol in the lignin peroxidase-catalyzed oxidative decolorization of

- Remazol brilliant blue R. *Enzyme Microb. Technol.* 36, 426–431. doi:10.1016/j.enzmictec.2004.06.007.
- Cicek, N. (2003). A review of membrane bioreactors and their potential application in the treatment of agricultural wastewater. *Canadian Biosystems Engineering*, 45, 6-37.
- Cieślak, B. M., Namieśnik, J., and Konieczka, P. (2015). Review of sewage sludge management: standards, regulations and analytical methods. *J. Clean. Prod.* 90, 1–15. doi:10.1016/j.jclepro.2014.11.031.
- Cirino, P. C., and Arnold, F. H. (2003). A self-sufficient peroxide-driven hydroxylation biocatalyst. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 42, 3299–3301. doi:10.1002/anie.200351434.
- Damiano, L., Jambeck, J. R., and Ringelberg, D. B. (2014). Municipal solid waste landfill leachate treatment and electricity production using microbial fuel cells. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 173, 472–485. doi:10.1007/s12010-014-0854-x.
- Demarche P., Junghanns C., Nair R., Agathos S. (2012). Harnessing the power of enzymes for environmental stewardship. *Biotechnology Advances* 30, 5, pp : 933-953.
- Demirel, B., Yenigun, O., and Onay, T. T. (2005). Anaerobic treatment of dairy wastewaters: A review. *Process Biochem.* 40, 2583–2595. doi:10.1016/j.procbio.2004.12.015.
- Deng, X., and Wilson, D. B. (2001). Bioaccumulation of mercury from wastewater by genetically engineered *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 276–279. doi:10.1007/s002530100620.
- Deshmukh, R., Khardenavis, A. A., and Purohit, H. J. (2016). Diverse Metabolic Capacities of Fungi for Bioremediation. *Indian J. Microbiol.* 56, 247–264. doi:10.1007/s12088-016-0584-6.
- Dhankhar, R., and Hooda, A. (2011). Fungal biosorption-an alternative to meet the challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. *Environ. Technol.* 32, 467–491. doi:10.1080/09593330.2011.572922.
- Djelal, H., and Amrane, A. (2013). Biodegradation by bioaugmentation of dairy wastewater

- by fungal consortium on a bioreactor lab-scale and on a pilot-scale. *J. Environ. Sci. (China)* 25, 1906–1912. doi:10.1016/S1001-0742(12)60239-3.
- Dos Santos, J. V., De Melo Rangel, W., Azarias Guimarães, A., Duque Jaramillo, P. M., Rufini, M., Marra, L. M., et al. (2013). Soil biological attributes in arsenic-contaminated gold mining sites after revegetation. *Ecotoxicology* 22, 1526–1537. doi:10.1007/s10646-013-1139-9.
- Eissa, F. I., Mahmoud, H. A., Massoud, O. N., Ghanem, K. M., Gomaa, I. M. (2014). Biodegradation of chlorpyrifos by microbial strains isolated from agricultural wastewater. *Journal of American Science*, 10(3), 98-108.
- Erden, G., and Filibeli, A. (2011). Ozone oxidation of biological sludge: Effects on disintegration, anaerobic biodegradability, and filterability. *Environ. Prog. Sustain. Energy* 30, 377–383. doi:10.1002/ep.10494.
- Fakhru'l-Razi, A., and Molla, A. H. (2007). Enhancement of bioseparation and dewaterability of domestic wastewater sludge by fungal treated dewatered sludge. *J. Hazard. Mater.* 147, 350–356. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.01.060.
- Fayer, R., Dubey, J. P., and Lindsay, D. S. (2004). Zoonotic protozoa: From land to sea. *Trends Parasitol.* 20, 531–536. doi:10.1016/j.pt.2004.08.008.
- Fdz-Polanco, F., Velazquez, R., Perez-Elvira, S. I., Casas, C., del Barrio, D., Cantero, F. J., et al. (2008). Continuous thermal hydrolysis and energy integration in sludge anaerobic digestion plants. *Water Sci. Technol.* 57, 1221–1226. doi:10.2166/wst.2008.072.
- Fitzmaurice, G. D., and Gray, N. F. (1989). Evaluation of manufactured inocula for use in the BOD test. *Water Res.* 23, 655–657. doi:10.1016/0043-1354(89)90032-8.
- Flores-Pardavé, L., Palacios-Vargas, J. G., Castaño-Meneses, G., Cutz-Pool, L. G. 2011. Colémbolos de suelos agrícolas en cultivos de alfalfa y de maíz adicionados con biosólidos en Aguascalientes, México. *Agrociencia*, 45(3), 353-362.
- Fomina, M., and Gadd, G. M. (2014). Biosorption: Current perspectives on concept, definition and application. *Bioresour. Technol.* 160, 3–14. doi:10.1016/j.biortech.2013.12.102.

- Forster-Carneiro, T., Pérez, M., and Romero, L. I. (2008). Thermophilic anaerobic digestion of source-sorted organic fraction of municipal solid waste. *Bioresour. Technol.* 99, 6763–6770. doi:10.1016/j.biortech.2008.01.052.
- Fu, F., and Wang, Q. (2011). Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *J. Environ. Manage.* 92, 407–418. doi:10.1016/j.jenvman.2010.11.011.
- Gadd, G. M. (2009). Biosorption: Critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84, 13–28. doi:10.1002/jctb.1999.
- García-Arellano, H., Valderrama, B., Saab-Rincón, G., and Vazquez-Duhalt, R. (2002). High temperature biocatalysis by chemically modified cytochrome c. *Bioconjug. Chem.* 13, 1336–1344. doi:10.1021/bc025561p.
- Ge, H., Jensen, P. D., and Batstone, D. J. (2011). Temperature phased anaerobic digestion increases apparent hydrolysis rate for waste activated sludge. *Water Res.* 45, 1597–1606. doi:10.1016/j.watres.2010.11.042.
- Gerba, C. P., Tamimi, a. H., Pettigrew, C., Weisbrod, a. V., and Rajagopalan, V. (2011). Sources of microbial pathogens in municipal solid waste landfills in the United States of America. *Waste Manag. Res.* 29, 781–790. doi:10.1177/0734242X10397968.
- Goel, R. K., and Noguera, D. R. (2006). Evaluation of Sludge Yield and Phosphorus Removal in a Cannibal Solids Rojunction Process. *J. Environ. Eng.* 132, 1331–1338. doi:10.1061/(asce)0733-9372(2006)132:10(1331).
- Goel, R., Tokutomi, T., Yasui, H., and Noike, T. (2003). Optimal process configuration for anaerobic digestion with ozonation. in *Water Science and Technology*, 85–96.
- Gogate, P. R., and Pandit, A. B. (2004). A review of imperative technologies for wastewater treatment I: Oxidation technologies at ambient conditions. *Adv. Environ. Res.* 8, 501–551. doi:10.1016/S1093-0191(03)00032-7.
- Göhre, V., and Paszkowski, U. (2006). Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta* 223, 1115–1122. doi:10.1007/s00425-006-0225-0.

- González, Flores, E., Sandoval, Castro, E., Pérez, Magaña, A. (2014). Biosólidos en la producción de maíz: impacto socioeconómico en zonas rurales del municipio de Puebla. *Estudios sociales* 22(43), 1-14.
- Guzmán, C., Campos, C. (2004). Indicadores de contaminación fecal en biosólidos aplicados en agricultura. *Universitas Scientiarum*, 9(1), 59-67.
- Hanif, A., Bhatti, H. N., and Hanif, M. A. (2015). Removal of zirconium from aqueous solution by *Ganoderma lucidum*: biosorption and bioremediation studies. *Desalin. Water Treat.* 53, 195–205. doi:10.1080/19443994.2013.837005.
- Hank, D., Azi, Z., Ait Hocine, S., Chaalal, O., and Hellal, A. (2014). Optimization of phenol adsorption onto bentonite by factorial design methodology. *J. Ind. Eng. Chem.* 20, 2256–2263. doi:10.1016/J.JIEC.2013.09.058.
- Harms, H., Schlosser, D., and Wick, L. Y. (2011). Untapped potential: Exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 177–192. doi:10.1038/nrmicro2519.
- Hart, L. (2011). Viticulture in Kentucky using biosolids: returning to its roots in wine production and adding a touch of sustainability. *Journal of Animal & Environmental Law* 3, 1-30.
- Hasegawa, S., Shiota, N., Katsura, K., and Akashi, A. (2000). Solubilization of organic sludge by thermophilic aerobic bacteria as a pretreatment for anaerobic digestion. *Water Sci. Technol.* 41, 163–169.
- Hattori, H., Mukai, S. (1986). Decomposition of sewage sludges in soil as affected by their organic matter composition. *Soil Science and Plant Nutrition* 32, 3, pp : 421-432.
- He, Z. L., Yang, X. E., Stoffella, P. J. (2005). Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 19(2), 125-140.
- Hébert, M. (2015). Ministère de l'Environnement, Direction du milieu rural Guide sur le recyclage des matières résiduelles fertilisantes : Critères de référence et normes réglementaires; Québec, p : 216.

- Hofrichter, M., and Ullrich, R. (2006). Heme-thiolate haloperoxidases: versatile biocatalysts with biotechnological and environmental significance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 276–288. doi:10.1007/s00253-006-0417-3.
- Hofrichter, M., Ullrich, R., Pecyna, M. J., Liers, C., and Lundell, T. (2010). New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 871–897. doi:10.1007/s00253-010-2633-0.
- Huang, H., Cao, L., Wan, Y., Zhang, R., and Wang, W. (2012). Biosorption behavior and mechanism of heavy metals by the fruiting body of jelly fungus (*Auricularia polytricha*) from aqueous solutions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 829–840. doi:10.1007/s00253-011-3846-6.
- Hyland, K. C., Dickenson, E. R. V., Drewes, J. E., and Higgins, C. P. (2012). Sorption of ionized and neutral emerging trace organic compounds onto activated sludge from different wastewater treatment configurations. *Water Res.* 46, 1958–1968. doi:10.1016/j.watres.2012.01.012.
- Ip, A. W. M., Barford, J. P., and McKay, G. (2010). A comparative study on the kinetics and mechanisms of removal of Reactive Black 5 by adsorption onto activated carbons and bone char. *Chem. Eng. J.* 157, 434–442. doi:10.1016/j.cej.2009.12.003.
- Isazadeh, S., Jauffur, S., and Frigon, D. (2016). Bacterial community assembly in activated sludge: mapping beta diversity across environmental variables. *Microbiologyopen* 5, 1050–1060. doi:10.1002/mbo3.388.
- Jadia, C. D., and Fulekar, M. H. (2009). Phytoremediation of heavy metals: Recent techniques. *African J. Biotechnol.* 8, 921–928. doi:10.4314/ajb.v8i6.59987.
- Janusz, G., Kucharzyk, K. H., Pawlik, A., Staszczak, M., and Paszczynski, A. J. (2013). Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation. *Enzyme Microb. Technol.* 52, 1–12. doi:10.1016/j.enzmictec.2012.10.003.
- Javaid, A., Bajwa, R., Shafique, U., and Anwar, J. (2011). Removal of heavy metals by adsorption on *Pleurotus ostreatus*. *Biomass and Bioenergy* 35, 1675–1682. doi:10.1016/j.biombioe.2010.12.035.

- Joo, S. H., Monaco, F. Dello, Antmann, E., and Chorath, P. (2015). Sustainable approaches for minimizing biosolids production and maximizing reuse options in sludge management: A review. *J. Environ. Manage.* 158, 133–145. doi:10.1016/j.jenvman.2015.05.014.
- Jung, C. (2011). The mystery of cytochrome P450 Compound I: A mini-review dedicated to Klaus Ruckpaul. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1814, 46–57. doi:10.1016/J.BBAPAP.2010.06.007.
- Justino, C., Marques, A. G., Duarte, K. R., Duarte, A. C., Pereira, R., Rocha-Santos, T., et al. (2010). Degradation of phenols in olive oil mill wastewater by biological, enzymatic, and photo-Fenton oxidation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 17, 650–656. doi:10.1007/s11356-009-0256-8.
- Khan, R., Bhawana, P., and Fulekar, M. H. (2013). Microbial decolorization and degradation of synthetic dyes: A review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 12, 75–97. doi:10.1007/s11157-012-9287-6.
- Khursheed, A., and Kazmi, A. A. (2011). Retrospective of ecological approaches to excess sludge Rejouction. *Water Res.* 45, 4287–4310. doi:10.1016/j.watres.2011.05.018.
- Kim, D. J., and Lee, J. (2012). Ultrasonic sludge disintegration for enhanced methane production in anaerobic digestion: Effects of sludge hydrolysis efficiency and hydraulic retention time. in *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 289–296. doi:10.1007/s00449-011-0588-x.
- KIM, J., PARK, C., KIM, T.-H., LEE, M., KIM, S., KIM, S.-W., et al. (2003). Effects of Various Pretreatments for Enhanced Anaerobic Digestion with Waste Activated Sludge. *J. Biosci. Bioeng.* 95, 271–275. doi:10.1263/jbb.95.271.
- Knop, D., Levinson, D., Makovitzki, A., Agami, A., Lerer, E., Mimran, A., et al. (2016). Limits of versatility of versatile peroxidase. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 4070–4080. doi:10.1128/AEM.00743-16 4070-4080.
- Koçberber, N., and Dönmez, G. (2007). Chromium(VI) bioaccumulation capacities of adapted mixed cultures isolated from industrial saline wastewaters. *Bioresour. Technol.*

98, 2178–2183. doi:10.1016/j.biortech.2006.08.017.

Kodam, K. M., Soojhawon, I., Lokhande, P. D., and Gawai, K. R. (2005). Microbial decolorization of reactive azo dyes under aerobic conditions. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 367–370. doi:10.1007/s11274-004-5957-z.

Kotrba, P. (2011). “Microbial Biosorption of Metals—General Introduction,” in *Microbial Biosorption of Metals*, 1–6. doi:10.1007/978-94-007-0443-5_1.

Kumar, N. S., and Min, K. (2011). Phenolic compounds biosorption onto *Schizophyllum commune* fungus: FTIR analysis, kinetics and adsorption isotherms modeling. *Chem. Eng. J.* 168, 562–571. doi:10.1016/j.cej.2011.01.023.

Leng, L., Yuan, X., Huang, H., Jiang, H., Chen, X., and Zeng, G. (2014). The migration and transformation behavior of heavy metals during the liquefaction process of sewage sludge. *Bioresour. Technol.* 167, 144–150. doi:10.1016/j.biortech.2014.05.119.

Leng, L., Yuan, X., Shao, J., Huang, H., Wang, H., Li, H., et al. (2016). Study on demetalization of sewage sludge by sequential extraction before liquefaction for the production of cleaner bio-oil and bio-char. *Bioresour. Technol.* 200, 320–327. doi:10.1016/j.biortech.2015.10.040.

Li, X., Ma, H., Wang, Q., Matsumoto, S., Maeda, T., Ogawa, H. I. (2009). Isolation, identification of sludge-lysing strain and its utilization in thermophilic aerobic digestion for waste activated sludge. *Bioresour. Technol.* 100, 9, pp : 2475-2481.

Li, X., Xing, M., Yang, J., and Dai, X. (2014). Earthworm eco-physiological characteristics and quantification of earthworm feeding in vermifiltration system for sewage sludge stabilization using stable isotopic natural abundance. *J. Hazard. Mater.* 276, 353–361. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.05.042.

Li, Y., Shi, S., Zhang, L., and Liu, Y. (2016). Global Trends and Performances of Publication on Sewage Sludge from 1991 to 2012. *Procedia Environ. Sci.* 31, 65–74. doi:10.1016/J.PROENV.2016.02.009.

Lloret, L., Eibes, G., Moreira, M. T., Feijoo, G., and Lema, J. M. (2013). Removal of estrogenic compounds from filtered secondary wastewater effluent in a continuous

- enzymatic membrane reactor. Identification of biotransformation products. *Environ. Sci. Technol.* 47, 4536–4543. doi:10.1021/es304783k.
- Longoria, A., Tinoco, R., and Vázquez-Duhalt, R. (2008). Chloroperoxidase-mediated transformation of highly halogenated monoaromatic compounds. *Chemosphere* 72, 485–490. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.03.006.
- Luo, Y., Guo, W., Ngo, H. H., Nghiem, L. D., Hai, F. I., Zhang, J., et al. (2014). A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Sci. Total Environ.* 473–474, 619–641. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.12.065.
- Maeda, T., Yoshimura, T., García-Contreras, R., Ogawa H. (2011). Purification and characterization of a serine protease secreted by *Brevibacillus* sp. KH3 for Rojouncing waste activated sludge and biofilm formation. *Bioresource technology* 102, 22, pp :10650-10656.
- Mannan, S., Fakhru'l-Razi, A., and Alam, M. Z. (2005). Use of fungi to improve bioconversion of activated sludge. *Water Res.* 39, 2935–2943. doi:10.1016/j.watres.2005.04.074.
- Manoj, K. M., and Hager, L. P. (2001). Utilization of peroxide and its relevance in oxygen insertion reactions catalyzed by chloroperoxidase. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1547, 408–417. doi:10.1016/S0167-4838(01)00210-2.
- Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Blánquez, P., Vicent, T., and Caminal, G. (2010a). Biodegradation of the analgesic naproxen by *Trametes versicolor* and identification of intermediates using HPLC-DAD-MS and NMR. *Bioresour. Technol.* 101, 2159–2166. doi:10.1016/j.biortech.2009.11.019.
- Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Cruz-Morató, C., Caminal, G., and Vicent, T. (2010b). Degradation of the drug sodium diclofenac by *Trametes versicolor* pellets and identification of some intermediates by NMR. *J. Hazard. Mater.* 176, 836–842. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.11.112.
- Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Vicent, T., and Caminal, G. (2009). Ability of white-rot

- fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. *Chemosphere* 74, 765–772. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.10.040.
- Marco-Urrea, E., Radjenović, J., Caminal, G., Petrović, M., Vicent, T., and Barceló, D. (2010c). Oxidation of atenolol, propranolol, carbamazepine and clofibrac acid by a biological Fenton-like system mediated by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Water Res.* 44, 521–532. doi:10.1016/j.watres.2009.09.049.
- Marsden, J. O., and House, C. I. (2009). *The chemistry of gold extraction. 2d ed.*
- Martinelli L., Zalar P., Gunde-Cimerman N., Azua-Bustos A., Sterflinger K., 2017. *Aspergillus atacamensis* and *A. salisburgensis*: two new halophilic species from hypersaline/arid habitats with a phialosimplex-like morphology. *Extremophiles*. 4, pp.755-773. doi: 10.1007/s00792-017-0941-3.
- Martinez-Guerra, E., and Gude, V. G. (2015). Continuous and pulse sonication effects on transesterification of used vegetable oil. *Energy Convers. Manag.* 96, 268–276. doi:10.1016/j.enconman.2015.02.073.
- Maurya, N. S., Mittal, A. K., Cornel, P., and Rother, E. (2006). Biosorption of dsí using dead macro fungi: Effect of dye structure, ionic strength and pH. *Bioresour. Technol.* 97, 512–521. doi:10.1016/j.biortech.2005.02.045.
- Maza-Márquez, P., Vilchez-Vargas, R., Kerckhof, F. M., Aranda, E., González-López, J., and Rodelas, B. (2016). Community structure, population dynamics and diversity of fungi in a full-scale membrane bioreactor (MBR) for urban wastewater treatment. *Water Res.* 105, 507–519. doi:10.1016/j.watres.2016.09.021.
- McSwain, B. S., Irvine, R. L., Hausner, M., and Wilderer, P. A. (2005). Composition and distribution of extracellular polymeric substances in aerobic flocs and granular sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1051–1057. doi:10.1128/AEM.71.2.1051-1057.2005.
- Mohapatra, D. P., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Picard, P., and Surampalli, R. Y. (2014). Analysis and advanced oxidation treatment of a persistent pharmaceutical compound in wastewater and wastewater sludge-carbamazepine. *Sci. Total Environ.* 470–471, 58–75.

doi:10.1016/j.scitotenv.2013.09.034.

Montuori, P., and Triassi, M. (2012). Polycyclic aromatic hydrocarbons loads into the Mediterranean Sea: Estimate of Sarno River inputs. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 512–520. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.01.003.

More, T. T., Yan, S., Tyagi, R. D., and Surampalli, R. Y. (2010). Potential use of filamentous fungi for wastewater sludge treatment. *Bioresour. Technol.* 101, 7691–7700. doi:10.1016/j.biortech.2010.05.033.

Muradov, N., Taha, M., Miranda, A. F., WRojoe, D., Kadali, K., Gujar, A., et al. (2015). Fungal-assisted algal flocculation: Application in wastewater treatment and biofuel production. *Biotechnol. Biofuels* 8. doi:10.1186/s13068-015-0210-6.

Nagababu, E., and Rifkind, J. M. (1998). Formation of fluorescent heme degradation products during the oxidation of hemoglobin by hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247, 592–596. doi:10.1006/bbrc.1998.8846.

Nair, R. R., Demarche, P., and Agathos, S. N. (2013). Formulation and characterization of an immobilized laccase biocatalyst and its application to eliminate organic micropollutants in wastewater. *N. Biotechnol.* 30, 815–823. doi:10.1016/j.nbt.2012.12.004.

Narayanan K., Chopade N., Raj PV., Subrahmanyam VM., Rao JV., 2013. Fungal chitinase production and its application in biowaste management. *J Sci Ind Res* 72, pp: 393–399.

Neifar M., Maktouf S., Ghorbel RE., Jaouani A., Cherif A., 2015. Extremophiles as source of novel bioactive compounds with industrial potential. In: Gupta VK, Tuohy MG, O'Donovan A, Lohani M (eds) *Biotechnology of bioactive compounds: sources and applications*. Wiley, Hoboken, pp: 245–268.

Niyyati, M., Lorenzo-Morales, J., Rezaeian, M., Martin-Navarro, C. M., Haghi, A. M., MacIver, S. K., et al. (2009). Isolation of *Balamuthia mandrillaris* from urban dust, free of known infectious involvement. *Parasitol. Res.* 106, 279–281. doi:10.1007/s00436-009-1592-9.

Odlare, M., Pell, M., Svensson, K. 2008. Changes in soil chemical and microbiological

- properties during 4 years of application of various organic residues. *Waste management*, 28(7), 1246-1253.
- Pang, C., Liu, Y. H., Cao, X. H., Li, M., Huang, G. L., Hua, R., et al. (2011). Biosorption of uranium(VI) from aqueous solution by dead fungal biomass of *Penicillium citrinum*. *Chem. Eng. J.* 170, 1–6. doi:10.1016/j.cej.2010.10.068.
- Paniagua, S., Escudero, L., Escapa, C., Coimbra, R. N., Otero, M., and Calvo, L. F. (2016). Effect of waste organic amendments on *Populus* sp biomass production and thermal characteristics. *Renew. Energy* 94, 166–174. doi:10.1016/j.renene.2016.03.019.
- Park, D., Yun, Y.-S., and Park, J. M. (2010). The past, present, and future trends of biosorption. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 15, 86–102. doi:10.1007/s12257-009-0199-4.
- Park, H. O., Oh, S., Bade, R., and Shin, W. S. (2011). Application of fungal moving-bed biofilm reactors (MBBRs) and chemical coagulation for dyeing wastewater treatment. *KSCCE J. Civ. Eng.* 15, 453–461. doi:10.1007/s12205-011-0997-z.
- Parkin, W. P. (1993). *The Complete Guide to Environmental Law*, Specialty Technical Publishers
- Pérez-Elvira, S. I., and Fdz-Polanco, F. (2012). Continuous thermal hydrolysis and anaerobic digestion of sludge. Energy integration study. *Water Sci. Technol.* 65, 1839–1846. doi:10.2166/wst.2012.863.
- Pramila, S., and Bhawana, P. (2012). E-Waste-A Challenge for Tomorrow. *Res. J. Recent Sci.* *Res.J.Recent Sci* 1, 86–93. Available at: <http://www.ewasteindia.net/contents/article/14-ISCA-RJRS-2012-041-Done.pdf>.
- Rangabhashiyam, S., Suganya, E., Selvaraju, N., and Varghese, L. A. (2014). Significance of exploiting non-living biomaterials for the biosorption of wastewater pollutants. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 1669–1689. doi:10.1007/s11274-014-1599-y.
- Robledo, E. (2012). Manejo y uso de biosólidos en suelos agrícolas. Montecillo, México: Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas.
- Rodarte-Morales, A. I., Feijoo, G., Moreira, M. T., and Lema, J. M. (2012). Operation of

stirRojo tank reactors (STRs) and fixed-bed reactors (FBRs) with free and immobilized *Phanerochaete chrysosporium* for the continuous removal of pharmaceutical compounds. *Biochem. Eng. J.* 66, 38–45. doi:10.1016/j.bej.2012.04.011.

Rodríguez-Rodríguez, C., Barón, E., Gago-Ferrero, P., Jelić, A., Llorca M., Farré, M., Díaz-Cruz, M., Eljarrat, E., Petrović, M., Caminal, G., Barceló, D., Vicent, T. (2012). Removal of pharmaceuticals, polybrominated flame retardants and UV-filters from sludge by the fungus *Trametes versicolor* in bioslurry reactor. *Journal of hazardous materials* pp : 233-234, 235-243.

Rodríguez-Rodríguez, C. E., Jelić, A., Pereira, M. A., Sousa, D. Z., Petrović, M., Alves, M. M., et al. (2012). Bioaugmentation of sewage sludge with *Trametes versicolor* in solid-phase biopiles produces degradation of pharmaceuticals and affects microbial communities. *Environ. Sci. Technol.* 46, 12012–12020. doi:10.1021/es301788n.

Rodríguez-Rodríguez, C. E., Lucas, D., Barón, E., Gago-Ferrero, P., Molins-Delgado, D., Rodríguez-Mozaz, S., et al. (2014). Re-inoculation strategies enhance the degradation of emerging pollutants in fungal bioaugmentation of sewage sludge. *Bioresour. Technol.* 168, 180–189. doi:10.1016/j.biortech.2014.01.124.

Rodríguez-Rodríguez, C. E., Marco-Urrea, E., and Caminal, G. (2010). Degradation of naproxen and carbamazepine in spiked sludge by slurry and solid-phase *Trametes versicolor* systems. *Bioresour. Technol.* 101, 2259–2266. doi:10.1016/j.biortech.2009.11.089.

Romero, M.C., Cazau M.C., Giorgieri, S., Arambarri, A.M. 1998. Phenanthrene degradation by microorganisms isolated from a contaminated stream, *Environ. Pollut.* 101, pp. 355–359.

Sabah, E., and Erkan, Z. E. (2006). Interaction mechanism of flocculants with coal waste slurry. *Fuel* 85, 350–359. doi:10.1016/j.fuel.2005.06.005.

Saha, M., Eskicioglu, C., and Marin, J. (2011). Microwave, ultrasonic and chemo-mechanical pretreatments for enhancing methane potential of pulp mill wastewater treatment sludge. *Bioresour. Technol.* 102, 7815–7826. doi:10.1016/j.biortech.2011.06.053.

- Salsabil, M. R., Laurent, J., Casellas, M., and Dagot, C. (2010). Techno-economic evaluation of thermal treatment, ozonation and sonication for the Rojouction of wastewater biomass volume before aerobic or anaerobic digestion. *J. Hazard. Mater.* 174, 323–333. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.09.054.
- Santos, V. L., and Linardi, V. R. (2004). Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents - Identification and degradation potential. *Process Biochem.* 39, 1001–1006. doi:10.1016/S0032-9592(03)00201-2.
- Senthilkumar, S., Perumalsamy, M., and Janardhana Prabhu, H. (2014). Decolourization potential of white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* on synthetic dye bath effluent containing Amido black 10B. *J. Saudi Chem. Soc.* 18, 845–853. doi:10.1016/j.jscs.2011.10.010.
- SERMANAT. 2015.
- Shammas, N. K., and Wang, L. K. (2007). “Land Application of Biosolids,” in *Biosolids Treatment Processes*, 705–745. doi:10.1007/978-1-59259-996-7_23.
- Shen, D., Fan, J., Zhou, W., Gao, B., Yue, Q., and Kang, Q. (2009). Adsorption kinetics and isotherm of anionic dsí onto organo-bentonite from single and multisolute systems. *J. Hazard. Mater.* 172, 99–107. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.06.139.
- Sheng, G. P., Yu, H. Q., and Li, X. Y. (2010). Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. *Biotechnol. Adv.* 28, 882–894. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.08.001.
- Shier, W.; Purwono, S., Extraction of single-cell protein from activated sewage sludge: thermal solubilization of protein. *Bioresource technology* 1994, 49, (2), 157-162.
- Si, J., Yuan, T. Q., and Cui, B. K. (2015). Exploring strategies for adsorption of azo dye Congo Rojo using free and immobilized biomasses of *Trametes pubescens*. *Ann. Microbiol.* 65, 411–421. doi:10.1007/s13213-014-0874-3.
- Sievers, M., Ried, A., and Koll, R. (2004). Sludge treatment by ozonation--evaluation of full-scale results. *Water Sci. Technol.* 49, 247–253.

- Silvestre, G., Ruiz, B., Fiter, M., Ferrer, C., Berlanga, J. G., Alonso, S., et al. (2015). Ozonation as a pre-treatment for anaerobic digestion of waste-activated sludge: Effect of the ozone doses. *Ozone Sci. Eng.* 37, 316–322. doi:10.1080/01919512.2014.985817.
- Sinha A., Sinha R., Khare SK., 2014. Heavy metal bioremediation and nanoparticle synthesis by metallophiles. In: Parmar N, Singh A (eds) Geomicrobiology and biogeochemistry, soil biology. Springer, Berlin, pp: 101–118
- Singh P., Raghukumar C., Parvatkar RR., Mascarenhas-Pereira MBL., 2013. Heavy metal tolerance in the psychrotolerant *Cryptococcus* sp. isolated from deep-sea sediments of the Central Indian Basin. *Yeast* 30, pp: 93–101. doi:10.1002/yea.2943
- Song, B., and Chen, X. (2009). Effect of *Aeolosoma hemprichi* on excess activated sludge Rojouction. *J. Hazard. Mater.* 162, 300–304. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.05.035.
- Srivastava, S., Shrivastava, M., Suprasanna, P., and D’Souza, S. F. (2011). Phytofiltration of arsenic from simulated contaminated water using *Hydrilla verticillata* in field conditions. *Ecol. Eng.* 37, 1937–1941. doi:10.1016/j.ecoleng.2011.06.012.
- Stuart, M., Lapworth, D., Crane, E., and Hart, A. (2012). Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *Sci. Total Environ.* 416, 1–21. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.11.072.
- Subramanian, S. B., Yan, S., Tyagi, R. D., and Surampalli, R. Y. (2008). A new, pellet-forming fungal strain: its isolation, molecular identification, and performance for simultaneous sludge-solids Rojouction, flocculation, and dewatering. *Water Environ. Res.* 80, 840–852. doi:10.2175/106143008X304703.
- Subramanian, S. B., Yan, S., Tyagi, R. D., and Surampalli, R. Y. (2010). SSPRSD Using a Filamentous Fungal Strain *Penicillium expansum* BS30 Isolated from Wastewater Sludge. *J. Environ. Eng.*, 719–730. doi:10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0000217.
- Suthar, S. (2010). Pilot-scale vermireactors for sewage sludge stabilization and metal remediation process: Comparison with small-scale vermireactors. *Ecol. Eng.* 36, 703–712. doi:10.1016/j.ecoleng.2009.12.016.
- Tam, N.F.Y., Guo, C.L., Yau, W.Y., Wong, Y.S. 2002. Preliminary study on biodegradation

- of phenanthrene by bacteria isolated from mangrove sediments in Hong-Kong, Mar. Poll. Bull. 42, 316–324.
- Taskin, M., and Erdal, S. (2010). Reactive dye bioaccumulation by fungus *Aspergillus niger* isolated from the effluent of sugar fabric-contaminated soil. *Toxicol. Ind. Health* 26, 239–247. doi:10.1177/0748233710364967.
- Timofeevski, S. L., Reading, N. S., and Aust, S. D. (1998). Mechanisms for protection against inactivation of manganese peroxidase by hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 356, 287–295. doi:10.1006/abbi.1998.0776.
- Trzesicka-Mlynarz, D., Ward, O.P. (1995). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a mixed culture and its component pure cultures, obtained from PAH-contaminated soil, *Can. J. Microbiol.* 41, 470–476.
- Trzcinski, A. P., Tian, X., Wang, C., Lin, L. L., and Ng, W. J. (2015). Combined ultrasonication and thermal pre-treatment of sewage sludge for increasing methane production. *J. Environ. Sci. Heal. - Part A Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng.* 50, 213–223. doi:10.1080/10934529.2014.975561.
- Uribe, M. H. R., Orozco, H. G., Chávez, S. N. y Espino, V. N. (2002). Factibilidad Económica del Uso de Biosólidos en el Cultivo de Maíz Forrajero. En: Memorias del XXVIII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental.
- U.S. Environmental Protection Agency (1994), “A Plain English Guide to the EPA Part 503 Biosolids Rule,” EPA/832/R-93/003.
- U.S. Environmental Protection Agency (1995), “Part 503 Implementation Guidance,” EPA/833/R-95/001.
- U.S. Environmental Protection Agency (1995), “Process Design Manual: Surface Disposal of Sewage Sludge and Domestic Septage,” EPA/625/R-95/002.
- Utria-Borges, E., Cabrera-Rodríguez, J. A., Reynaldo-Escobar, I. M., Morales-Guevara, D., Fernández, A. M., Toledo, E. (2008). Utilización agraria de los biosólidos y su influencia

- en el crecimiento de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 14(1), 33-39.
- Valo, A., Carrère, H., and Delgenès, J. P. (2004). Thermal, chemical and thermo-chemical pre-treatment of waste activated sludge for anaerobic digestion. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 79, 1197–1203. doi:10.1002/jctb.1106.
- Van Deurzen, M. P. J., Seelbach, K., Van Rantwijk, F., Kragl, U., and Sheldon, R. A. (1997). Chloroperoxidase: Use of a hydrogen peroxide-stat for controlling reactions and improving enzyme performance. *Biocatal. Biotransformation* 15, 1–16. doi:10.3109/10242429709003606.
- Vazquez-Duhalt, R., Fedorak, P. M., and Westlake, D. W. S. (1993). *Chemical modification of the protein molecules improve their activity in organic solvents*. doi:10.1016/B978-0-444-89372-7.50067-1.
- Vazquez-Duhalt, R., Westlake, D. W., and Fedorak, P. M. (1994). Lignin peroxidase oxidation of aromatic compounds in systems containing organic solvents. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 459–466.
- Verlicchi, P., Al Aukidy, M., and Zambello, E. (2012). Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment-A review. *Sci. Total Environ.* 429, 123–155. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.04.028.
- Vijayaraghavan, K., and Yun, Y. S. (2008). Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnol. Adv.* 26, 266–291. doi:10.1016/j.biotechadv.2008.02.002.
- Villegas, J. A., Mauk, A. G., and Vazquez-Duhalt, R. (2000). A cytochrome c variant resistant to heme degradation by hydrogen peroxide. *Chem. Biol.* doi:10.1016/S1074-5521(00)00098-3.
- Volpe, R. L., and W. E. Kelley (1985). *Seepage and Leakage from Dams and Impoundments*, New York, American Society of Civil Engineers
- Wang, H., Brown, S. L., Magesan, G. N., Slade, A. H., Quintern, M., Clinton, P. W., et al. (2008). Technological options for the management of biosolids. *Environ. Sci. Pollut.*

Res. 15, 308–317. doi:10.1007/s11356-008-0012-5.

- Wang, M. X., Zhang, Q. L., and Yao, S. J. (2015a). A novel biosorbent formed of marine-derived *Penicillium janthinellum* mycelial pellets for removing dsí from dye-containing wastewater. *Chem. Eng. J.* 259, 837–844. doi:10.1016/j.cej.2014.08.003.
- Wang, Q., Wei, W., Gong, Y., Yu, Q., Li, Q., Sun, J., et al. (2017). Technologies for Rojouncing sludge production in wastewater treatment plants: State of the art. *Sci. Total Environ.* 587–588, 510–521. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.02.203.
- Wang, Q., Ye, L., Jiang, G., Jensen, P. D., Batstone, D. J., and Yuan, Z. (2013). Free nitrous acid (FNA)-based pretreatment enhances methane production from waste activated sludge. *Environ. Sci. Technol.* 47, 11897–11904. doi:10.1021/es402933b.
- Wang, Z., Zheng, G., and Zhou, L. (2015b). Degradation of slime extracellular polymeric substances and inhibited sludge flocs destruction contribute to sludge dewaterability enhancement during fungal treatment of sludge using filamentous fungus *Mucor* sp. GY-1. *Bioresour. Technol.* 192, 514–521. doi:10.1016/j.biortech.2015.06.019.
- Wells, A., Teria, M., and Eve, T. (2006). Green oxidations with laccase-mediator systems. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 304–308. doi:10.1042/BST20060304.
- Wu, K., Shi, H., and Guo, X. (2011). Utilization of municipal solid waste incineration fly ash for sulfoaluminate cement clinker production. *Waste Manag.* 31, 2001–2008. doi:10.1016/j.wasman.2011.04.022.
- Yuan, X., Huang, H., Zeng, G., Li, H., Wang, J., Zhou, C., et al. (2011). Total concentrations and chemical speciation of heavy metals in liquefaction residues of sewage sludge. *Bioresour. Technol.* 102, 4104–4110. doi:10.1016/j.biortech.2010.12.055.
- Zamora, F., Salcedo, E., Aguayo, A. (1999). “Efecto de la aplicación de lodos residuales como abono orgánico en el cultivo de maíz”. En: VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería. Huatulco, Oaxaca, México.
- Zawieja, I., and Wolny, L. (2013). Ultrasonic Disintegration of Sewage Sludge to Increase Biogas Generation. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 27, 491–497.

Zhang, D., Chen, Y., Zhao, Y., and Zhu, X. (2010). New sludge pretreatment method to improve methane production in waste activated sludge digestion. *Environ. Sci. Technol.* 44, 4802–4808. doi:10.1021/es1000209.

Zhou, J., Zheng, G., Zhang, X., and Zhou, L. (2014). Influences of extracellular polymeric substances on the dewaterability of sewage sludge during bioleaching. *PLoS One* 9. doi:10.1371/journal.pone.0102688.

ONU., 2015. Informe de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos en el Mundo. UNESCO.

Patentes

Fleury, S. (2007). Method for Treatment of Sewage Plant Sludge by a Fungal Process. United States Patent, US007270751B2

Uresh, M. M., Samantha, S. O., Jessica Badger, Lipson, D., Guidi, S., Newman D. (2012). Bioreactors comprising fungal strains. United States Patent, US 2012/0034344 A1

Alam, M.Z., Karim, M.I., Muyibi, A.S., Salleh, H.M., Kabbani, N.A. (2012). Method of producing cellulase. United State Patent, US2012/0178144 A1.

Liu Yuhuan, Zhou Wen-wide, Li Yun, Lin Xiangyang, Cheng Yanling, Ruan Rong. (2011). Microalgae immobilization wastewater treatment method of fungal mediated. Europa Patents, CN 102442726 A.

Jie, W., Ye, W. (2011). Expansion for wastewater treatment microorganisms and wastewater treatmentmicroorganisms. Chinese Patents, CN 102268394 A.

He Xiaoling, Zhang Hao, Wang Ning, Xu Lei, Ge Lili, Wei Dongsheng. (2013). A method of white rot fungi and brown rot fungi sewage mixed culture dyeing dye and degradation of DQO Rojouction. Chinese Patents, CN 103663724 A

Hongsheng, W. (2016). White rot fungi decomposing agent and white-rot fungus production method of organic pollutants decomposing agent. Chinese Patents, CN 101811781.

Yunfeng, Z. (2012). Ecological bacteria bed sewage treatment process. Chinese Patents, CN 102701464B

Chunli, Wan, Jieni Li; Duzhong Li; Ginlan Zhang; Xiang Liu; Li Wang. (2014). Method for culturing aerobiotic filamentous fungi granule sludge. Chinese Patents, CN103787493 (A)

Li, Q. (2007). White-rot fungi bioreactor for immobilization processing industrial sewagecontaining phenol chloride. Chinese Patents, CN 2918405.

ANEXOS

Anexo 1. Soluciones empleadas

ABTS 30mM

Para obtener una solución al 30 mM, adiciono 164.6 mg de ABTS en 10 mL de agua destilada. Tapar el tubo con papel de aluminio (es fotosensible).

Veranyl alcohol

Se mezclaron 2.6 μ L de líquido puro de veranyl en 10mL de agua destilada.

BCA

Se mezclaron 2.2 mL del reactivo A para proteínas y 42 μ L de CuSO₄ al 4%.

DNS

En 141.6 mL de agua destilada se adicionaron: 10.6 g de NaCl, 19.8 g de NaOH, 30.6 g de tartrato de sodio y 0.83 g de malato sodio.

Carbonato de sodio 0.5 N (Na₂CO₃):

En 120 mL de agua destilada se adicionaron 3200 mg de carbonato de sodio

Paranitrofenilpalmitato (PNPP)

Se adicionaron 2 mg de palmitato, 1 mL de acetonitrilo en 9 mL de agua destilada.

Almidón, Xilano y Celulosa

Se disolvieron 0.4g de almidón, xilano y carboximetilcelulosa respectivamente en 20 mL de Buffer citrato (pH 5).

Peróxido de hidrógeno 0.005%

Tomar 170 μ L de peróxido de hidrógeno al 30% y agregar en 10 mL de agua destilada.

Anexo 2. Preparación de buffers empleados

Buffer acetato pH 4, pH 5.5

Pesar 16.40 g de acetato de sodio en 1000 mL de agua destilada, añadir 11.44 mL de ácido acético en 1000 ml de agua destilada. Posteriormente agregar en vaso precipitado 50 ml de los 1000 ml de ácido acético preparado anteriormente, adicionar 8.5 ml de los 1000 ml de acetato de sodio para obtener 100 ml de mezcla final.

En el caso del Buffer acetato pH 5.5 se añade en vaso precipitado 10 ml de los 1000 ml de ácido acético preparado anteriormente, adicionar 55 ml de los 1000 ml de acetato de sodio para obtener 100 ml de mezcla final.

En ambos casos se ajusta el pH para obtener el deseado.

Buffer fosfato pH 6, pH 8

Se pesan 27.598 g de fosfato monobásico de sodio en 1000 mL de agua destilada y 53.614 g de fosfato dibásico de sodio en 1000 ml de agua destilada. Posteriormente agregar en vaso precipitado 80 ml de los 1000 ml de fosfato monobásico de sodio preparado anteriormente, adicionar 5.0 ml de los 1000 ml de fosfato dibásico de sodio para obtener 100 ml de mezcla final.

En el caso del Buffer fosfato pH 8 se añade en vaso precipitado 10 ml de los 1000 ml de fosfato monobásico preparado anteriormente, adicionar 63 ml de los 1000 ml de fosfato dibásico de sodio para obtener 100 ml de mezcla final.

En ambos casos se ajusta el pH para obtener el deseado.

Buffer citrato de sodio pH 5

Pesar 1.47 g de Citrato de sodio en 100 mL de agua destilada, pesar 0.96 g de Ácido cítrico para de agua destilada. Posteriormente agregar en baso precipitado 60 ml de los 100 ml del citrato de sodio preparado anteriormente, adicionar 40 ml de los 100 ml de ácido cítrico para obtener 100 ml de mezcla final. Se ajusta el pH a 5.

Buffer tartrato pH 3

Se pesan 4.60 g de dihidrato de tartrato de sodio en 200 mL de agua destilada y se adicionan 1.68 mL de ácido tartárico en 200 ml de agua destilada. Posteriormente agregar en vaso precipitado 35 ml de los 200 ml de ácido tartárico preparado anteriormente, adicionar 44.1 ml de los 200 ml de dihidrato de tartrato de sodio para obtener 100 ml de mezcla final. Se ajusta el pH a 3.

Anexo 3. Preparación de sustrato de sustrato de Esterasas

Mezclar 10 mL de PBS al 1X Tritón (0.1 %) más 50 µL de 2-Naftil acetato y 10 µL de Fast Garnet.

- PBS al 1X Tritón: 10 mL de PBS 10X y 100 µL de Tritón en 90 Tritón.
- 2-Naftil acetato: Adiciono 5 mg de 2-Naftil en 500 µL de acetato.
- Fast Garnet: Adicionar 10 mg de Fast Garnet en 100 µL de PBS al 1X – Tritón (0.1 %) (lo obtengo al 1X calculando con el PBS 10 X preparado en 1 L)
- Buffer fosfato (PBS al 10 X) a pH 7: En 1L de agua destilada adicionar: 80g de NaCl, 2 g de KCl y 14.4 g de Na₂HPO₄. Adiciono al final 0.1% de Tritón.

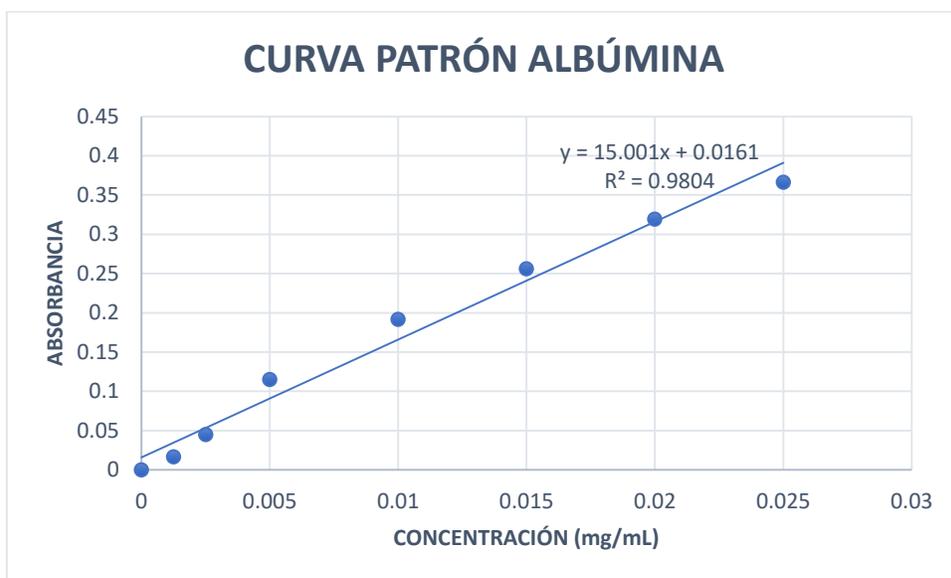
Anexo 4. Curva patrón para la cuantificación de proteínas

Concentraciones para realizar la curva patrón de albúmina

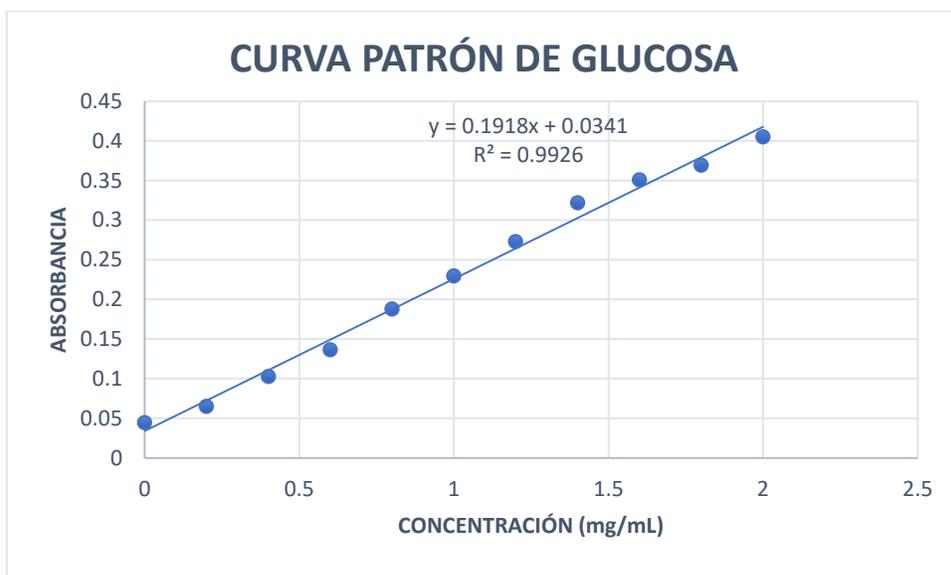
Tubo	Volumen estándar (µL)	Fuente	Volumen del diluyente (H ₂ O)	(µg/ml)
1	10	Stock	790	25
2	10	Stock	990	20
3	6	Stock	764	15
4	500	Tubo 2	500	10
5	500	Tubo 4	500	5
6	500	Tubo 5	500	2.5
7	500	Tubo 6	500	1.25
8	----	----	500	0

Para obtener la curva estándar se toman 150 μL de las condiciones que se muestran en la tabla 1.2 y 150 μL del reactivo de Bradford con dilución 1:4.

Para la cuantificación de proteínas totales a partir de nuestras muestras, se colocaron 150 μL del concentrado de proteína colectada y 150 μL del reactivo de Bradford diluido con dilución 1:4. Posteriormente la reacción se midió en el espectrofotómetro a 595nm.



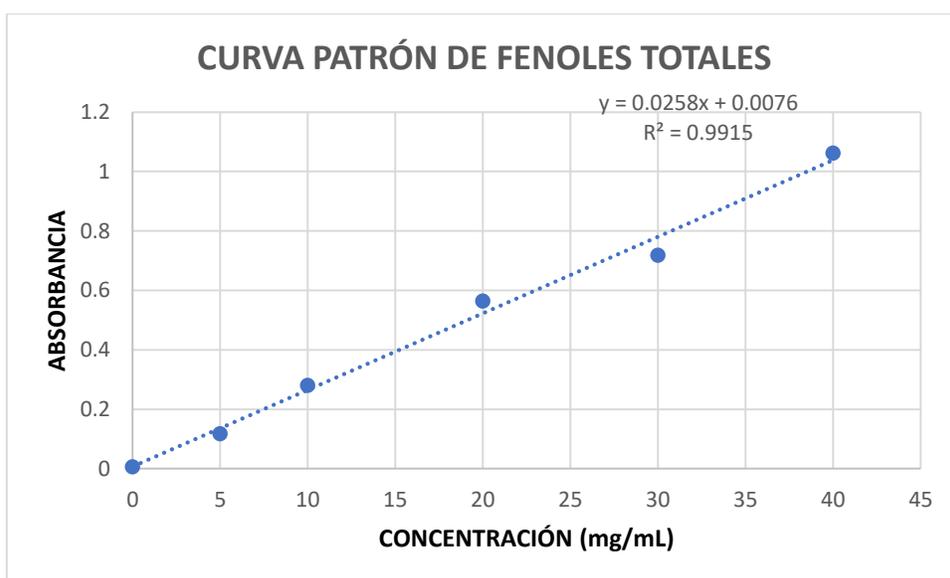
Anexo 5. Curva patrón de glucosa



Anexo 6. Remoción (%) de Demanda Química de Oxígeno

Cepa	Tratamientos	Remoción(%) de DQO
<i>Aspergillus sydowii</i> - like	T2	39.74 ± 0.06
	T8	28.91±0.67
	T11	35.21± 0.39
<i>Aspergillus destruens</i>	T1	38.70 ± 0.70
	T2	26.72±0.71
	T4	32.71± 0.24

Anexo 7. Curva patrón de fenoles totales



Anexo 8. Remoción (%) de fenoles totales

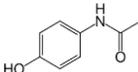
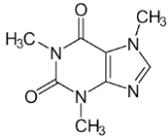
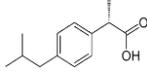
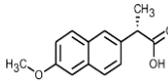
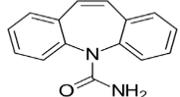
Cepa	Fermentación	Tratamientos	Remoción (%) de fenoles totales
<i>Aspergillus sydowii</i>	Sólida	T4	31.03 ± 0.96
		T6	55.83 ± 0.88
		T10	56.13 ± 0.50
	Líquida	T2	69.92 ± 0.21
		T8	95.93 ± 0.20
		T11	67.03 ± 0.42
<i>Aspergillus destruens</i>	Sólida	T9	43.57 ± 0.35
		T10	47.39 ± 0.50
		T12	44.21 ± 0.26
	Líquida	T1	38.70 ± 0.70
		T2	26.72 ± 0.71
		T4	32.71 ± 0.24

Anexo 9. Remoción (%) de metales pesados

Cepa	Fermentación	Tratamiento (T)	Parámetros	Metales pesados						
				Cromo	Níquel	Cobre	Arsénico	Plomo	Cadmio	Zinc
<i>A. sydowii</i>	Sólida	T4	Remoción (%)	9.7±0.9	12.4±0.3	17.6±0.6	3.0±0.4	8.4±0.7	47.8±0.2	16.5±0.8
			Concentración (ppb)	23.7±0.8	181.5±0.7	42.0±0.6	0.9±0.1	20.3±0.1	0.1±0.0	1695.0±7.1
		T6	Remoción (%)	40.7±0.2	44.7±0.5	45.8±0.8	21.4±0.8	47.8±0.3	65.0±0.5	20.6±0.7
			Concentración (ppb)	22.1±1.1	152.0±14.1	44.1±0.4	0.8±0.1	26.9±0.0	0.2±0.0	1525.0±49.5
		T10	Remoción (%)	15.0±0.9	3.020.8	44.8±0.6	22.6±0.4	7.7±0.4	56.3±0.2	13.2±0.8
			Concentración (ppb)	23.7±0.9	165.0±4.2	40.0±0.7	0.9±0.0	16.9±1.0	0.2±0.1	1600.0±14.1
	Líquida	T2	Remoción (%)	38.7±0.7	74.6±0.8	79.4±0.4	24.2±0.7	61.4±0.6	17.4±0.0	87.7±1.3
			Concentración (ppb)	0.9±0.2	6.9±0.1	13.9±0.6	3.6±0.0	3x10 ⁻² ±0.0	4.4*10 ⁻³ ±0.0	2.8±1.6
		T8	Remoción (%)	42.7±0.6	80.6±0.8	94.4±0.1	57.3±0.2	62.7±1.5	96.6±1.5	58.3±1.2
			Concentración (ppb)	1.8±0.0	26.3±0.3	455.0±8.5	7.4±0.5	5*10 ⁻² ±0.0	0.1±0.0	3.9±2.2
		T11	Remoción (%)	45.5±0.8	86.2±1.4 ^{fg}	95.3±1.6	30.5±0.1 ^w	42.5±0.6	89.4±0.9	65.3±1.2
			Concentración (ppb)	1.9±0.1	27.6±2.2	344.0±22.6	7.2±0.0	0.1±0.0	2.6*10 ⁻² ±0.0	10.1±4.2

Cepa	Fermentación	Tratamiento (T)	Parámetros	Metales pesados						
				Cromo	Níquel	Cobre	Arsénico	Plomo	Cadmio	Zinc
<i>A. destruens</i>	Sólida	T9	Remoción (%)	19.7±0.3	14.1±0.5	19.2±0.8	25.3±0.8	12.8±1.2	11.4±0.6	18.2±0.9
			Concentración (ppb)	186.0±18.4	50.8±35.9	1026.5±47.4	14.6±10.3	28.0±3.3	0.6±0.0	396.5±10.6
		T10	Remoción (%)	97.6±0.4	97.3±1.9	95.7±0.8	98.3±0.7	97.7±0.1	97.8±1.0	97.7±1.1
			Concentración (ppb)	4.7±0.7	3.1±2.8	34.8±15.6	0.3±0.2	0.8±0.6	1.3*10 ⁻³ ±0.0	6.6±4.7
		T12	Remoción (%)	30.6±0.6	25.4±0.1	25.0±1.3	22.8±0.4	24.3±0.6	30.3±0.1	28.3±1.3
			Concentración (ppb)	266.0±22.6	65.7±3.2	1425.0±77.8	26.5±1.5	40.6±3.0	0.8±0.0	516.5±10.69. 7
	Líquida	T1	Remoción (%)	45.9±0.4	45.9±0.7	71.5±0.4 ^l	88.3±1.8	70.5±1.0	84.8±1.1	87.7±1.3
			Concentración (ppb)	0.6±0.1	2.9±0.7	12.5±2.7	7.9±1.4	4.3*10 ⁻² ±0.0	6.6*10 ⁻³ ±0.0	2.8±1.6
		T2	Remoción (%)	27.0±1.4	68.4±1.6	59.2±1.4	60.6±1.6	98.3±1.4	62.0±0.9	58.3±1.2
			Concentración (ppb)	0.9±0.1	9.6±3.4	15.3±6.4	8.9±2.2	4.3*10 ⁻² ±0.0	5.1*10 ⁻³ ±0.0	3.9±2.2
		T4	Remoción (%)	57.1±0.5	47.4±1.8	48.4±0.9	82.5±0.8	97.2±1.6	60.4±1.4	65.3±1.2
			Concentración (ppb)	1.8±0.7	11.5±2.8	112.4±48.9	16.2±7.1	0.4±0.3	1.1*10 ⁻² ±0.0	10.1±4.2

Anexo 10. Remoción (%) de compuestos farmacéuticos

Cepa	Fermentación	Tratamientos	Remoción (%) de compuestos farmacéuticos				
			Acetaminofen 	Cafeína 	Ibuprofeno 	Naproxeno 	Carbamazepina 
<i>A. sydowii</i> - like	Líquida	T2	100±0.00	19.53±5.51	65.69±1.39	32.42±5.40	100.00±0.00
		T8	100±0.00	76.43±4.18	94.74±7.44	18.88±0.72	100.00±0.00
		T11	100±0.00	45.09±1.64	50.04±2.08	25.91±5.75	93.75±8.84
	Sólida	T4	82.64±6.87	64.16±4.55	65.77±1.24	36.84±4.97	40.00±8.04
		T6	100.00±0.00	52.68±7.80	100.00±0.00	24.42±3.17	31.03±6.09
		T10	64.58±2.95	44.96±3.02	90.54±7.94	6.39±2.11	34.34±2.60
<i>A. destruens</i>	Líquida	T1	100±0.00	87.62±2.56	74.00±8.49	45.59±8.04	93.75±8.84
		T2	100±0.00	64.21±1.07	78.96±8.81	22.73±5.41	100.00±0.00
		T4	100±0.00	35.47±3.56	81.64±7.71	21.57±6.38	100.00±0.00
	Sólida	T9	100.00±0.00	81.99±6.38	86.72±8.04	49.35±5.91	49.86±5.25
		T10	93.75±8.84	73.66±7.07	85.67±6.00	70.35±2.76	47.84±7.48
		T12	45.83±5.89	59.74±6.44	92.99±8.28	42.55±4.35	41.98±6.84

Cepas	Fermentación	Tratamientos	Remoción (%) de compuestos farmacéuticos					
			Ketoprofeno	Atenolol	TPP	Ciprofloxacino	Indometacina	Fenofibrato
<i>A. sydowii</i> - like	Líquida	T2	22.50±3.54	16.67±0.00	38.10±6.73	75.42±6.48	40.00±0.00	69.64±7.58
		T8	94.69±7.52	16.67±0.00	-	94.21±8.19	40.00±0.00	59.82±3.79
		T11	94.44±7.86	16.67±0.00	40.00±0.00	93.75±8.84	41.43±2.02	78.89±1.57
	Sólida	T4	50.00±0.00	-	40.00±0.00	51.32±7.96	25.00±0.00	61.11±7.86
		T6	50.00±0.00	-	40.00±0.00	68.35±7.42	25.00±0.00	50.00±0.00
		T10	94.12±8.32	-	51.92±2.72	41.82±7.25	25.00±0.00	84.44±6.29
<i>A. destruens</i>	Líquida	T1	100.00±0.00	-	15.48±1.68	96.79±4.53	22.50±3.54	53.57±5.05
		T2	100.00±0.00	-	55.56±7.86	83.45±6.77	22.50±3.54	53.57±5.05
		T4	94.23±8.16	-	56.35±1.12	100.00±0.00	22.50±3.54	61.90±6.73
	Sólida	T9	94.44±7.86	94.19±8.22	16.23±2.75	67.06±4.99	45.00±7.07	26.79±2.53
		T10	70.31±6.63	94.19±8.22	35.97±7.36	19.97±7.41	29.17±5.89	64.35±5.41
		T12	77.58±6.00	94.19±8.22	49.39±5.57	35.20±5.16	-	77.66±6.63