

Evaluación de hongos ligninolíticos (*Trametes versicolor*, *Bjerkandera adusta* y *Phanerochaete chrysosporium*) en columnas anaerobias a escala laboratorio para el tratamiento de vinazas tequileras

Anderson Ramírez-Ramírez^{1,3}, Belkis Sulbarán-Rangel¹, Juan Jauregui-Rincón² y Florentina Zurita-Martínez^{3,*}

¹ Departamento de Estudios del Agua y la Energía, Centro Universitario de Tonalá, Universidad de Guadalajara, Tonalá, Jalisco, México

² Departamento de Ingeniería Bioquímica, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México

³ Laboratorio de Calidad Ambiental, Departamento de Ciencias Tecnológicas, Centro Universitario de la Ciénega, Universidad de Guadalajara, Ocotlán, Jalisco, México

* Autor de correspondencia: fzurita@cuci.udg.mx

Contaminación de agua, suelo y aire (Tratamientos biológicos).

Palabras clave: hongos ligninolíticos, vinazas tequileras, tratamiento anaerobio; biodegradación.

Introducción. La producción del Tequila ha experimentado un enorme crecimiento a través de los años. Desafortunadamente este incremento también ha generado que la producción de residuos como son las vinazas se eleven, pues por cada litro de tequila se estima que se producen de 10 a 12 L de vinazas. Las vinazas son altamente contaminantes y difíciles de tratar. Entre sus características se encuentran una coloración café oscura, debido a compuestos fenólicos y melanoidinas (Pant & Adholeya, 2007), pH menor a 4, DQO entre 40000 y 80000 mg/L y ST de alrededor de 35000 mg/L (López López & Contreras Ramos, 2015). Entre las tecnologías para su tratamiento se tiene a la digestión anaerobia, enfocada principalmente en la remoción de materia orgánica (Méndez-Acosta *et al.*, 2010) o la coagulación-floculación, para la remoción de sólidos suspendidos (Carvajal-Zarrabal *et al.*, 2012). Si bien estas tecnologías han demostrado ser efectivas, existe el interés de estudiar nuevas variantes las cuales además de demostrar efectividad, puedan ofrecer un valor agregado como puede ser un bajo costo de operación y mantenimiento. Con base en esto, la atención se ha enfocado en tecnologías como la micorremediación y los humedales verticales de tratamiento, los cuales pueden encontrar aplicabilidad en las micro y pequeñas tequileras. Por lo anterior, se abre la posibilidad de acoplar hongos ligninolíticos en la parte superior de un humedal vertical parcialmente saturado, lo que a su vez lleva a evaluar primero diferentes hongos ligninolíticos en columnas para obtener información que permita que dicho acoplamiento sea posible.

Materiales y Métodos. Se seleccionaron los hongos *Phanerochaete chrysosporium* UAMH 3642, *Trametes versicolor* UAMH 8272 y *Bjerkandera adusta* UAMH 4312, (obtenidos de la Universidad de Alberta Canadá). Se sometieron a un proceso de producción de biomasa (Pickard *et al.*, 1999), en donde porciones de medio agar de 1cm x 1cm con cada hongo fueron mezclados en un contenedor de acero inoxidable con ayuda de un rotor Dremel y luego inoculados en esterilidad en matraces de 2L conteniendo medio buffer cereal (cereal de fibra marca Kelloggs, al 2% p/v y tamponado a pH 6) (Figura 1a) y sometidos a rotación por 12 días a temperatura ambiente, entre 120 y 130 rpm, para promover su crecimiento en forma de pellets (Figura 1b).

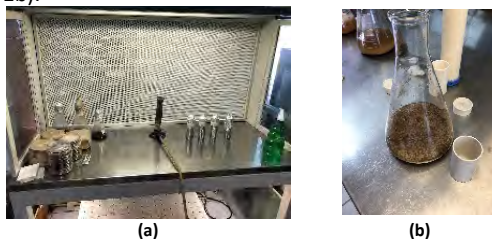


Figura 1. (a) producción de biomasa y (b) formación de pellets

Se diseñaron columnas de PVC de 22 cm de altura y 5 cm de diámetro (Figura 2a). En su interior se colocaron 6 cartuchos perforados (como

sistema de drenaje) del mismo material, y conteniendo fibra de poliéster. En cada cartucho se colocaron los hongos y se sometieron las columnas a congelamiento entre -4 y -21 °C para promover la formación de una esponja fúngica y de esa manera autoinmovilizar el hongo. El sistema se monitoreó por 14 semanas, analizando semanalmente el efluente de cada columna así como la vinaza cruda (Figura 2b). Los parámetros analizados fueron: SST, SDT, DQO, DBO₅, color aparente y verdadero, nitrógeno total, fosfatos, pH y conductividad. Se realizaron pruebas ANOVA y cuando hubo diferencias significativas, pruebas LSD, utilizando Statgraphics Centurion XVI y a un nivel de significancia de $p=0.05$

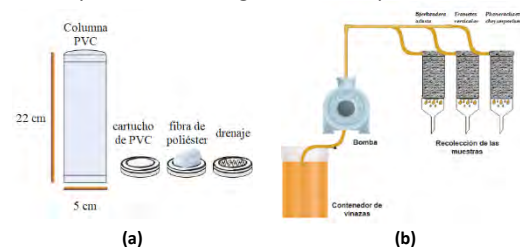


Figura 2. (a) diseño de columna y (b) diagrama del experimento

Resultados. Se obtuvo una reducción significativa de sólidos suspendidos ($p<0.05$) debido presumiblemente a un efecto de filtración en las 3 columnas, siendo muy similares los porcentajes de remoción con cada hongo (*B. adusta* 69.699%, *T. versicolor* 70.73% y *P. chrysosporium* 71.70%) (Figura 3a). Resultados similares fueron encontrados por Arum-Kumar *et al.* (2008), quienes trabajaron con el género *Aspergillus* y obtuvieron remociones del 76 y 73% a partir de una concentración de 105,200 mg/L. Respecto a los SDT se presentó una tendencia de incremento de estos (Figura. 3b), posiblemente por la liberación de polisacáridos constituyentes de su pared celular. Este resultado fue contrario a lo encontrado por autores como Arun-Kumar *et al.* (2008) o Romanholo-Ferreira (2011), pero apoyado por el hecho de que los polisacáridos tienen diferentes funciones biológicas incluyendo la protección contra estresores ya sea ambientales o resultado de la interacción con otros organismos (Osinska-Jaroszuk *et al.*, 2020). El color verdadero incrementó debido al incremento de sólidos disueltos (Figura 3c) y el aparente disminuyó por la remoción de SS (Figura 3d). Se estima que debido a que los hongos permanecieron inundados y a que a su vez esto originó que se mantuvieran estresados, su maquinaria enzimática (lacasas, manganos peroxidasa, etc.) no se manifestó ocasionando que no hubiera remoción de color, algo que si se ha observado en otros estudios (Kirk & Farrell, 1987; Hammel & Cullen, 2008). Respecto a la DBO y DQO (Figura 3e y 3f, respectivamente), no hubo una reducción significativa con los tres hongos ($p>0.05$), aunque si una tendencia de disminución en el caso de la DQO, siendo mayor para *versicolor*. Como a continuación se verá con los nitrógenos (Figura 3g y 3h), las condiciones de este estudio causaron que los hongos realizaran una

desnitrificación de NO_2^- y NO_3^- hasta N_2O , lo que implica el uso de donadores de electrones e interviniendo así tal vez la materia orgánica presente y por ello teniendo la tendencia de disminución. Varios estudios han demostrado que varios tipos de hongos son capaces de desnitrificar en presencia de nitritos y nitratos y en condiciones deficientes de oxígeno (Morozkina & Kurakov, 2007). Estas dos especies químicas están asociadas con la síntesis de ATP en el proceso de respiración anaerobia (Kobayashi *et al.*, 1996). En otro sentido, aunque se esperaba una mayor reducción de materia orgánica, como ha ocurrido con otros autores (Benito *et al.*, 1997; Retes-Pruneda *et al.*, 2014), la condición de estrés causada por la ausencia de oxígeno, probablemente inhibió el sistema enzimático al cual se le atribuye el efecto de degradación. En cuanto a los fosfatos y nitrógeno (Figura 3g y 3h, respectivamente), ambos elementos son esenciales para el crecimiento de los hongos, razón por la cual el fósforo disminuye, aunque no significativamente ($p>0.05$), al igual que el nitrógeno, aunque este último esencialmente se redujo como resultado de la respiración anaerobia presentada por los hongos (nitritos y nitratos asociados con la síntesis de ATP (Kobayashi *et al.*, 1996).

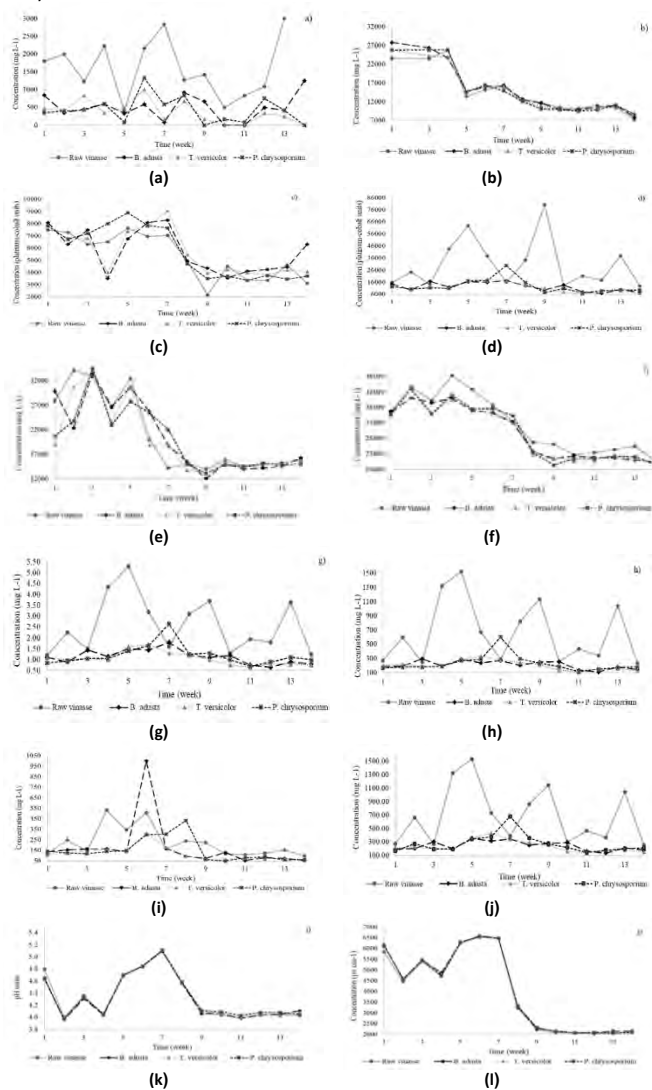


Figura 3. Efecto de los hongos sobre parámetros fisicoquímicos: (a) SST, (b) SDT, (c) color verdadero, (d) color aparente, (e) DBO₅, (f) DQO, (g) NO_2^- , (h) NO_3^- , (i) fosfatos y (j) nitrógeno total, (k) pH y (l) conductividad.

Finalmente en relación al pH y la conductividad (Figura 3i y 3j, respectivamente), no hubo variaciones en ambos parámetros. Se

estima que en el caso del pH, por permanecer los hongos en un metabolismo secundario debido a que estuvieron inundados con vinaza, esto no permitió que generaran alguna variación. La falta de modificación de la conductividad evidencia que los hongos no modificaron la concentración de iones.

Conclusiones. Los resultados muestran la habilidad de los 3 hongos de adaptarse a condiciones adversas como la anaerobiosis, activando mecanismos metabólicos como la desnitrificación, enfatizando con ello la posibilidad de usarlos como organismos desnitrificadores. Respecto al efecto biorremediador, los 3 fueron efectivos en la eliminación de SS y nitrógeno, algo deseable en el tratamiento de vinazas. Considerando que uno de los objetivos era seleccionar uno de los hongos para su posterior inserción en un HVPS, con base en su mejor desempeño, *T. versicolor* resulta ser el hongo seleccionado

Bibliografía.

- Arun-Kumar, M., Sheik-Abdullah, S., Sampath-Kumar, P., Dheeba, B., & Mathumitha, C. (2008). Comparative Study on Potentiality of Bacteria and Fungi in Bioremediation and Decolorization of Molasses Spent Wash. *Journal of pure and Applied Microbiology*, 2(2), 393-400.
- Benito, G. G., Miranda, M. P., & Rodríguez-de los Santos, D. (1997). Decolorization of wastewater from an alcoholic fermentation process with *Trametes versicolor*. *Biores. Technol.*, 61, 33-37.
- Carvajal-Zarrabal, O., Nolasco-Hipólito, C., Barradas-Dermitz, D. M., Hayward-Jones, P. M., Aguilar-Uscanga, M. G., & Bujang, K. (2012). Treatment of vinasse from tequila production using polyglutamic acid. *Journal of Environmental Management*, 95, 566-570.
- Hammel, K. E., & Cullen, D. (2008). Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(3), 349-355.
- Kirk, T. K., & Farrell, R. L. (1987). Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annu Rev Microbiol*, 41, 465-505.
- Kobayashi, M., Matsuo, Y., Takimoto, A., Suzuki, S., Maruo, F., & Shoun, H. (1996). Denitrification, a novel type of respiratory metabolism in fungal mitochondrion. *J Biol Chem*, 271(27), 16263-16267.
- López-López, A., & Contreras-Ramos, S. M. (2015). Tratamiento de Efluentes y Aprovechamiento de Residuos. In A. C. Gschaedler-Mathis, B. Rodríguez-Garay, R. Prado-Ramírez, & J. L. Flores-Montaño (Eds.), *Ciencia y tecnología del tequila: avances y perspectivas* (2da Edición). Mexico: Grupo Promueve Compañías SC.
- Méndez-Acosta, H. O., Snell-Castro, R., Alcaraz-González, V., González-Álvarez, V., & Pelayo-Ortiz, C. (2010). Anaerobic treatment of Tequila vinasses in a CSTR-type digester *Biodegradation*, 21(3), 357-363.
- Morozkina, E. V., & Kurakov, A. V. (2007). Dissimilatory nitrate reduction in fungi under conditions of hypoxia and anoxia: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 43(5), 544-549.
- Osińska-Jaroszuk, M., Sulej, J., Jaszek, M., & Jaroszuk-Ścisiel, J. (2020). Applications of Fungal Polysaccharides *Reference Module in Life Sciences: Elsevier*.
- Pant, D., & Adholeya, A. (2007). Biological approaches for treatment of distillery wastewater: A review. *Bioresource Technology*, 98(12), 2321-2334.
- Pickard, M. A., Roman, R., Tinoco, R., & Vazquez-Duhalt, R. (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Corioliopsis gallica* UAMH 8260 laccase. *Appl Environ Microbiol*, 65(9), 3805-3809.
- Retes-Pruneda, J. L., Davila-Vazquez, G., Medina-Ramírez, I., Chavez-Vela, N. A., Lozano-Alvarez, J. A., Alatraste-Mondragon, F., & Jauregui-Rincon, J. (2014). High removal of chemical and biochemical oxygen demand from tequila vinasses by using physicochemical and biological methods. *Environ Technol*, 35(13-16), 1773-1784.
- Romanholo-Ferreira, L. F. R., Aguiar, M. M., Messias, T. G., Pompeu, G. B., Lopez, A. M. Q., Silva, D. P., & Monteiro, R. T. (2011). Evaluation of sugar-cane vinasse treated with *Pleurotus sajor-caju* utilizing aquatic organisms as toxicological indicators. *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(1), 132-137.