

Evaluación de la Síntesis Enzimática de Lacasa a partir de *Fusarium sp* y *Bacillus sp* para la Biotransformación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en Agua.

Cindy Lorena Fernández Orjuela

Universidad de Cundinamarca
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Programa Ingeniería Ambiental
Facatativá
2017

Evaluación de la Síntesis Enzimática de Lacasa a partir de *Fusarium sp* y *Bacillus sp* para la Biotransformación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en Agua.

Cindy Lorena Fernández Orjuela

Trabajo de Grado para Optar por el Título de Ingeniero Ambiental

Director

Lizeth Johanna Moreno Galarza

Bacterióloga MSc Microbiología

Universidad de Cundinamarca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Programa Ingeniería Ambiental

Facatativá

2017

Agradecimientos

Primeramente a Dios, por trazar el camino que me trajera hasta aquí para permitirme cumplir la meta más grande hasta ahora en mi vida académica, por darme fortaleza y mantenerme firme en el desarrollo del proyecto.

A mis padres y el resto de mi familia, por confiar en mí y hacer todo lo que estuvo en sus manos para el desarrollo de esta investigación, por el amor, la comprensión, el apoyo incondicional y sobre todo la paciencia de mi madre que estuvo siempre presente.

A la docente Lizeth Moreno, sin la que no hubiera sido posible culminar este proyecto, agradezco su gran dedicación y amplia disponibilidad, así como darme el privilegio de trabajar con ella.

Al equipo de laboratorio de la Universidad de Cundinamarca, extensión Facatativá, por brindarme, el material, la asesoría, los espacios físicos y académicos fundamentales para la experimentación, y por el gran apoyo recibido de parte del personal administrativo.

A mis compañeros de semestre, porque siempre fueron grandes colaboradores en mi carrera y porque en palabras de Lyndon Johnson “No hay problema que no podamos resolver juntos, y muy pocos que podamos resolver por nosotros mismos”.

A la empresa Aguas de Facatativá, por permitirme hacer uso ocasional de las instalaciones y equipos del laboratorio de aguas.

A la docente Gabriela Romo, por prestarme asesoría en la práctica de laboratorio y por estar siempre pendiente de los adelantos en el proyecto.

Al programa de Ingeniería Ambiental de la Universidad de Cundinamarca, Extensión Facatativá, por tener docentes de alta calidad que me motivaron a iniciar una etapa investigativa en mi carrera y gracias a ellos poder mantenerla.

“Los grandes logros nacen de grandes sacrificios, y nunca son fruto del egoísmo.”

Napoleón Hill.

Resumen

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) están conformados por dos o más anillos aromáticos que se disponen en ángulos, racimos o línea recta; son contaminantes de interés ambiental por las afecciones causadas en los ecosistemas y la salud humana, su transformación se hace necesaria debido a las distintas fuentes de ingreso que tiene en el medio acuático; por esta razón se propone la técnica de biotransformación con lacasa proveniente de *Fusarium sp* y *Bacillus sp*, una enzima oxidasa que cataliza la reducción de oxígeno a agua por medio de la oxidación de compuestos como HAPs. Para ello se identificaron los microorganismos *Fusarium sp* y *Bacillus cereus*, posteriormente se evidenció la producción de lacasa en medio sólido y se realizaron pruebas fotométricas para cuantificación de la enzima, usando filtración para obtener extracto crudo enzimático, adicionalmente se aplicó la técnica de partición de tres fases para purificación de proteínas y se usó la enzima purificada en la inoculación de muestras de agua con HAPs, procediendo a realizar medición de las concentraciones de hidrocarburo en laboratorio certificado y el respectivo análisis estadístico de los resultados. Se observó la formación de halo de coloración por parte de *B. cereus* y se determinó que *Fusarium* cuenta con una isoforma de lacasa blanca o amarilla que no colorea el medio, en la medición de actividad enzimática ambos microorganismos tuvieron productividad máxima el día 17 con promedio de 39.68 U/L de *Bacillus sp* y 17.36 U/L de *Fusarium sp*, mostraron rendimientos de 220% y 344% respectivamente en la actividad enzimática específica del extracto purificado, a los que corresponden 0.58 y 5.18 grados de purificación. El análisis químico mostró que ambos microorganismos producen lacasa capaz de disminuir los contaminantes poliaromáticos, incluso el benzo(a)pireno pese a su complejidad estructural, particularmente la lacasa de *Fusarium sp* tuvo mayor eficiencia de remoción sobre naftaleno y *Bacillus sp* sobre antraceno, además ninguna de las dos isoformas de la enzima fue capaz de reducir la concentración de benzo(g, h, i)perileno y indeno(1, 2, 3- cd)pireno. Finalmente los análisis estadísticos permitieron definir que la especie más adecuada en la producción de enzima purificada es *Bacillus cereus* y que *Fusarium sp* cuenta con una isoforma más eficiente en remoción de hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Palabras clave: biotransformación, lacasa, hidrocarburos aromáticos policíclicos, remoción, purificación.

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are composed of two or more aromatic rings arranged in angles, clusters or straight lines; are pollutants of environmental interest due to the affections caused in ecosystems and human health, their transformation is necessary owing to the different income sources in to water, for this reason is proposed a biotransformation technique using laccase enzyme from *Fusarium sp* and *Bacillus sp*, an oxidase enzyme which catalyzes the reduction of oxygen into water, through the oxidation of compounds as PAHs. For that, the microorganisms *Fusarium sp* and *Bacillus cereus* were identified, subsequently the production of laccase in solid medium was evidenced and photometric tests were carried out to quantify the enzyme, using filtration methodology to enzymatic raw extract obtaining, in addition the three-phase partitioning technique was applied to the purification of proteins and the purified laccase extract was used in the inoculation of water samples with PAHs, proceeding to the measurement of hydrocarbon concentrations in a certified laboratory and the respective statistical analysis. Was observed the formation of halo staining by *B. cereus* and it was determined that *Fusarium* has a white or yellow laccase isoform that does not color the medium, in the measurement of enzymatic activity both microorganisms had maximum productivity on day 17 with average of 39.68 U / L of *Bacillus sp* and 17.36 U / L of *Fusarium sp*, with yields of 220% and 344% respectively in the specific enzymatic activity of the purified extract, corresponding to 0.58 and 5.18 degrees of purification. The chemical analysis showed that both microorganisms produce laccase able to reduce the polyaromatic contaminants, even of benzo (a) pyrene notwithstanding its structural complexity, also the laccase from *Fusarium sp* had greater naphthalene removal efficiency and *Bacillus sp* of anthracene; aversely, none of the two enzyme isoforms was able to reduce the concentration of benzo (g, h, i) perylene and indene (1, 2, 3-cd) pyrene. Finally, the statistical analysis allowed to define *Bacillus cereus* as the most appropriate species in the production of purified enzyme and *Fusarium sp* isoform as more efficient in the removal of PAHs.

Keywords: biotransformation, laccase, polycyclic aromatic hydrocarbons, removal, purification.

Contenido

Resumen.....	4
Abstract.....	5
Introducción	12
CAPÍTULO 1: Contexto General.....	14
1.1. Planteamiento del Problema	14
1.2. Justificación	16
1.3. Objetivos	18
1.3.1. Objetivo General.....	18
1.3.2. Objetivos específicos	18
1.4. Marco Referencial	19
1.4.1. Marco Conceptual	19
1.4.2. Marco Teórico	21
1.4.3. Marco Legal.....	24
CAPÍTULO 2: Caracterización de especies.	30
2.1. <i>Fusarium spp.</i>.....	30
2.2. <i>Bacillus spp.</i>.....	32
2.3. Metodología.....	34
2.3.1. Recolección de ejemplares	34
2.3.2. Aislamiento de microorganismos	35
2.3.3. Identificación de géneros microbianos	35
2.3.3.1. Género <i>Fusarium</i>.....	35
2.3.3.2. Género <i>Bacillus</i>	36
2.4. Resultados y Análisis.....	39
2.4.1. <i>Fusarium sp.</i>	39

2.4.1.1. <i>Aislamiento y monitoreo del crecimiento micelial</i>	39
2.4.1.2. <i>Identificación del género microbiano</i>	41
2.4.2. <i>Bacillus sp.</i>	45
2.4.1.1. <i>Aislamiento y monitoreo del crecimiento bacteriano</i>	45
2.4.1.2. <i>Identificación del género bacteriano</i>	46
CAPÍTULO 3: Valoración de la actividad enzimática de lacasa.	50
3.1. Bioquímica de Lacasa	50
3.1.1. Mecanismo catalítico de Lacasa	51
3.1.1.1 <i>Etapas de catálisis enzimática</i>	52
3.2. Purificación de Proteínas	53
3.2.1. Principio de la Partición de Tres Fases	54
3.2.1.1. <i>Sulfato de Amonio</i>	56
3.2.1.2. <i>Ter-butanol</i>	56
3.2.1.3. <i>Ventajas y Desventajas</i>	56
3.3. Metodología	57
3.3.1. Preparación de inóculo microbiano	57
3.3.1.1. <i>Conteo de conidias en hemocitómetro o cámara de Neubauer</i>	57
3.3.1.2. <i>Conteo de colonias bacterianas en placa con diluciones seriadas.</i>	58
3.3.2. Valoración cualitativa de producción de lacasa	58
3.3.2.1. <i>Siembra en medios de cultivo sólidos</i>	58
3.3.2.2. <i>Índice de Potencia</i>	59
3.3.3. Valoración cuantitativa de producción de lacasa	59
3.3.3.1. <i>Siembra en medios de cultivo líquidos</i>	59
3.3.3.2. <i>Medición fotométrica del extracto enzimático</i>	60
3.3.4. Purificación de lacasa	61

3.3.4.1. <i>Partición Trifásica (TPP)</i>	61
3.3.5. Actividad enzimática específica (SEA)	62
3.3.5.1. <i>Determinación de la biomasa en peso seco</i>	62
3.3.5.2. <i>Tratamiento de datos</i>	62
3.4. Resultados y Análisis	63
3.4.1. Cuantificación de células microbianas	63
3.4.2. Valoración cualitativa de producción de lacasa	63
3.4.3. Valoración cuantitativa de producción de lacasa	66
3.4.4. Purificación enzimática por Partición Trifásica	69
CAPÍTULO 4: Efecto de Lacasa microbiana sobre HAPs.	73
4.1. Propiedades Físico-Químicas de los HAPs	73
4.1.1. Técnicas de análisis químico de HAPs en agua	74
4.2. Biotransformación de HAP en el agua	75
4.3. Metodología	77
4.3.1. Preparación del analito	77
4.3.2. Biotransformación de HAP con el uso de lacasa	77
4.4. Resultados y análisis	78
CAPÍTULO 5: Selección de especie con análisis estadístico.	84
5.1. Pruebas de estadística inferencial	84
5.1.1. Análisis de varianza (ANOVA)	84
5.1.2. Prueba t de Student	85
5.2. Metodología	85
5.2.2. Prueba de ANOVA unifactorial	87
5.2.3. Prueba t de Student para muestras independientes	88
5.3. Resultados y Análisis	88

5.3.1.	ANOVA de producción de lacasa microbiana.....	88
5.3.2.	ANOVA de concentraciones de HAPs.....	90
5.3.3.	Prueba t de Student de porcentajes de remoción de HAPs.....	91
CAPÍTULO 6: Conclusiones y Recomendaciones		92
6.1.	Conclusiones	92
6.2.	Recomendaciones	93
Bibliografía		95
ANEXOS.....		112
Anexo 1: Composición de Medios de Cultivo para Lacasa		112
Anexo 2: Preparación de Soluciones		114
Anexo 3: Conteo de esporas de <i>Fusarium sp</i>		116
Anexo 4: Datos de Actividad Enzimática.....		117
Anexo 5: Análisis de HAP en laboratorio certificado		118
Anexo 6: Análisis Estadístico en SPSS		120

Índice de Tablas

Tabla 1.	Normatividad Nacional e Internacional sobre HAPs en el Agua.	25
Tabla 2.	Clasificación Taxonómica del Género <i>Fusarium</i> . *	31
Tabla 3.	Clasificación Taxonómica del Género <i>Bacillus</i> . *	33
Tabla 4.	Fases de crecimiento para <i>Bacillus spp.</i>	34
Tabla 5.	Descripción del monitoreo de <i>Fusarium sp</i> en agar PDA.*	40
Tabla 6.	Descripción microscópica de <i>Fusarium sp.</i>	43
Tabla 7.	Pruebas Bioquímicas para <i>Bacillus sp.</i>	47
Tabla 8.	Identificación de especie bacteriana mediante el sistema Crystal™.*	48
Tabla 9.	Nomenclatura para lacasa.*	50
Tabla 10.	Ecuación de actividad enzimática para lacasa.*	61
Tabla 11.	Medición del diámetro de crecimiento frente al halo de coloración de <i>Bacillus sp.</i> * .	65

Tabla 12. Actividad enzimática de extracto crudo de lacasa.*	67
Tabla 13. Actividad enzimática de purificación de proteínas por TPP.....	69
Tabla 14. Tratamiento de datos de actividad enzimática antes y después de purificación.*	71
Tabla 15. Biomasa en peso seco y actividad enzimática específica (SEA).*	71
Tabla 16. Propiedades físico-químicas de algunos HAPs.....	73
Tabla 17. Cálculo de U/L de lacasa por muestra de HAPs.*	78
Tabla 18. Resultados del análisis químico de HAPs.....	79

Índice de Figuras

Figura 1. Estructuras Microscópicas del Género Fusarium.*	30
Figura 2. Ciclo de vida de Fusarium.*	32
Figura 3. Montaje de agar clavel para Fusarium sp.*	36
Figura 4. Tinción de Shaeffer y Fulton para esporas de Bacillus sp.*	37
Figura 5. BBL™ Crystal™ para Gram positivos.*	38
Figura 6. Patrones de la Escala de McFarland.*	39
Figura 7. Crecimiento de Fusarium A.*	41
Figura 8. Crecimiento de Fusarium sp. en Agar Clavel y Rosa de Bengala.*	42
Figura 9. Tinción de Gram para Bacillus sp.*	45
Figura 10. Crecimiento de Bacillus sp.*	46
Figura 11. Prueba en agar sangre para β hemólisis y de lugol para amilasa.*	47
Figura 12. Prueba de peróxido para catalasa: positiva.*	48
Figura 13. Prueba BBL™ Crystal™: observación bajo luz ultra violeta.*	48
Figura 14. Prueba BBL™ Crystal™: observación directa.*	49
Figura 15. Estructura de los centros activos de lacasa.*	52
Figura 16. Mecanismo catalítico de Lacasa.*	53
Figura 17. Representación gráfica del sistema TPP.*	54
Figura 18. Representación esquemática de las reacciones de TPP.*	55
Figura 19. Crecimiento de Fusarium sp para valoración cualitativa de lacasa.*	64
Figura 20. Índice de potencia para Bacillus sp.*	65
Figura 21. Crecimiento de Bacillus sp para valoración cualitativa de lacasa.*	65
Figura 22. Extractos enzimáticos mediante la técnica de filtración.*	67

Figura 23. Formación de tres fases en la TPP.....	69
Figura 24. Actividades enzimáticas del extracto de lacasa crudo y purificado.*	70
Figura 25. Productos de la oxidación de HAPs.*	76
Figura 26. Montaje de preparación de agua contaminada con HAPs.*	77
Figura 27. Comparación de concentraciones de HAPs.*	80
Figura 28. Comparación porcentajes de remoción de HAPs.*	81
Figura 29. Oxidación con lacasa de benzo(a)pireno.....	83
Figura 30. Procedimiento prueba de normalidad en SPSS.*	86
Figura 31. Procedimiento prueba de ANOVA unifactorial en SPSS.*	87
Figura 32. Procedimiento prueba t de Student para muestras independientes en SPSS.*	88

Introducción

Este trabajo menciona en primer lugar la importancia sanitaria de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)¹, que pueden provocar afecciones de tipo mutagénico, cancerígeno e inmunosupresor, además de sus características de bioacumulación en animales con altos contenidos de grasa (Vives, Grimalt, & Guitart, 2001); por lo tanto se hace necesario encontrar alternativas para su eliminación, dando relevancia a las metodologías de biodegradación.

Es bien sabido que los microorganismos son la principal herramienta en los procesos de biorremediación, por el gran potencial biotransformador que poseen, aun así es debido relacionarlos con los contaminantes sobre los que mejor ejercen su efecto. En este sentido se ha encontrado que los microorganismos degradadores de lignina pueden tener efectos positivos en la descontaminación de áreas con presencia de HAPs, gracias a la síntesis de enzimas ligninolíticas entre las que se destaca la lacasa (Antonio Revuelta, 2013).

Ahora bien, para identificar los organismos óptimos en producción de enzimas con la capacidad de degradar HAPs hasta la inocuidad, es preciso analizar diferentes cepas microbianas que sean de fácil adquisición y que a partir de su metabolismo puedan sintetizarlas. (Rodríguez Sánchez, 2010). Teniendo en cuenta estas características, la enzima lacasa cuenta con propiedades biocatalíticas, que pueden actuar oxidando los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Martínez Ruiz, 2013), además se conoce su obtención por parte de los hongos del género *Fusarium sp* en grandes cantidades (Páez Llerena, 2012) y por parte de bacterias del género *Bacillus sp* con la particularidad de ser termoestables (Peralta Villalobos, 2015).

A partir de lo anterior se plantea como finalidad de la investigación evaluar la producción de lacasa proveniente de microorganismos ligninolíticos a fin de implementarlos en biotransformación de HAPs en agua contaminada.

Para cumplir con el propósito central, se presenta la identificación de la cepa bacteriana *Bacillus sp* y la micótica *Fusarium sp*, obtenidas a partir de muestras ambientales y manejadas mediante técnicas de aislamiento. Posteriormente la puesta en crecimiento para la producción enzimática respectiva, se basa en el uso de sustratos con las pertinentes fuentes de carbono,

¹ Encuéntrese también como hidrocarburos aromáticos polinucleares, HPAs (hidrocarburos poliaromáticos) o PAHs por sus siglas en inglés.

nitrógeno y e inductores enzimáticos; en este proceso la valoración cualitativa y cuantitativa de síntesis de lacasa es vital para proceder a seleccionar una técnica de purificación que permita la adquisición de la enzima con la menor cantidad de material celular posible. Así, las medidas de actividad enzimática (EA), actividad enzimática específica (SEA), porcentaje de rendimiento (R) y veces de purificación (P), dan cuenta de las facultades que tienen estos géneros microbianos para producir cantidades variadas de enzima, antes y después del proceso de purificación aplicado.

Una vez conocida la capacidad enzimática de los microorganismos estudiados, se requiere utilizar el extracto de lacasa purificado para disminuir la concentración de hidrocarburos aromáticos policíclicos, y evaluar de esta forma la tasa de biotransformación relacionada con la enzima de cada género microbiano. Finalmente es indispensable la elaboración de un análisis estadístico profundo que permita asegurar cuál de los dos géneros produce más cantidad de enzima y que magnitud tiene en la disminución de la concentración de HAPs en agua.

CAPÍTULO 1: Contexto General

1.1. Planteamiento del Problema

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son contaminantes de gran importancia ambiental por su alta persistencia y amplia distribución, que pueden llegar al medio por causa de eventos naturales (erupciones volcánicas, incendios forestales y aumento de temperatura de materia orgánica), actividades antropogénicas (combustión de derivados del petróleo y del carbón, uso de agroquímicos con altas concentraciones de naftaleno, derrames de crudo, entre otros.) e incluso pueden derivarse de pinos, eucaliptos y plantas aromáticas.

Ahora bien, a nivel global el ingreso de HAPs en el agua se relaciona mayormente con fugas de petróleo accidentales, provenientes de tanques de almacenamiento o de buques transportadores (Eibes González, 2007), y se calcula que anualmente el mar recibe seis millones de toneladas de crudo. En América Latina son de gran importancia los derrames ocurridos en el Golfo de México, debido a su diversidad en recursos marinos y costeros que funcionan como áreas de reproducción y hábitat de muchas especies, factores que se vieron afectados en 1979 por el vertido más grande de su historia con 186 millones de galones, y en 2010 con el ingreso de 102.325 galones de crudo (Villamar, 2011). De igual forma en otros países latinoamericanos se han visto los efectos de las fugas accidentales e incluso intencionales, no solamente en zonas marinas, incluyendo el Río Guarapiche en Venezuela, la Amazonía Peruana y el Río El Meta en Casanare, Colombia (Vera, Tam , & Pinto, 2008).

Para entrar en otro contexto, Colombia es un país con suelo de vocación agrícola, lo que implica el aumento gradual en la demanda de plaguicidas, reflejándose en un incremento reportado por el Banco Mundial de 360% entre uso e importación desde hace 20 años (Agencia de Noticias UN, 2015). Las actividades de este sector también representan el empleo de técnicas como la roza-tumba-quema (RTQ o tumba-quema) un sistema de control de tierras que consiste en desmontar los terrenos y tumbar la vegetación en los mismos para proceder a una pudrición natural o quema inducida (Rivas, 2012). En este sentido la problemática se centra en el uso de HAPs para la fabricación de plaguicidas (Waxman, 2013), que introducen los contaminantes en cuestión al medio acuático por los distritos de riego, contando también con que la combustión de residuos agrícolas, restos de madera y el aumento de la temperatura de desechos orgánicos producen

hidrocarburos poliaromáticos que son adheridos a partículas que alcanzan los cuerpos de agua (López, 1998).

En lo respectivo al uso de combustibles dentro del territorio colombiano, la UPME (Unidad de Planeación Minero Energética) proyecta un aumento porcentual en el consumo de diésel y gasolina de máximo 7,5% y 9,1% respectivamente para 2030 (García Botero, Obando Anzola, Martínez, & Rodríguez, 2015). Conjuntamente, de acuerdo con el RUNT (Registro Único Nacional de Tránsito), el 2016 cerró con un total de 12'623.300 vehículos en circulación, que incluyen motocicletas, vehículos familiares, maquinaria, remolques y semirremolques, de los cuales 1'162.984 se encuentran en el departamento de Cundinamarca, con un porcentaje del 9,2% frente a los demás departamentos (Redacción Negocios y Economía, 2016). Lo anterior tiene representatividad en la problemática, al comparar con los datos establecidos por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) que identifica los 16 HAPs prioritarios, provenientes exclusivamente de la combustión de fuentes móviles que transitan con diésel y gasolina (Quijano Parra, Quijano Vargas, & Meléndez Gélvez, 2016). El intenso tráfico vehicular en las carreteras colombianas junto con las corrientes de aire, favorecen que los hidrocarburos poliaromáticos sean depositados en sitios alejados de su fuente, llegando a diversos cuerpos fluviales y terminando en cuerpos de agua de abastecimiento para consumo humano (Araujo, Yegres, Barreto, & Antequera, 2016).

Sumado a lo anterior, desde el siglo XX en el país se ha presentado la deforestación de grandes extensiones de bosques alto andinos, que en los años 1950-1960 fueron reemplazados por plantaciones de coníferas (León, González, & Gallardo, 2011); el departamento de Cundinamarca se encuentra entre los que más han experimentado reforestación con estas especies, destacando *Pinus caribaea*, *Pinus oocarpa*, *Pinus patula* y *Pinus radiata* (Gómez, Ríos, & Peña, 2012). Estas plantaciones monoespecíficas de coníferas han generado polémica sobre los efectos ambientales a posteriori que podrían tener (Gutiérrez Morales, 2012), incluyendo las cantidades variables de trementina proveniente de la estructura leñosa de los pinos resinosos (Zaid Núñez, 2004), se trata de una sustancia semisólida de alta viscosidad constituida por una mezcla de hidrocarburos terpénicos y ácidos resínicos principalmente el ácido abiético, un HAP derivado del fenantreno (Vian Ortuño, 2006).

Estos contaminantes son de naturaleza lipofílica, por lo cual mientras algunos se evaporan hacia la atmósfera desde la superficie hídrica, la mayoría se adhiere a partículas que precipitan al fondo de los cuerpos de agua (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, 2016), lo que los hace además perjudiciales para los seres vivos con tejidos ricos en grasa, como reses, bovinos y peces, siendo más perjudiciales para estos últimos. Así mismo el consumo humano de agua y el contacto con material contaminado con HAPs puede causar distintas afecciones a largo plazo, aumentando la actividad carcinogénica, mutagénica e inmunosupresora. (Vives, Grimalt, & Guitart, 2001).

Adicionalmente a los hidrocarburos aromáticos polinucleares se les ha atribuido implicaciones en la génesis de tumores cancerígenos cutáneos, con clasificación en los grupos 2A (benzo[a]antraceno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno) y 2B (benzo[b]fluoranteno, benzo[j]fluoranteno y benzo[k]fluoranteno) de posibles carcinógenos en humanos² (Plaza, 2008). Particularmente el benzo[a]pireno es considerado como agente mutagénico de proteínas, por metabolizarse en productos que se unen a residuos y producen sustitución de bases del ADN por otras, así como eliminaciones o introducción de las mismas (Mathews, Van Holde, & Ahern, 2002); en mamíferos la absorción de este compuesto varía entre el 12 y el 99%, dependiendo la especie y la dosis de exposición, principalmente por vía oral (Pérez-Morales, Morales Gómez, & Haza Duaso, 2016).

1.2. Justificación

El decreto 1594 de 1984 en su artículo 20 considera los hidrocarburos poliaromáticos como sustancias de interés sanitario en el agua frente a la destinación del recurso hídrico en Colombia, con usos para consumo humano, doméstico y agrícola según el decreto 3930 de 2010. De manera análoga, el artículo 5 de la resolución 2115 de 2007 contempla los HAPs dentro de las características químicas de sustancias que tienen reconocido efecto adverso sobre la salud humana, y reglamenta el valor máximo aceptable de poliaromáticos en el agua para consumo humano hasta 0,01 mg/L. Dado que el recurso en Colombia tiene mayor demanda en la zona hidrográfica Magdalena-Cauca (67% del total nacional), con alto uso en los sectores agrícola (46,2%), energía

² La Organización Mundial de la Salud clasifica ciertos agentes en la Evaluación de Riesgos Carcinogénicos en Humanos con los siguientes grupos: 1A como carcinogénico, 2A como probablemente carcinogénico, 2B como posiblemente carcinogénico, 3 como no clasificable en cuanto a su carcinogenicidad y 4 como probablemente no cancerígeno (International Agency for Research on Cancer, 2017).

hidro y termoeléctrica (22,9%) y doméstico (10,9%), la aplicación de tratamiento en los cuerpos hídricos afectados por PAHs se encuentra necesaria, por la exposición constante de la población ante estos contaminantes (IDEAM, 2015).

Para disminuir la concentración de HAPs en el agua, se distinguen los tratamientos de tipo biológico, que tienen como fin remover o estabilizar materiales contaminantes con el uso de organismos vivos en acción directa o indirecta (Muñoz Couto, 2009). Entre ellos se destaca la técnica de biodegradación o biotransformación de sustancias, mediante la acción de microorganismos o productos metabólicos como las enzimas (Repetto Jiménez & Repetto Kuhn, 2009), por ser una estrategia conveniente que genera poca perturbación en los cuerpos hídricos y previene la contaminación de otros medios por la no introducción de sustancias químicas en el entorno (Mayolo, Machín, Rito, & Trejo, 2009).

En este sentido, Según Dávila y Vázquez-Duhalt, en las últimas décadas se ha demostrado el potencial de los organismos ligninolíticos, para biotransformación de contaminantes hasta la inocuidad, y para su uso en procesos biotecnológicos, destacando hongos de la pudrición blanca de la madera y especies de bacterias ubicuas (Antonio Revuelta, 2013).

Particularmente la enzima lacasa, posee un sistema enzimático que ha sido de los más estudiados desde 1885, encontrando gran variedad de aplicaciones biotecnológicas por sus características biocatalíticas, dentro de las que resalta la degradación de PAHs por medio de la oxidación, con la ventaja de que al combinar lacasa con productos adicionales será posible aumentar la actividad catalítica de la enzima (Martínez Ruiz, 2013). Al ser proveniente de microorganismos de la podredumbre blanca de la madera, la presencia de este tipo de especies en el entorno de los cuerpos hídricos tiene mayor probabilidad, contribuyendo a la disminución en el uso de materiales introducidos (Arana, Tellez, & González, 2002).

De los microorganismos estudiados en general, se ha encontrado que los hongos son los más usados para la producción de la enzima en cuestión, proveniente de hongos del filum Basidiomycota y Ascomycota, a este último perteneciente el género *Fusarium*, con la capacidad de producir grandes cantidades de lacasa de forma intra y extracelular (Páez Llerena, 2012). Complementario a esto, la lacasa bacteriana intercelular es producida por los géneros *Azospirillum* y *Bacillus*, para el interés de esta investigación se selecciona el segundo de ellos,

que permite obtener una de las enzimas bacterianas más termoestables conocidas y con vida media superior a la mostrada por lacasas fúngicas (Peralta Villalobos, 2015; Tangarife Morales, 2016).

Favorablemente la producción de lacasas genera bajos costos económicos, comparado con alternativas fisicoquímicas para la eliminación de HAPs, por lo que puede ser aceptada fácilmente por las comunidades aledañas a cuerpos de agua contaminados, facilitando su aplicación y permitiendo la acogida de prácticas culturales orientadas a la recuperación de la potabilidad del agua (Volke Sepúlveda & Velasco, 2002). Conjunto a esto, la evaluación de los efectos de la enzima producida por diferentes microorganismos sobre los hidrocarburos aromáticos policíclicos, ayudará a esclarecer las ideas sobre biotransformación de contaminantes orgánicos persistentes y a determinar sus posibles efectos positivos en la calidad fisicoquímica del recurso hídrico, sin alterar negativamente la composición microbiológica del mismo.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Evaluar la síntesis de lacasa a partir de microorganismos ligninolíticos a fin de implementarlos en la biotransformación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua contaminada.

1.3.2. Objetivos específicos

- **Objetivo 1:** Aislar y caracterizar microorganismos fúngicos y bacterianos, pertenecientes a los géneros *Fusarium sp* y *Bacillus sp* respectivamente, a partir de muestras ambientales.
- **Objetivo 2:** Valorar cualitativa y cuantitativamente la capacidad de producción y la actividad enzimática de lacasa en las especies seleccionadas.
- **Objetivo 3:** Analizar los efectos de la enzima proveniente de cada especie, en la biotransformación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos contaminantes del recurso hídrico.
- **Objetivo 4:** Seleccionar estadísticamente la especie más eficaz en la producción enzimática, con base en el efecto sobre los contaminantes poliaromáticos.

1.4.Marco Referencial

1.4.1. Marco Conceptual

En el Decreto número 1575 de 2007, artículo 1° se establece como agua natural, la no sometida a proceso de tratamiento para su potabilización. Consecuentemente, para efectos de la presente investigación, agua natural hace referencia a un sistema de alta complejidad, que representa un recurso natural variable en cantidad a nivel local y calidad en términos globales, formado por una fase acuosa, una gaseosa y una o varias sólidas, que se encuentran en constante interacción regida por leyes termodinámicas, cuya composición química es alterada de acuerdo a diversos factores hidrogeológicos, geológicos, geomorfológicos, pedológicos, microbiológicos, climáticos y ambientales (Fagundo Castillo & González Hernández, 2002).

Por otra parte, al hablar de contaminación hídrica las definiciones son múltiples, a continuación se presentan algunos autores:

En el C.E.E de Las Naciones Unidas, 1961 se menciona que “Un agua está contaminada cuando se ve alterada su composición o estado, directa o indirectamente, como consecuencia de la actividad humana, de tal modo que quede menos apta para uno o todos los usos a que va destinada, para los que sería apta en su calidad natural” (Orozco, Pérez, González, Rodríguez, & Alfayate, 2003).

Además, la Carta Europea del Agua 1968 afirma que “La Polución consiste en una modificación, generalmente provocada por el hombre, de la calidad de agua, haciéndola impropia o peligrosa para el consumo humano, la industria, la agricultura, la pesca, las actividades recreativas así como para los animales domésticos y la vida natural” (Castells, 2000).

Sánchez y Gándara, 2011, definen la contaminación como:

“Presencia en el agua de materiales dañinos que producen efectos adversos sobre mantos acuíferos, cuerpos de agua, ecosistemas y salud pública; se asocian con el desarrollo de actividades agrícolas cuyos principales contaminantes son residuos agroquímicos y restos de suelos erosionados, con descargas industriales que contienen sustancias tóxicas persistentes y bioacumulables; y con aguas urbanas con contenidos de materia orgánica y bacteriológica,

principalmente, así como algunos tóxicos que provienen de las descargas industriales conectadas a las redes municipales de alcantarillado”.

Ahora bien, teniendo en cuenta que las definiciones anteriormente descritas parten principalmente de la presencia de materiales adicionales a la composición del agua superficial, que consideran las actividades humanas como principal fuente de contaminación directa o indirecta y que los efectos de la misma dependen del uso para el que se destine el recurso, la investigación estará basada en la Norma Técnica Colombiana 813, que conceptualiza la contaminación hídrica como “la alteración de las características físicas, químicas o biológicas del agua, resultante de la incorporación en la misma de productos o residuos que ocasionen o puedan ocasionar molestias directas o indirectas, enfermedades y aún la muerte de seres vivos” (ICONTEC, 2015).

En cuanto a los tipos de contaminantes que puede presentar el recurso se encuentran sólidos en suspensión, organismos vivos y componentes químicos (Food & Agriculture Org., 1993), siendo estos últimos de interés primordial para la investigación, los cuales incluyen Contaminantes Orgánicos Persistentes, que según el convenio de Estocolmo del 22 de Mayo del 2001 son compuestos orgánicos con propiedades tóxicas, resistentes a la degradación, que pueden llegar a bioacumularse y son transportados internacionalmente por aire, agua y especies migratorias llegando a ecosistemas terrestres y acuáticos (Sánchez, 2008). Los COPs se subdividen en Hidrocarburos Poliaromáticos e Hidrocarburos Halogenados (Albert, 1998).

Los Hidrocarburos Poliaromáticos también se conocen como Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, son contaminantes atmosféricos prioritarios debido a su incidencia carcinogénica, mutagénica y teratogénica en la salud humana (Díaz, Alfaro, & Garza, 2001), formados por dos o más anillos bencénicos condensados en forma recta angulados o racimados (Mastandrea et al., 2005).

Los tratamientos de contaminantes representativos en torno al recurso hídrico, son los de tipo biológico, también denominados tratamientos secundarios, que según Muñoz Couto (2009) tienen como objetivo principal la remoción o estabilización de la mayor parte de materia contaminante en el agua residual por medio de organismos vivos con la acción directa o indirecta, es así como Ortíz, Sanz, Dorado , & Villar en 2007 resaltan como tratamiento para aguas contaminadas los procesos *in situ*, que son realizados en el lugar donde se presenta la contaminación, dentro de los que se destacan las alternativas de biotransformación, definida por

Nagel (1991) como “cualquier transformación química de una sustancia producida por seres vivos o por preparaciones obtenidas de estos” (Repetto Jiménez & Repetto Kuhn, 2009).

Al tratarse de preparaciones obtenidas por organismos se habla de las enzimas, que son proteínas catalizadoras de reacciones químicas biológicas mediante la formación o rompimiento enlaces covalentes, (Mendoza Patiño, 2008) y cuya actividad se encuentra sujeta a regulación, es medida por medio de la Unidad internacional de actividad enzimática definida como la cantidad de enzima necesaria para catalizar un micromol de sustrato por minuto a 25°C y en condiciones estandarizadas (Macarulla, Marino, & Macarulla, 2002) (Sapag & Schmidt, 2002).

La enzima objeto de estudio de la investigación es producida por organismos ligninolíticos, únicos capaces de degradar y mineralizar la lignina, destacándose los hongos de la pudrición blanca, produciendo enzimas extracelulares, entre ellas la lacasa, con capacidad de degradar además de la lignina, compuestos fenólicos (Gutiérrez & Martínez, 1996).

Camarero Fernández & Cañas, 2012 definen las lacasas como “oxidasas multicobre que catalizan la reducción del oxígeno a agua a través de la oxidación de fenoles substituidos, entre otros compuestos”, recalando que son herramientas biotecnológicas importantes en procesos de biocatálisis industrial y ambiental, con alta eficacia en la degradación de tintes industriales y PAHs.

Finalmente, para la obtención de enzima purificada es empleada la TPP o partición de tres fases, que Yadav, Gupta y Khare (2017) describen como un proceso para conducir moléculas de proteínas presentes en una solución acuosa u otro hacia una fase intermedia, utilizando cantidades específicas de terc-butanol y sulfato de amonio, lo que genera la división de la solución en tres fases, obteniendo material orgánico en la fase superior, proteico en la fase intermedia y el restante en la fase acuosa.

1.4.2. Marco Teórico

Trujillo Mejía en 2010 menciona los HAPs como compuestos provenientes de la incineración incompleta del carbón, petróleo, gas, madera, basuras y demás sustancias orgánicas, que pueden ingresar al medio acuático por medio de las descargas de plantas industriales y de materia orgánica producto del tratamiento de aguas residuales, y recalca que son compuestos de alto riesgo para la salud pública, por ello se encuentra regulada su cantidad permisible en el agua

potable por el Decreto 1575, resolución 2115 de 2007, mencionando en el artículo 5 que los HPAs no deben sobrepasar la concentración de 0,01 mg/L en ningún acueducto del país. De esta manera decidió realizar el estudio de la concentración de hidrocarburos poliaromáticos en el Río Otún, antes y después de entrar en contacto con los afluentes de Dosquebradas, Pereira y el Parque Industrial, y posteriormente al tratamiento prestado por el acueducto.

Para la eliminación de este tipo de compuestos se han desarrollado varias técnicas de biorremediación, proponiendo el uso de organismos ligninolíticos como alternativa para la biotransformación de HPAs, en este sentido, Mayolo, Machín & Rito (2009) formulan el uso de *Agaricus bisporus*, un hongo de la pudrición blanca de la madera como fuente de enzima Lacasa para la oxidación de Benzo(a)Pireno, obteniendo el extracto crudo liofilizado y extracto parcialmente purificado de la composta residual del organismo, obteniendo como resultados del estudio, la oxidación del 45% de BaP en aproximadamente 120 horas de reacción, teniendo en cuenta que se trata de uno de los compuestos poliaromáticos de mayor complejidad, lo que dificulta su oxidación.

Rodríguez Sánchez (2010) en su tesis doctoral de la Universidad Complutense de Madrid, tiene como objeto la descripción de la capacidad de los hongos del género *Pleurotus* para degradar compuestos contaminantes y estudiar el papel de las enzimas lignolíticas en el proceso. Para ello emplea como modelos los compuestos 2,4 diclorofenol y benzo(a)pireno, a los que son sometidas las especies *P. eryngii*, *P. pulmonarius*, *P. ostreatus* y *P. sajor caju*, resultando desfavorable únicamente para la especie *P. sajor caju* la adición de 2,4-DCF en la síntesis enzimática, mientras que para *P. pulmonarius* se evidenció el incremento de la actividad tras la adición de BaP. También se diferenció la producción de 3 isoenzimas de lacasa producidas por la especie *P. eryngii*, siendo más eficiente en el proceso degradativo de 2,4 DCF la isoenzima 1, cabe resaltar que para los estudios con BaP se realizó previamente una prueba con ABTS detectándose igualmente mayor eficacia para la isoenzima 1. Finalmente se concluyó un efecto mayor de las enzimas sobre el compuesto 2,4-DCF por parte de *P. eryngii*, *P. pulmonarius* y *P. ostreatus*, y en menor medida transformando el BaP.

La producción de variadas isoformas de lacasas es evaluada por Vidal, Flores & Trejo (2009) para el Instituto de Biotecnología de la UNAM, en diferentes especies de los géneros *Agaricus*, *Pleurotus*, *Lentinula* y *Trametes* incluso infección de *Trichoderma sp*, con mayor

cantidad y versatilidad en la síntesis enzimática por parte de la interacción *Pleurotus-Trichoderma* y *Agaricus-Trichoderma*, demostrando finalmente un aumento en la generación de isoformas con basidiomiceto-*Trichoderma*.

Respecto a las variantes de lacasa, Gupta y Farinas (2010) del Instituto de Tecnología de New Jersey, analizan la biblioteca de isoformas del tipo CotA producida en la capa exterior de *Bacillus subtilis*, como elemento esencial para la biosíntesis del pigmento marón característico de las esporas, valorando además la especificidad del sustrato para las proteínas, encontrando que se estrecha a medida que son inmovilizadas por causa de la tolerancia de las esporas a extremos físicos. La investigación demostró que las esporas de *B. subtilis* pueden ser una plataforma útil para la producción de bibliotecas de proteína del tipo lacasa.

Por otra parte González y Falcón en 2008 para la universidad de La Laguna en España, estudian las propiedades de lacasa inmovilizada de la especie fúngica *Fusarium proliferatum*, demostrando la necesidad de un pH óptimo más básico con respecto a la enzima libre, pero aumentando la actividad con temperaturas de 70 °C (frente a 60° de la enzima libre) y manteniendo la estabilidad de la reacción en condiciones extremas de pH, además se mostró mayor afinidad con el sustrato e incremento de la velocidad máxima de la reacción con una eficiencia catalítica 38 veces superior, convirtiéndola de esta manera en un catalizador ideal para procesos industriales.

En cuanto a las aplicaciones adicionales de la enzima, uno de los estudios más extensos de actividad enzimática de lacasas en procesos de degradación es realizado por Jiménez y Penninx en 2003, sobre la biodegradación de colorantes, en donde se evalúa la producción enzimática positiva de 57 especies de hongos de la colección existente en la Universidad Católica de Lovaina y el Instituto de Higiene de Varsovia, Polonia, mediante el ensayo de decoloración en microplacas. De estas, 17 especies fueron seleccionadas por mostrar cambios en la coloración, para proceder a experimentar con la variación de la disponibilidad de fuentes de carbono y nitrógeno, condiciones de temperatura, pH, agitación y formas de crecimiento libre e inmovilizado, para favorecer la expresión de las enzimas ligninolíticas, entre ellas lacasa, identificada como responsable de la degradación de colorantes. Se muestra la potencialidad de los hongos de la podredumbre blanca de la madera para degradar colorantes recalcitrantes presentes en afluentes industriales, y se seleccionan 5 de las cepas con mejores cualidades, para su estudio cuidadoso con el fin de emplearlas óptimamente en procesos de biodegradación de colorantes y de igual manera que en

estudios mencionados anteriormente, la inmovilización de cepas permite apreciar la posibilidad de aplicación en procesos industriales.

De forma complementaria se evidencia el trabajo hecho en 2011 por Vinoth y otros en Tamil Nadu, India, quienes utilizaron un enfoque para la purificación de lacasa de *Pleurotus ostreatus* mediante partición trifásica (TPP), con el objetivo de evaluar la interacción de variables como la saturación de sulfato de amonio, la relación extracto crudo-terc-butanol y la temperatura, empleando la metodología de superficie de respuesta (RSM), como resultados obtuvieron un alto rendimiento en la purificación de la enzima, y la aplicación exitosa del procedimiento de RSM. El mismo grupo de investigadores usó posteriormente la partición de tres fases en la purificación de lacasa, para evaluar el desarrollo óptimo de la enzima en diferentes condiciones de crecimiento, para proceder a ser activada y empleada en la degradación de colorantes, con propiedades termoestables y rápidas de decoloración de tintes, demostrando potencial como un elemento biocatalizador en aplicaciones biotecnológicas industriales (Vinoth, Sathayaselvabala, Premkumar, Vidyadevi, & Sivanesan, 2011).

Con respecto a la partición trifásica, Tangarife (2016) para la Universidad Nacional de Colombia de Medellín, la aplicó en la purificación de lacasa a partir del extracto crudo de *Fusarium spp* con rendimientos cercanos al 115%, para proceder a la aplicación en materiales lignocelulósicos. La purificación permitió llegar a remover el 15% de lignina en el sustrato de raquis de palma.

Dussán Garzón et al. (2009) en su trabajo para la Universidad de Los Andes, mencionan la evaluación de las diferentes aplicaciones de lacasa sintetizada por el hongo *Trametes pubescens*, con empleo en la industria papelera, textil, nanotecnología, síntesis química y cosmética además de la biorremediación, reportando en esta última la particularidad sobre compuestos fenólicos, pero ampliando su rango de acción mediante el acople de moléculas transportadoras de electrones, pudiendo de esta manera actuar en la degradación de contaminantes orgánicos y demás compuestos clorofenólicos.

1.4.3. Marco Legal

A continuación se muestra una breve descripción de la normatividad colombiana vigente sobre contaminación hídrica con hidrocarburos aromáticos polinucleares, cabe resaltar que para

Colombia no existe legislación respecto a calidad de agua superficial, de tal manera que se adicionan normas extranjeras e internacionales que se relacionan con el tema.

Tabla 1. Normatividad Nacional e Internacional sobre HAPs en el Agua.

	NORMA	DESCRIPCIÓN
Constitución Política Colombiana	Título 2: De los derechos, las garantías y los deberes. Capítulo 3: De los derechos colectivos y del ambiente.	“Artículo 79: Todas las personas tienen derecho a gozar de un ambiente sano... Es deber del Estado proteger la diversidad e integridad del ambiente, conservar las áreas de especial importancia ecológica y fomentar la educación para el logro de estos fines.” “Artículo 80: El Estado planificará el manejo y aprovechamiento de los recursos naturales, para garantizar su desarrollo sostenible, su conservación, restauración o sustitución. Además, deberá prevenir y controlar los factores de deterioro ambiental, imponer las sanciones legales y exigir la reparación de los daños causados”
Ley 99 de		“Por la cual se crea el Ministerio del Medio Ambiente, se reordena el Sector Público encargado de la gestión y conservación del medio ambiente y los recursos naturales renovables, se organiza el Sistema Nacional Ambiental, SINA, y se dictan otras disposiciones.”
Decreto-ley 2811 de 1974	“Por el cual se dicta el Código Nacional de Recursos Naturales Renovables y de Protección al Medio Ambiente.”	“Libro Segundo: De la propiedad, uso e influencia ambiental de los recursos naturales renovables.” “Parte III: De las Aguas No Marítimas.” “Título VI: Del uso, conservación y preservación de las aguas.” “Capítulo II: De prevención y Control de la contaminación.” “Artículo 137: Serán objeto de prevención y control especial: A) Las aguas destinadas al consumo doméstico humano y animal y a la producción de alimentos... Se prohibirá o condicionará, según estudios técnicos, la descarga de aguas negras o desechos sólidos, líquidos o gaseosos, provenientes de fuentes industriales o domésticas.”

<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">Decreto 1594 de 1984</p>	<p>“Por el cual se reglamenta parcialmente los usos del agua y residuos líquidos.”</p>	<p>“Artículo 20: Considérense sustancias de interés ambiental las siguientes... Etanos Clorados: Hidrocarburos aromáticos polinucleares: benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, 3,4 benzo fluoranteno, benzo(k) fluoranteno, criseno, acenaftileno, antraceno, benzo (g,h,i) perileno, fluoreno, fenantreno, dibenzo(a, h)antraceno, indeno(1,2,3-cd)pireno, pireno, tetracloroetileno, tolueno, tricloroetileno, cloroetileno.”</p>
<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">Decreto 3930 de 2010</p>	<p>“Por la cual se reglamentan usos del agua y residuos líquidos y se dictan otras disposiciones.”</p>	<p>“Artículo 9: Para los efectos del presente decreto se tendrán en cuenta los siguientes usos del agua: 1) Consumo humano y doméstico... 3) Agrícola... 4) Pecuario... 6) Industrial...” “Capítulo V: De los criterios de calidad para la destinación del recurso.” “Capítulo VI: De los vertimientos. Artículo 24: Prohibiciones... Artículo 27: De la reinyección de residuos líquidos... Artículo 40: Control de contaminación por Agroquímicos.”</p>
<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">Resolución 2115 de 2007</p>	<p>“Por medio de la cual se señalan características, instrumentos básicos... para la calidad del agua para consumo humano.”</p>	<p>“Artículo 5: Características químicas de sustancias que tienen reconocido efecto adverso en la salud humana. Las características químicas del agua para consumo humano de los elementos, compuestos químicos y mezclas de compuestos químicos diferentes a los plaguicidas y otras sustancias que al sobrepasar los valores máximos aceptables tienen reconocido efecto adverso en la salud humana, deben enmarcarse dentro de los valores máximos aceptables que se señalan a continuación: ... Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP), valor máximo aceptable 0.01 mg/L”</p>

Resolución 631 de 2015	<p>“Por la cual se establecen los parámetros y los valores máximos permisibles en los vertimientos puntuales a cuerpos de aguas superficiales y a los sistemas de alcantarillado público”</p>	<p>“Capítulo V: Parámetros físico-químicos y sus valores máximos permisibles en los vertimientos puntuales de aguas residuales domésticas y no domésticas (ARD y ARnD) de los prestadores de servicio público de alcantarillado a cuerpos de agua superficiales.”</p> <p>“Capítulo VI:...vertimientos puntuales de ARnD...” “Artículo 8: Parágrafo: En los casos en que el vertimiento puntual de aguas residuales se realice en un cuerpo de agua superficial receptor o en un tramo del mismo, que tenga como destinación el uso de agua para consumo humano y doméstico, y pecuario la concentración de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) en el vertimiento puntual de aguas residuales deberá ser menor o igual a 0.01 mg/L para aquellas actividades que lo tienen definido como análisis y reporte.”</p>
OMS 2006	<p>“Guías para la calidad del agua potable.”</p>	<p>“Valor de referencia para el Benzo(a)pireno (BaP): 0.0007 mg/L (0.7 µg/L).” “...se recomendó que el control de los HAP en el agua de consumo se basara en la idea de que no deben superarse las concentraciones presentes en las aguas subterráneas sin contaminar... También se recomendó abandonar el uso de materiales con alquitrán y otros similares para los revestimientos de tuberías y los recubrimientos de depósitos de agua.”</p>
Ecuador 2014	<p>“Norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes: Recurso Agua.”</p>	<p>“Numeral 5.2.7. Parámetros de monitoreo de las descargas industriales de importancia.” “Tabla 12: Parámetros de monitoreo de las descargas industriales... Extracción de petróleo y gas natural, Servicios relacionados con la extracción de petróleo y gas, excepto actividades de prospección: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP).”</p>

Perú: Decreto supremo N° 015	<p>“Modifican los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua y establecen disposiciones complementarias para su aplicación.”</p>	<p>“Tabla N° 01. Parámetros y Valores Consolidados, Categoría 1A:... BTEX: Hidrocarburos Aromáticos: para aguas que pueden ser potabilizadas con desinfección Benzo(a)pireno: 0.0007 mg/L, para aguas que pueden ser potabilizadas con tratamiento convencional Benzo(a)pireno: 0.0007 mg/L. Categoría 4:... BTEX: Hidrocarburos Aromáticos: Lagunas y Lagos, Ríos y Ecosistemas Marino-costeras Benzo(a)pireno: 0.0001 mg/L, Antraceno: 0.0004 mg/L, Fluoranteno: 0.001 mg/L. ”</p>
EPA 440 1986	<p>“Criterios de calidad para el agua, regulaciones y estándares”</p>	<p>“Hidrocarburos Aromáticos Polinucleares:... la toxicidad aguda para la vida acuática marina ocurre a concentraciones tan bajas como 300 µg/L, y puede ocurrir a concentraciones más bajas entre especies que son más sensibles... Salud Humana:... los niveles que pueden resultar en un incremento del riesgo de cáncer son estimados en 10^{-5}, 10^{-6} y 10^{-7}. Los criterios correspondientes recomendados son 28 ng/L, 2.8 ng/L y 0.28 ng/L respectivamente.”</p>
EPA 2009	<p>“Regulaciones Nacionales de Agua Potable Primaria.”</p>	<p>“Benzo(a)pireno (PAHs). Nivel máximo de contaminante en el agua potable (MCL): 0.0002 mg/L. Posibles efectos sobre la salud de la exposición a largo plazo por encima del MCL: dificultades reproductivas, incrementa el riesgo de cáncer. Fuentes comunes del contaminante en agua potable: lixiviación de revestimientos de tanques de almacenamiento de agua y líneas de distribución. Objetivo de salud pública: cero mg/L.”</p>
EPA 2015	<p>“Criterios nacionales de calidad del agua recomendados - Tabla de criterios de salud humana”</p>	<p>“Estos criterios se basan en la carcinogenicidad del riesgo 10-6. Los niveles de riesgo alternos se pueden obtener moviendo el punto decimal. Antraceno 300 µg/L, benzo(a)antraceno 0.0012 µg/L, benzo(a)pireno 0.0012 µg/L, benzo(b)fluoranteno 0.0012 µg/L, benzo(k)fluoranteno 0.012 µg/L, criseno 0.12 µg/L, fluoreno 50 µg/L, dibenzo(a, h) antraceno 0.00012 µg/L, indeno(1, 2, 3-cd)pireno 0.0012 µg/L, pireno 20 µg/L, tetracloroetileno 10 µg/L.”</p>

U.E. Directiva 2008/105/CE

“Relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas”

“Normas de calidad ambiental para sustancias prioritarias y para otros contaminantes. Concentración Máxima Admisible en Aguas Superficiales Continentales y Concentración Máxima Admisible en Otras Aguas Superficiales para Benzo(a)pireno: 0.1 µg/L”

“Lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas. Identificadas como sustancias peligrosas prioritarias: Benzo(a)pireno, Benzo(b)fluoranteno, Benzo(g,h,i)perileno, Benzo(k)fluoranteno, Indeno(1,2,3-cd)pireno.”

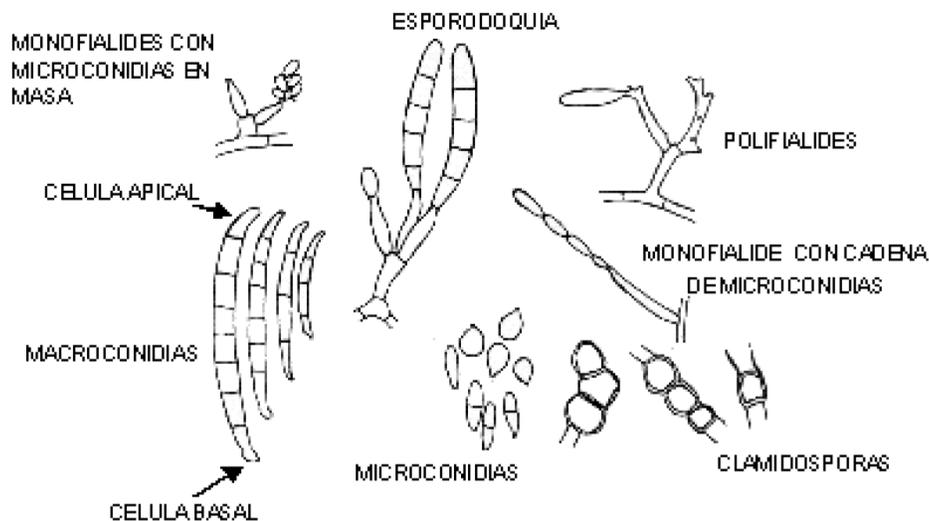
CAPÍTULO 2: Caracterización de especies.

2.1. *Fusarium spp.*

El género *Fusarium* es un grupo de hongos filamentosos, habitualmente saprófitos del suelo que se relacionan con materia orgánica en descomposición e insectos, y gracias a su amplia capacidad de crecimiento en un número variado de sustratos poseen distribución universal, además de ser de gran importancia económica por categorizarse como fitopatógenos, asociados a enfermedades agrícolas y hortícolas. Debido a la posibilidad de colonizar diversos nichos ecológicos, existen especies en este género con una marcada variabilidad en cuanto a su fisiología y morfología. (Caudillo Pérez & Hernández Monjaraz, 2015; Monzón y Rodríguez Tudela, 1997).

Habitualmente las especies de *Fusarium* crecen rápidamente en agar papa dextrosa (PDA) a 25°C, logrando diámetros entre 8 y 9 cm en una semana, con características macroscópicas como micelio algodonoso de color blanquecino o incoloro al inicio del crecimiento, y una posterior maduración que puede variar el color a crema, amarillo, rosa, rojizo o púrpura. (Monzón & Rodríguez Tudela, 1997; Valencia Guerrero, 2009).

Figura 1. Estructuras Microscópicas del Género *Fusarium*.*



*No todas las especies de *Fusarium* producen todas las estructuras microscópicas, se encuentran ligadas a las condiciones estándar de crecimiento y el tipo de sustrato (Monzón & Rodríguez Tudela, 1997).

Las características de identificación microscópica se enmarcan en la presencia de micelio septado hialino con 3 tipos de esporas asexuales (Figura 1.): Las microconidias de mayor frecuencia entre las especies, están formadas por una o dos células que crecen en el micelio aéreo y se pueden presentar solas o en cadenas. Las macroconidias son típicas en el género, su forma particular está compuesta por tres a cinco células que se adelgazan y encorvan hacia los extremos y se ensanchan en el centro, son producidas y sostenidas en masas de fiálides cortas que se denominan esporodoquios. Las clamidosporas se componen por una o dos células que tienen en conjunto forma redonda, son de pared gruesa con alto contenido de lípido, lo que permite una mayor supervivencia en condiciones adversas. (Valencia Guerrero, 2009).

Al tratarse de la clasificación taxonómica, los autores han clasificado a este género en diferentes clases, órdenes y familias, coincidiendo en las que se mencionan en la Tabla 2.

Tabla 2. Clasificación Taxonómica del Género *Fusarium*.*

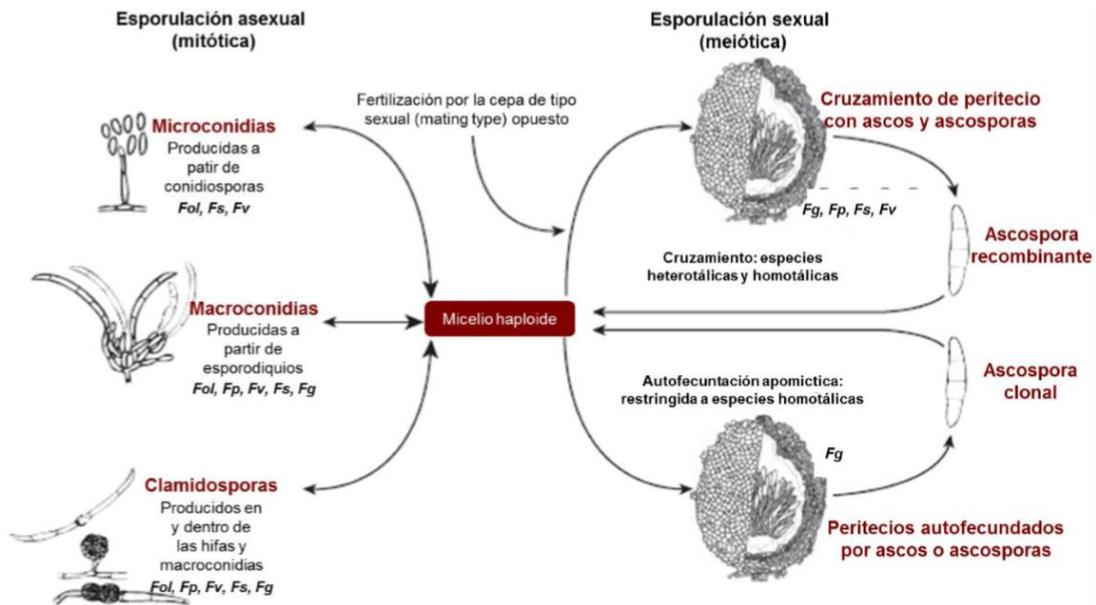
Dominio	<i>Eukaryota</i>
Clado	<i>Ophisthokonta</i>
Reino	<i>Fungi</i>
Subreino	<i>Dikarya</i>
Filo	<i>Ascomycota</i>
Subdivisión	<i>Pezizomycotina</i>
Clase	<i>Sordariomycetes – Deuteromycete – Hyphomycetos</i>
Subclase	<i>Hypocreomycetidae</i>
Orden	<i>Hypocreales – Tuberculariae *</i>
Familia	<i>Nectriaceae - Hypocreaceae</i>
Género	<i>Fusarium</i>

*Fuente: Caudillo Pérez & Hernández Monjaraz, (2015); Monzón & Rodríguez Tudela (1997); Tangarife Morales (2016); Valencia Guerrero (2009).

Con respecto al ciclo de vida, *Fusarium* posee capacidad de reproducción asexual y sexual (Figura 2.). El primer caso funciona con la formación de nuevas células (conidios) mediante mitosis, posterior a un proceso de replicación del material genético; en el segundo caso es necesario que exista apareamiento de dos células compatibles sexualmente, que pueden provenir de cepas

auto estériles (reproducción heterotálica) o de cepas auto fértiles (reproducción homotálica) (Caudillo Pérez & Hernández Monjaraz, 2015). Es importante mencionar que solo se cuenta con micelios de tipo haploide, sin embargo predomina la reproducción asexual (Tangarife Morales, 2016).

Figura 2. Ciclo de vida de *Fusarium*.*



*Los mohos de esta especie crecen en colonias hifales haploides, producen esporas haploides (ascosporas), tienen dos tipos de reproducción pero la sexual ha sido poco estudiada. Abreviaciones: Fg: *F. graminearum*, Fol: *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici*, Fp: *F. pseudograminearum*, Fs: *F. solani* f. sp. *pisi*, Fv: *F. verticillioides* (Por Li-Jun, 2013 en (Caudillo Pérez & Hernández Monjaraz, 2015)).

2.2. *Bacillus* spp.

Bacillus es un género bacteriano que incluye más de 60 especies de microorganismos quimioheterótrofos, con forma de bacilos Gram positivos esporulados, que pueden ser anaerobios o aeróbios facultativos y normalmente móviles al estar rodeados de flagelos peritricos; el tamaño de las células bacilares varía entre 0.5 - 2.5 μm de ancho y 1.2 - 10 μm de largo (Cuervo Lozada, 2010).

Estos microorganismos son ubicuos en el suelo donde cumplen un papel importante para los ciclos de carbono y nitrógeno, también se encuentran comúnmente en plantas, heces de

animales domésticos, aguas frescas y sedimentos de aguas estancadas. Es posible considerarlos como una alternativa de agentes de control biológico, debido a que proporcionan un sistema de resistencia inducida en plantas actuando como defensa contra patógenos, además de ser promotores de crecimiento vegetal. (Castañeda Álvarez & Sánchez, 2016; Cuervo Lozada, 2010).

Como se mencionó previamente el género *Bacillus* es productor de esporas, resistentes a la desecación y a factores ambientales como temperatura, radiación UV, solventes orgánicos, pH, y salinidad. Las formas esporuladas se clasifican según la ubicación dentro de la célula, pueden ser centrales, subterminales o terminales; tienen la capacidad de permanecer en etapa de latencia por tiempo prolongado hasta que las condiciones ambientales resulten óptimas para la germinación y el inicio de su actividad metabólica. Además, después de la germinación, poseen gran adaptabilidad frente a diversos hábitats con variación de condiciones externas, gracias a la producción de una amplia gama de sustancias de tipo enzimático y antibiótico, destacando enzimas proteolíticas durante su crecimiento y esporulación, e hidrolíticas degradadoras de polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos. (Benavides Rodríguez & Hermida Silva, 2008; Zaragoza Carmona, 2011).

Tabla 3. Clasificación Taxonómica del Género *Bacillus*.*

Dominio	<i>Bacteria</i>
Reino	<i>Prokaryotae</i>
Filo	<i>Firmicutes</i>
División	<i>Protophyta</i>
Clase	<i>Schizomycetes</i>
Orden	<i>Eubacteriales</i>
Familia	<i>Bacilliaceae</i>
Género	<i>Bacillus</i>

*La clasificación taxonómica se especifica en la 7ª edición del Manual de Bergey (1957).

La mayoría de las especies del género crecen en medios sintéticos que tienen como única fuente de carbono azúcares, ácidos orgánicos o alcoholes; la temperatura óptima de crecimiento en algunos casos de 30-45°C (mesófilos), en otros de 65°C (termófilos) y en otros de 0°C (psicrófilos). Otras características morfológicas en *Bacillus spp.* varían en el aspecto de las colonias, que puede ser liso, mucoso, rugoso o vidrio esmerilado, y los bordes de tipo ondulado

o extendido en el medio de cultivo. (Benavides Rodríguez & Hermida Silva, 2008; Zaragoza Carmona, 2011). Es por esto que para facilitar la diferenciación de especies se evalúa la fermentación de lactosa, manitol, sorbitol, melobiosis, hidrólisis de la úrea y descarboxilación de la lisina (Cuervo Lozada, 2010). En la Tabla 3 se encuentra la clasificación taxonómica recopilada para el género en cuestión.

Con relación al ciclo de vida algunos autores varían en la duración de las etapas de crecimiento del género, a continuación se encuentran los tiempos promedio para algunos de ellos (Tabla 4).

Tabla 4. Fases de crecimiento para *Bacillus spp.*

FASE	Carrera Cabezas (2009)	Zúñiga Bravo (2009)	Zaragoza Carmona (2010)
Latencia	0 horas	0-1.5 horas	0-2 horas
Exponencial	2-30 horas	3-10.5 horas	2-20 horas
Estacionaria	32-176 horas	10.5-24 horas	24-28 horas
Muerte	176 horas	>25 horas	30-48 horas

2.3. Metodología

2.3.1. Recolección de ejemplares

Se tomaron muestras ambientales de diferentes espacios y elementos contaminados, para aumentar las posibilidades de aislar los microorganismos de interés. Inicialmente para la recolección de mohos, la muestra de ambiente fue tomada en un espacio público, manteniendo abierta por 5 segundos una caja Petri con agar PDA mientras se hacía un recorrido longitudinal, dejando la muestra en incubación a temperatura ambiente durante una semana. Para la muestra bacteriana se utilizó estiércol fresco de bovino (Larraea Izurieta, Falconí Borja, & Arcos Andrade, 2015) preparando una solución con 10 g en 50 ml de agua destilada, la preparación fue sembrada por la técnica de agotamiento en agar nutritivo e incubada a 36°C por 24 horas.

2.3.2. Aislamiento de microorganismos

Con base en las características morfológicas macroscópicas observadas, fueron presuntivamente seleccionadas las colonias para purificarlas. En el caso de la muestra micológica, se valoraron características macroscópicas como color, textura, producción de pigmento y apariencia, se utilizó agar rosa de bengala y se realizó siembra con la técnica de punción central (Rozo Torres, 2015), dejando en incubación a temperatura ambiente por una semana; simultáneamente se sembraron cajas con agar PDA y se monitorearon durante 12 días para puntualizar en sus características de crecimiento, con la realización de montajes húmedos usando como colorante azul de lactofenol. Las colonias bacterianas se seleccionaron por criterios de color, superficie, brillo, tamaño y consistencia, fueron sembradas en agar nutritivo por agotamiento con incubación a 36°C por 24 horas, para después realizar tinción de Gram como la describe Rodríguez Cavallini, Gamboa Coronado, Hernández Chavarría, & García Hidalgo (2005).

2.3.3. Identificación de géneros microbianos

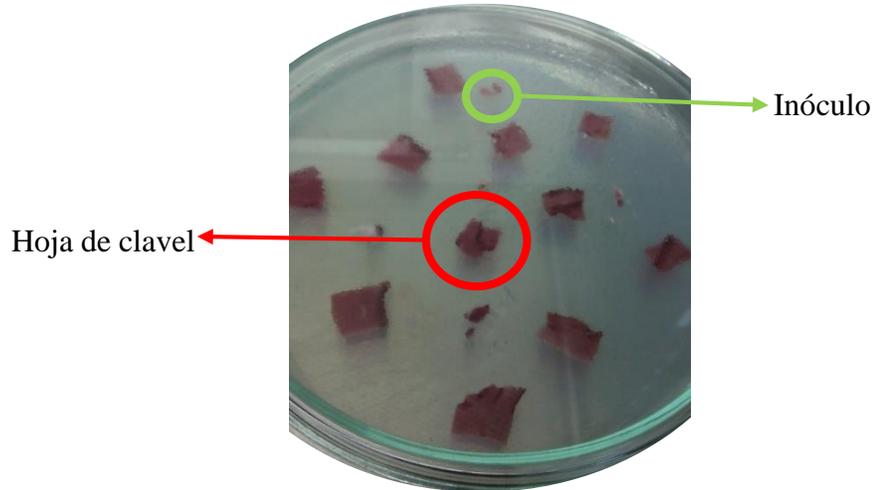
2.3.3.1. Género *Fusarium*

En lo concerniente a los mohos se llevó a cabo la preparación de agar clavel (CLA³), un medio de cultivo específico para inducir el desarrollo de esporas de *Fusarium spp.*, a partir de hojas de clavel que no hubiesen estado sometidas a pesticidas, cortándolas en trozos de 10 mm² previniendo que con el tratamiento posterior su tamaño disminuyera, se colocaron dentro de bolsas de aluminio en un horno de secado a 40°C por 2 horas, luego se esterilizaron en autoclave a 121°C y 21 psi por 15 minutos; simultáneamente se elaboró agar al 20%, disolviendo 20g de Agar-Agar en 100 ml de agua destilada, aumentando la temperatura hasta ebullición, se esterilizó en autoclave y se dejó enfriar a 45°C para servirlo, cuando estuvo solidificado se colocaron 11 fragmentos de hoja de clavel por caja de Petri de 11 cm de diámetro, manteniendo entre sí una distancia uniforme (Figura 3) (Fimbres López, 2010; ICA, 2009; Ministerio de Agricultura de Chile, 2009; Pérez Vicente, Batlle, & Martínez, 2014). El hongo fue sembrado por punción haciendo cinco inóculos por cada caja, que quedaran separados de las hojas, y se incubó durante seis días a temperatura

³ Conocido como Agar Hojas de Clavel o Carnation Leaf Agar (CLA)

ambiente, para llegar a evidenciar las macroconidias en el microscopio usando los objetivos 40X, en un montaje fresco teñido con hidróxido de potasio al 40% y con azul de lactofenol.

*Figura 3. Montaje de agar clavel para Fusarium sp.**

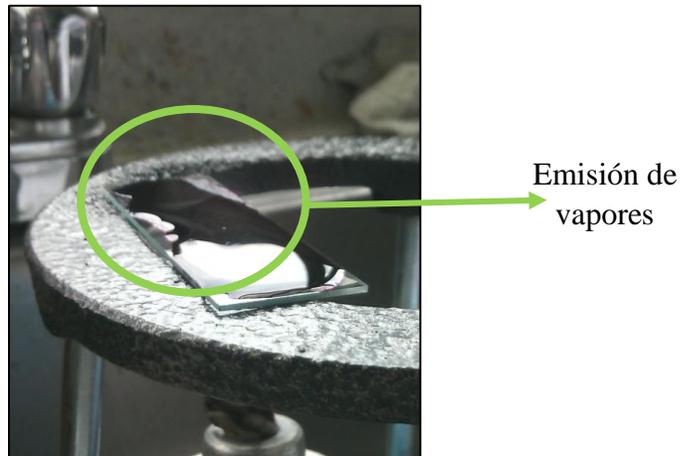


*Fuente: Autor.

2.3.3.2. Género *Bacillus*

A partir del crecimiento en placa, para el género bacteriano se llevaron a cabo varias pruebas, la primera de ellas fue la tinción de Schaeffer y Fulton descrita por Rodríguez Cavallini, Gamboa Coronado, Hernández Chavarría, & García Hidalgo (2005), para ella se hizo un extendido de la colonia a evaluar, se esperó a que seicara y se fijó a la lámina con la llama de un mechero, posteriormente la lámina se cubrió en su totalidad con verde malaquita y fue sometida al calor de la llama por la parte inferior durante 10 minutos a distancia considerable, fue necesario esperar la producción de vapores sin que la preparación entrara en ebullición o desecación; la lámina se dejó enfriar y se enjuagó con agua del grifo, para proceder a cubrirla con safranina por 30 segundos y enjuagar nuevamente (Rodríguez Cavallini, Gamboa Coronado, Hernández Chavarría, & García Hidalgo, 2005) (Figura 4). El montaje fue observado al microscopio con el objetivo 100X, utilizando aceite de inmersión.

Figura 4. Tinción de Shaeffer y Fulton para esporas de *Bacillus sp.**



*Fuente: Autor.

La segunda prueba realizada fue la de lecitinasas, con la preparación de medio de cultivo MYA⁴ utilizando 3.58 g de agar base Mossel para *Bacillus cereus*, disolviendolos en 75 ml de agua destilada por calentamiento hasta ebullición, la preparación se esterilizó y se dejó enfriar a 45°C para incorporar 8.3 ml de emulsión de yema de huevo 50% (4.15 ml de yema, 4.15 ml de solución salina) en condiciones asépticas, se mezcló y se sirvió en cajas de Petri; la siembra fue hecha por agotamiento para incubación a 36°C por 24 horas. (Pascual Anderson & Calderón y Pascual, 2000; MicroKit, 2015).

Como tercer prueba se hizo la de hidrólisis del almidón para la detección de la enzima amilasa, en este caso se fundieron 1.75 g de agar nutritivo en 75 ml de agua, con posterior adición de 1.5 g de almidón soluble, el medio de cultivo fue esterilizado, enfriado a 45°C y sembrado con la cepa de interés por la técnica de agotamiento; la incubación duró 24 horas a 36°C, para proceder a revelar el resultado haciendo un baño del cultivo completo con lugol revelando de esta forma el resultado de la prueba para amilasa (Rodríguez Cavallini, Gamboa Coronado, Hernández Chavarría, & García Hidalgo , 2005).

La cuarta fue la prueba de plasma para coagulasa, realizada en este caso en un tubo con EDTA⁵ al cual se le adicionaron 5 ml de sangre humana, que se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos para separar el plasma del fluido, posteriormente el plasma se trasladó a un tubo de

⁴ Agar manitol yema de huevo, Mannitol-Egg Yolk Agar (MYA).

⁵ Ácido Etilendiaminotetracético usado en este caso como anticoagulante.

ensayo estéril y se inoculó con la cepa bacteriana usando un asa redonda y homogenizando la preparación; seguidamente la incubación duró 24 horas, revisando cada 4 horas el resultado de la prueba con la formación de coágulos en el tubo (Pro-Lab-Diagnostics, 2013; Universidad Central de Venezuela, 2009).

En seguida la quinta prueba fue la de catalasa, realizada en una lámina portaobjetos previamente desinfectada con alcohol, en la cual se colocó un fragmento de colonia pura y fresca (18-24 horas) con ayuda de un asa recta, inmediatamente se añadió una gota de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3% para completar la reacción de conversión de H_2O_2 en agua y oxígeno gaseoso (McFaddin, 2000).

Como sexta prueba se hizo la de hemólisis en agar sangre al 5%, partiendo de 50 ml de agar nutritivo previamente esterilizado y enfriado a $45^{\circ}C$, al cual se adicionaron 5 ml de sangre humana en condiciones estériles, la siembra se realizó por agotamiento para una posterior incubación a $36^{\circ}C$ por 24 horas (Laboratorios Britania S.A., 2001).

Como séptima y última prueba se hizo el montaje del sistema de identificación bioquímica para Gram positivos BBL™ Crystal™ (Figura 5.).

Figura 5. BBL™ Crystal™ para Gram positivos.*



*Por cada montaje el sistema Crystal™ proporciona un tubo de suspensión para inóculos (a), una base con 30 pocillos para depositar el inóculo (b), una tapa con los reactivos respectivos

para cada prueba (c), una bandeja de incubación individual para evitar que se consuma la cantidad de muestra y una hoja de registro que debe ser llenada por el investigador para obtener el código correspondiente (d). Fuente: Becton Dickinson BD Brasil (2017).

Se inició con la preparación de la suspensión, usando un escobillón de algodón estéril para recoger la cantidad de colonia necesaria, de manera que al sumergirlo en la solución y agitarlo alcanzara un nivel de turbidez cercano a 5 en la escala de McFarland (Figura 6.). La solución se depositó en los pocillos provistos y se homogenizó el contenido dentro de todas las cavidades con movimientos leves de agitación, se colocó la tapa alineándola correctamente y presionándola en cada extremo de forma simultánea. Para la incubación el montaje se giró y se ubicó sobre la bandeja que contenía agua destilada, manteniéndolo a temperatura de 36°C por 24 horas, para proceder a su lectura teniendo como referencia los parámetros descritos en el manual de uso. (Winkler, 2014).

*Figura 6. Patrones de la Escala de McFarland.**



*De uno a cinco, de derecha a izquierda los patrones de la escala. Fuente: Mesdía Co (2011).

2.4. Resultados y Análisis

2.4.1. *Fusarium sp.*

2.4.1.1. *Aislamiento y monitoreo del crecimiento micelial*

El montaje de hongo micelial posee características macroscópicas particulares del género, como el color, la textura algodonosa, producción de pigmento y crecimiento abundante en una

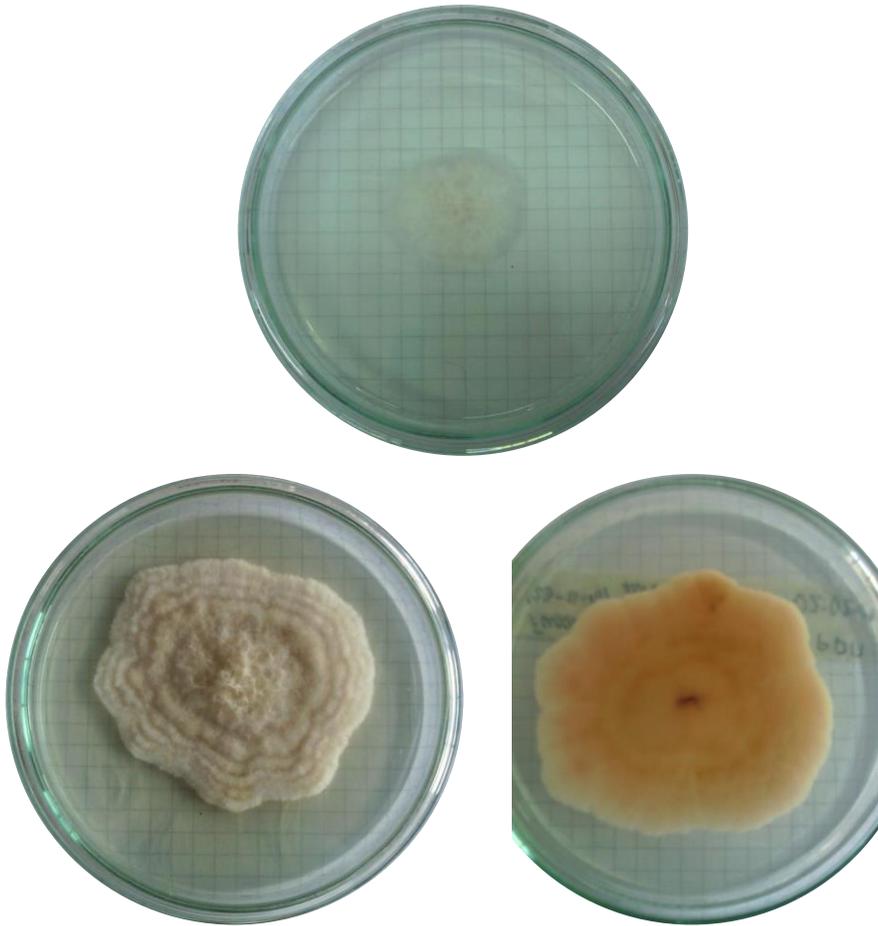
semana, en la Tabla 5 se describen detalladamente los criterios observados en el medio de cultivo PDA.

*Tabla 5. Descripción del monitoreo de Fusarium sp en agar PDA.**

<i>Fusarium sp.</i>	Fecha de siembra:	Febrero 2 de 2017 (Figura 7.)
FECHA	DESCRIPCIÓN	
Febrero 6 de 2017 Edad: 4 días	Diámetro de crecimiento:	3.5 cm
	Exudado:	Si presenta, incoloro
	Color:	Blanco
	Textura:	Algodonosa
	Borde:	Irregular
	Pigmento:	Rosa claro
Febrero 10 de 2017 Edad: 8 días	Diámetro de crecimiento:	5.5 cm
	Exudado:	No presenta
	Color:	Blanco, crema hacia el centro
	Textura:	Algodonosa
	Borde:	Irregular
	Pigmento:	Rosa champaña, centro marrón
Febrero 14 de 2017 Edad: 12 días	Diámetro de crecimiento:	6.5 cm
	Exudado:	No presenta
	Color:	Crema, más oscuro en el centro
	Textura:	Algodonosa
	Borde:	Irregular con varias capas
	Pigmento:	Rosa champaña, centro marrón

Fuente: Autor.

Figura 7. Crecimiento de *Fusarium A.**

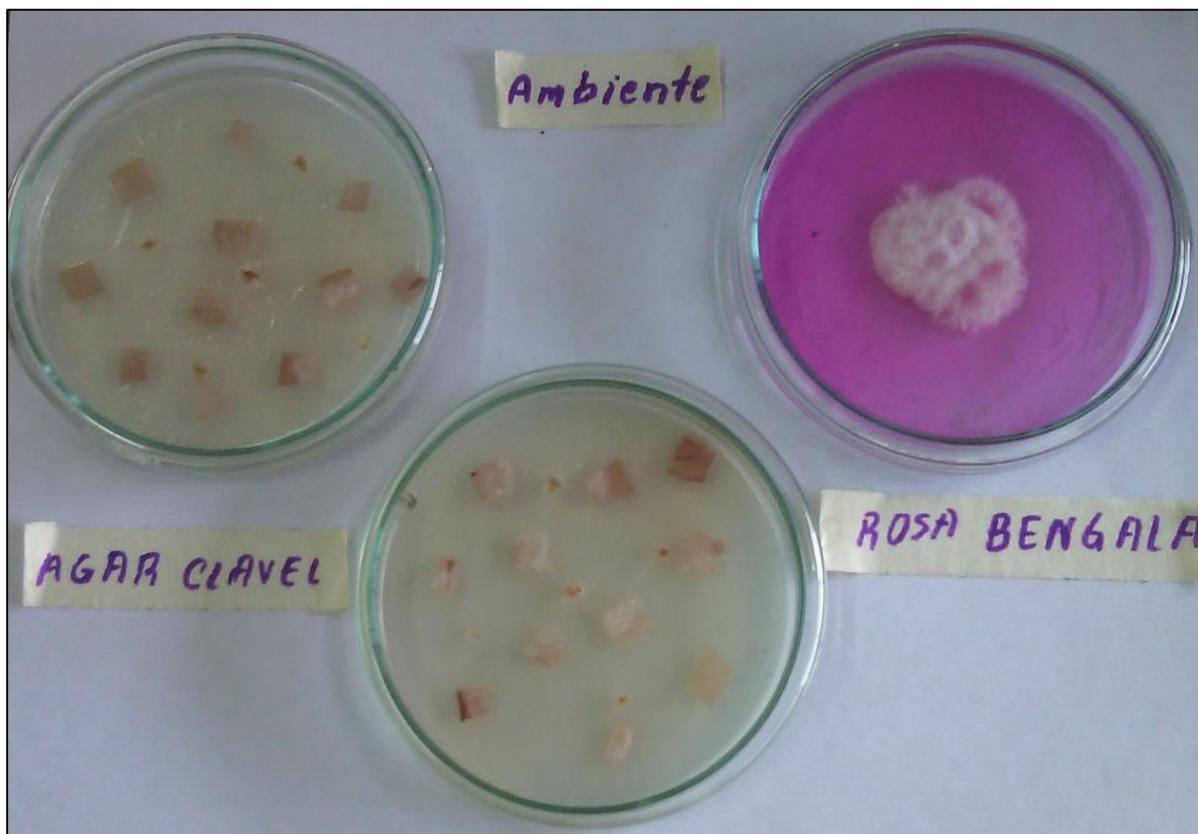


*Día 4 parte superior, día 12 con vista frontal a la izquierda inferior, día 12 vista posterior a la derecha inferior. Fuente: Autor.

2.4.1.2. Identificación del género microbiano

Respecto a la continuación de caracterización macroscópica del moho de interés, se muestra en las figuras siguientes el desarrollo del mismo en agar clavel y rosa de bengala (Figura 8.), apreciado en el día de número seis y evidenciando crecimiento sobre las hojas de clavel y en los puntos de siembra, sin expandirse a la totalidad del agar. Adicionalmente la identificación microscópica a partir de los montajes húmedos observados en el microscopio con el objetivo 40X, en la cual se evidencian las distintas estructuras diferenciales del género, que se manifiestan de forma más clara con el aumento de la edad del hongo (Tabla 6.).

Figura 8. Crecimiento de *Fusarium* sp. en Agar Clavel y Rosa de Bengala.*

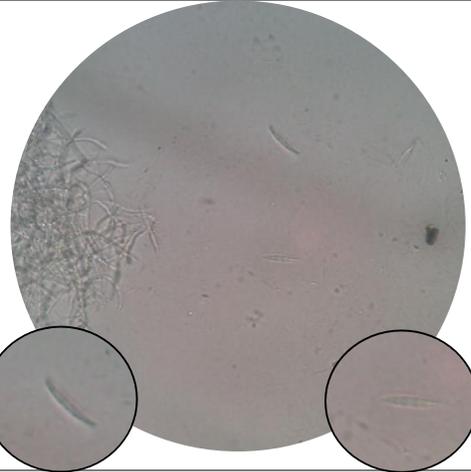
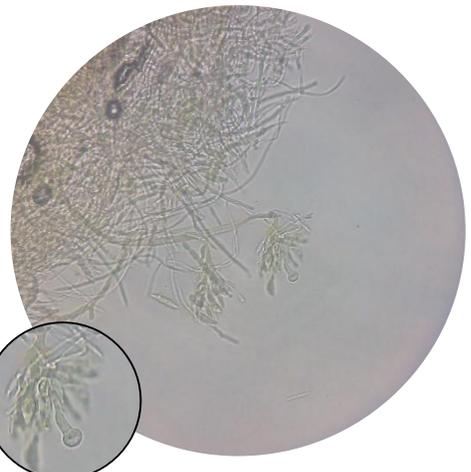


*Izquierda y centro: agar clavel con crecimiento de micelio únicamente en los fragmentos de hoja y en los puntos de siembra, derecha: siembra en agar rosa de bengala con diámetro de 3.6 cm, los cultivos tenían seis días de edad. Fuente: Autor.

Los montajes húmedos tuvieron mayor especificidad en el día 18 partiendo del agar clavel, que como se mencionó en el numeral 2.3.3.1 permite la formación de estructuras características del género *Fusarium*. De forma complementaria la presencia de macroconidias con tamaño y forma variable (macro y mesoconidias) se debe a las condiciones de crecimiento como temperatura y humedad, teniendo en cuenta que la incubación se realizó en un estante expuesto a las variaciones ambientales. En este sentido, para obtener estructuras de forma y tamaño uniforme, es necesario mantener el cultivo en condiciones estándar, sin embargo la forma de la macroconidia en media luna extraída de agar clavel es un carácter fiable, dejando de lado los factores como la longitud y anchura de las mismas, que son considerados secundarios para la identificación de especies dentro del género. Las clamidosporas también son caracteres importantes en la taxonomía del género,

pudiendo formarse por separado o en cadenas con paredes gruesas, rugosas o lisas, que para el caso se especifican mejor en la observación del día 13.

Tabla 6. Descripción microscópica de *Fusarium sp.*

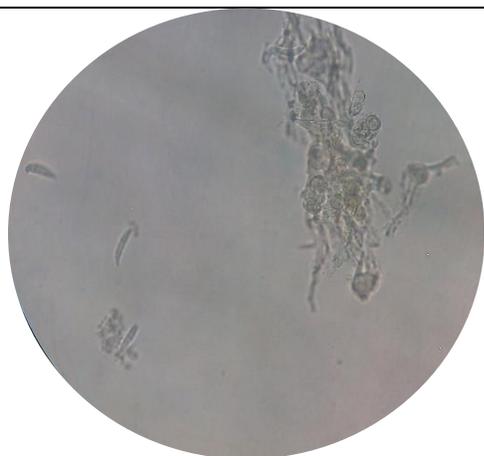
	<p>Medio de cultivo: Agar Rosa de Bengala.</p> <p>Edad de la colonia: 6 días.</p>
	<p>Medio de cultivo: Agar Rosa de Bengala.</p> <p>Edad de la colonia: 6 días.</p>
	<p>Medio de cultivo: Agar Clavel.</p> <p>Edad de la colonia: 13 días.</p>

Observaciones: A la izquierda hifas hialinas no septadas, en el centro una macroconidia sin visualizarse las células divisorias.

Observaciones: Se visualizan dos macroconidias, aglomeración de monofiálides hacia la izquierda.

Observaciones: Al centro esporoquias con macroconidia saliente y una clamidospora, hifas hialinas no septadas en la parte izquierda superior, monofiálides.

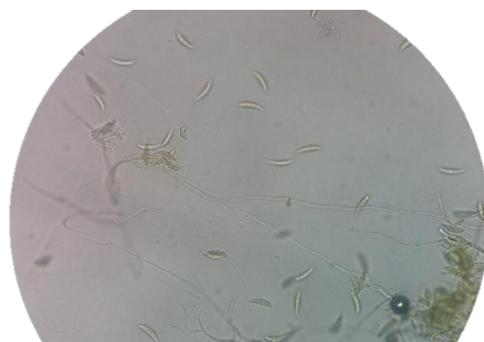
*Continuación Tabla 6. Descripción microscópica de Fusarium sp.**



Medio de cultivo: **Agar Clavel.**

Edad de la colonia: 13 días.

Observaciones: Clamidosporas hacia la derecha superior, dos macroconidias en la parte izquierda central.



Medio de cultivo: **Agar Clavel.**

Edad de la colonia: 13 días.

Observaciones: Parte inferior derecha clamidosporas, aumenta la cantidad de macroconidias evidenciadas en el resto del campo, se ven hifas hialinas.



Medio de cultivo: **Agar Papa Dextrosa.**

Edad de la colonia: 8 días

Observaciones: Teñido con azul de lactofenol, se observan en la parte inferior hifas hialinas no septadas y en el resto macroconidias de menor tamaño que las presentadas en observaciones anteriores.

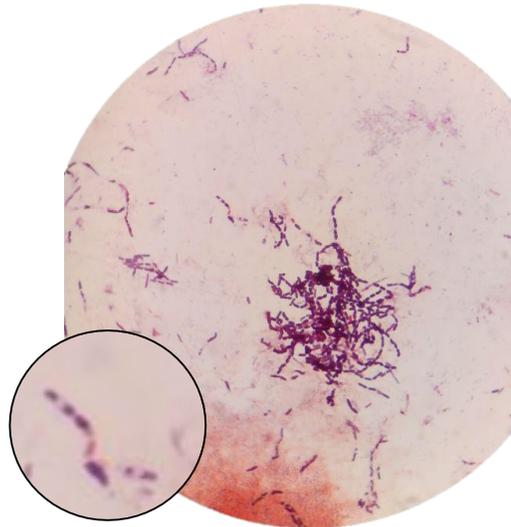
Fuente: Autor.

2.4.2. *Bacillus sp.*

2.4.1.1. Aislamiento y monitoreo del crecimiento bacteriano

Según el ciclo de crecimiento especificado en el numeral 2.2., los autores coinciden en la fase estacionaria hacia las 24 horas, a partir de las cuales se detiene la duplicación celular propia de la fase exponencial, inicia el periodo de tiempo en el que el aumento o disminución de células no es detectable y favorablemente se registran mayores concentraciones de productos metabólicos (Unidad III: Taxonomía y Crecimiento Bacteriano, 2014). Por esta razón se monitoreó el crecimiento únicamente a las 24 horas posteriores al aislamiento, a continuación se muestran las características macroscópicas y microscópicas de las colonias.

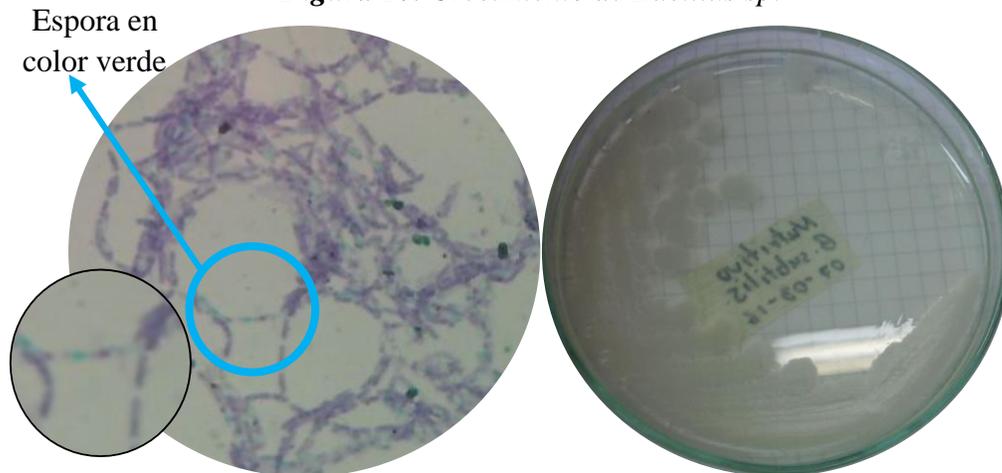
Figura 9. Tinción de Gram para *Bacillus sp.**



*Se evidencia la espora sin afinidad por el colorante (circulo inferior izquierdo), bacilos Gram positivos de gran tamaño organizados en filas. Fuente: Autor.

Las observaciones hechas permiten evidenciar una célula bacilar Gram positiva, con los espacios en blanco dentro de la misma que indican presencia de espora (Figura 9). Otras características como la corroboración de la espora en la tinción con verde malaquita y el aspecto macroscópico de la colonia, permiten orientar el microorganismo hacia el género especificado en el numeral 2.2 (Figura 10).

Figura 10. Crecimiento de *Bacillus* sp.*



*Izquierda: Tinción de Shaeffer Fulton, bacilos esporoformadores de gran tamaño ubicados en cadenas. Derecha: Colonia bacteriana con crecimiento de 24 horas, se observa de gran tamaño con aspecto de vidrio esmerilado, borde irregular, elevación plana, color blanco cremoso. Fuente: Autor.

2.4.1.2. Identificación del género bacteriano

Las pruebas bioquímicas especificadas en la Tabla 7, dan certeza en la identificación bacteriana del género y permiten un acercamiento a la especie. También se obtuvo la numeración respecto al sistema Crystal para Gram positivos, mostrando variaciones en los códigos, dos de los cuales arrojaron estadísticas del 99% de confiabilidad para una especie en común (Tabla 8).

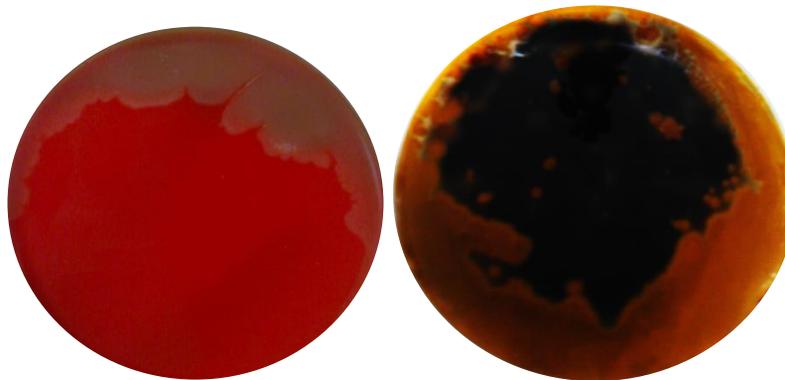
La Figura 11 muestra la morfología de la colonia en agar sangre, que coincide en varias características con la especie *B. subtilis* por ser grande, plana, mate con aspecto de vidrio esmerilado y posibilidad de tener pigmento, sin embargo la característica determinante es la diseminación del crecimiento en el agar, es decir que no se ve concretamente la forma de la colonia sino se agrupa con las demás, consiguiendo también un aspecto plumoso correspondiente a *B. cereus* (Forbes, Sahn, & Weissfeld, 2007). Otras pruebas bioquímicas como la catalasa (Figura 12), la coagulasa y la amilasa (Figura 11) son más uniformes en su comportamiento global dentro del género, debido a que todas las especies son catalasa positivo, por lo general coagulasa negativo y amilasa positivo, a excepción de *B. subtilis* que puede ser coagulasa positiva con el uso de plasma citratado u oxalato, y de *B. pumilus*, *B. globisporus*, *B. marinus* y *B. pasteurii* que no presentan hidrólisis del almidón (McFaddin, 2000).

Tabla 7. Pruebas Bioquímicas para *Bacillus* sp.

PRUEBA	Colonia evaluada	<i>Bacillus cereus</i>
MYA (lecitinasa)	-	+
Amilasa	+	+
Coagulasa	-	-
Catalasa	+	+
β -hemolisis	+	+
(FPH) Fenilalanina**	+	-
(LAC) Lactosa*	-	-
(MAB) Metil- $\alpha\beta$ -glucósido*	-	-
(SUC) Sacarosa*	+	-
(MNT) Manitol*	-	-
(FRU) Fructosa*	+	+
(PGO) o-nitrofenil-galactósido y p-nitrofenil-galactósido (Galactosa)*	-	-
(URE) Urea*	+/-	+

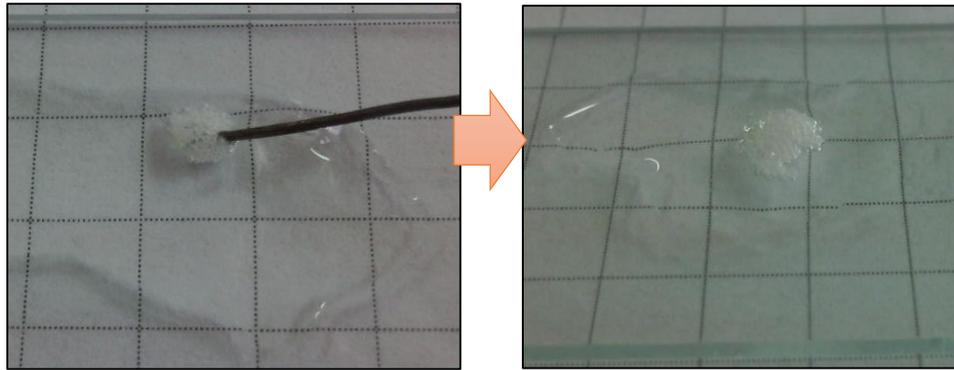
**Pruebas del sistema Crystal™ observadas con luz ultra violeta. *Observación con luz natural. Los resultados para la especie mostrada son un compilado de los estudios hechos por Benavides Rodríguez & Hermida Silva (2008); Calvo & Zúñiga (2010); Sosa López, Pazos Álvarez, Torres Campos, & Casadesús Romero (2011) y Villota Calvachi (2016).

Figura 11. Prueba en agar sangre para β hemólisis y de lugol para amilasa.*



*Izquierda: β hemolítico. Derecha: Amilasa positivo. Fuente: Autor

Figura 12. Prueba de peróxido para catalasa: positiva.*



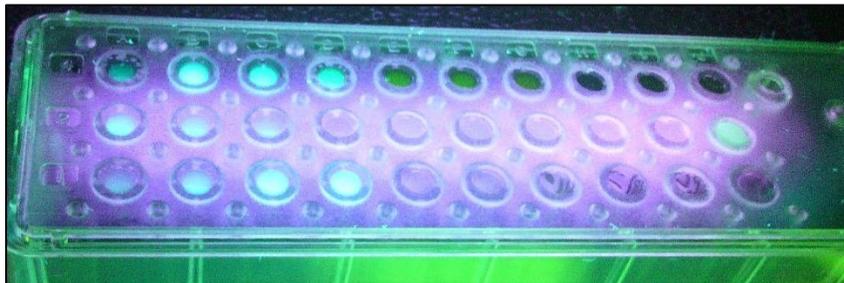
*Fuente: Autor

Tabla 8. Identificación de especie bacteriana mediante el sistema Crystal™.*

	3	7	7	5	4	4	1	1	4	7	
Código A	1 Bacillus cereus					Validez del biotipo 181.138	Confianza		>		0,9999
	2 Bacillus brevis					>	10.000.000.000		<		0,0001
	3 Rothia dentocariosa					>	10.000.000.000		<		0,0001
Código B	1 Bacillus cereus					Validez del biotipo 181.138	Confianza		>		0,9999
	2 Bacillus brevis					>	10.000.000.000		<		0,0001
	3 Bacillus licheniformis					>	10.000.000.000		<		0,0001

* Fuente: Autor.

Figura 13. Prueba BBLTM Crystal™: observación bajo luz ultra violeta.*



*Tercera columna de izquierda a derecha, fila central corresponde a la variación de arginina.

Fuente: Autor.

Figura 14. Prueba BBLTM CrystalTM: observación directa.*



*Extremo superior derecho corresponde a urea, factor variable para codificación. Fuente: Autor.

Por lo general las cepas de *Bacillus cereus* presentan actividad lecitinasasa positivo, aunque algunas producen poco o nada del compuesto (RENALOA, 2013), siendo el caso de la evaluada en esta investigación, por ello para corroborar la especie en ocasiones se utilizan otro tipo de medios diferenciales como los agares CBC (Chromogenic *Bacillus cereus*) y BCM (*B. cereus* group plating médium) (Sánchez, Correa , & Castañeda, 2016); aunque gracias al porcentaje de confiabilidad de las pruebas Crystal, no se hace necesario recurrir a ese tipo de pruebas fenotípicas adicionales.

Respecto a la información obtenida en el código, Sánchez, Correa & Castañeda (2016) mencionan que *B. cereus* puede tener hidrolisis de la urea variable, factor que fue diferencial en la observación directa del sistema Crystal (Figura 14); también Koneman (2006) afirma que algunas cepas de esta especie son arginina positivo, esto explica la ambigüedad en la lectura del cambio de color a las 24 horas (Figura 13).

CAPÍTULO 3: Valoración de la actividad enzimática de lacasa.

3.1. Bioquímica de Lacasa

La degradación de compuestos ligninocelulósicos es catalizada por un complejo de enzimas modificadoras de lignina (LMEs, Lignin-modifying enzymes) (Revollo Escudero, Serna Daza, & Hernández Torres, 2012), al cual pertenecen las peroxidasas y fenoloxidasas, encontrando en estas últimas a las lacasas que oxidan compuestos fenólicos y aminas aromáticas (Duarte Puentes, 2004). En el complejo de LMEs las principales enzimas son manganeso peroxidasa (Mn-P), lignina peroxidasa (Li-P) y lacasa, un grupo de proteínas glicosiladas que requieren O₂ para oxidar fenoles, polifenoles, aminas aromáticas y sustancias orgánicas con la sustracción de un electrón (Páez Llerena, 2012), por lo que también son conocidas como oxidoreductasas (Montoya, Sánchez, & Levin, 2014).. A su vez la lacasa forma parte del sistema de multi cobre-oxidadasas (MCOs) junto con ferrooxidadasas, ascorbatooxidadasas, ceruplasmina y otras, sin embargo se diferencian principalmente por presentar en ocasiones coloración azul; la molécula de lacasa se caracteriza por una alta estabilidad, gracias a que se constituye por un 10-25% de carbohidratos, residuos de manosa, n-acetilglucosamina y galactosa (Caudillo Pérez & Hernández Monjaraz, 2015).

La Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (CE. IUBMB) establece el nombre sistemático para lacasa como 1,2-bencenodiol: oxígeno oxidoreductasa y la numeración E.C.1.10.3.2 que se explica detalladamente en la Tabla 9 (Koolman & Röhm, 2004).

*Tabla 9. Nomenclatura para lacasa.**

CLASIFICACIÓN		DESCRIPCIÓN
Clase	1	Oxidoreductasas: Cataliza reacciones de óxido-reducción
Subclase	1.10	Difenol y sustancias relacionadas como dador o donante
Subgrupo	1.10.3	Oxígeno como aceptor
Identificación precisa	1.10.3.2	Lacasa, <i>p</i> -difenol oxidasa, 1,2-bencenodiol: oxígeno

*Especificada por CE. IUBMB en 1992. Fuente: Moss (2017).

Respecto al tipo de sustrato en el que interviene la lacasa como catalizador enzimático, cuenta con baja especificidad debido al amplio rango de degradación que posee (Albarracín Pardo,

2016), aunque tiene preferencia sobre compuestos fenólicos como elementos naturales o típicos de la enzima, oxidándolos y creando radicales fenoxilos mediante la abstracción de un electrón. Su principio activo es la degradación por oxidación de polifenoles, anilinas, metoxifenoles, hidroxindoles, bencenotioles, orto- y para- difenoles, aminofenoles, poliamidas, arilo-diaminas, actúa sobre β -dímeros, β -o-4 dímeros mediante el rompimiento de enlaces alquil-aril con la oxidación de $C\alpha$ o $C\alpha-C\beta$ (Duarte Puentes, 2004). La lacasa es capaz de oxidar compuestos complejos como clorofenoles, hidrocarburos aromáticos policíclicos, organofosforados, colorantes aromáticos (Páez Llerena, 2012), otros compuestos orgánicos e inorgánicos, e incluso iones de naturaleza metálica en presencia de un mediador. (Albarracín Pardo, 2016; Caudillo Pérez & Hernández Monjaraz, 2015).

De acuerdo con Albarracín Pardo (2016), Caudillo Pérez y Hernández Monjaraz (2015), las lacasas tienen vasta distribución en los ambientes naturales, lo que les permite abarcar procesos de degradación o síntesis, con la catálisis de reacciones de 3 categorías principales: reticulación de monómeros, degradación de polímeros y escisión del anillo de compuestos aromáticos. Además afirman que por parte de los géneros bacterianos se encuentran presentes en la morfogénesis, biosíntesis de melanina y pigmentos, composición de la cubierta proteica de esporas, procesos de resistencia a rayos ultra violeta y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), homeóstasis del cobre y oxidación de compuestos tóxicos. De igual forma para el caso de hongos ascomicetos y basidiomicetos estas enzimas participan en el proceso de deslignificación y patogenicidad en plantas, producción y pigmentación de esporas, morfogénesis, formación de melanina, reciclaje de materia orgánica recalcitrante, desintoxicación de ambientes naturales, coacción entre hongos y defensa frente a sustancias fenólicas provenientes de las plantas como las fitoalexinas.

3.1.1. Mecanismo catalítico de Lacasa

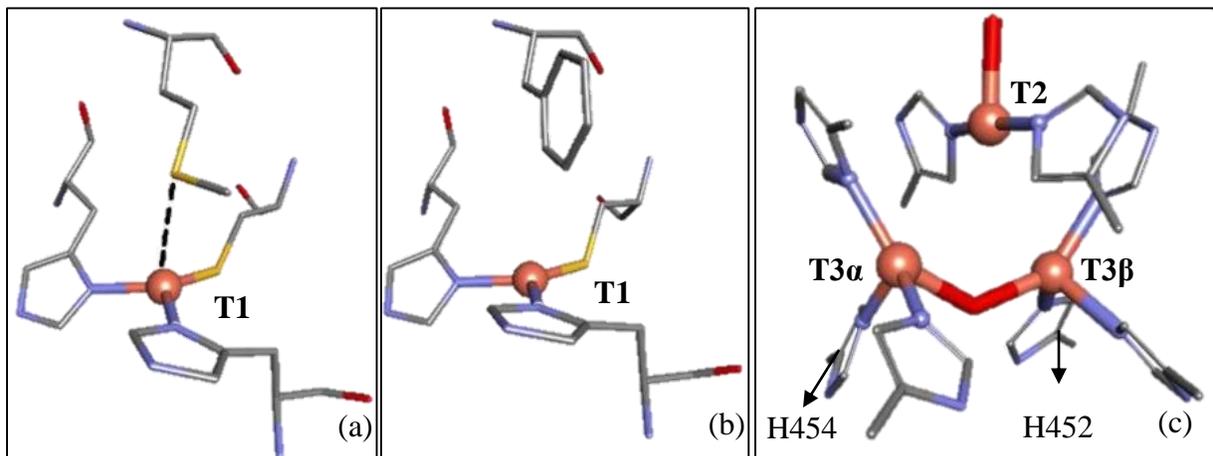
Para iniciar con el mecanismo catalítico enzimático es pertinente mencionar que las lacasas poseen un centro activo de cobre con 3 tipos de átomos de colores, que se clasifican según sus propiedades espectroscópicas (Albarracín Pardo, 2016).

- a. Tipo de centro 1 [**T1**]: también llamado cobre azul, por aportar este color a la solución, se encuentra en un espectro de absorción de λ_{600} nm.
- b. Tipo de centro 2 [**T2**]: es un solo átomo y no imparte patrón de absorción visible.

- c. Tipo de centro 3 [T3]: dos átomos de cobre que proveen patrón de absorción UV (λ_{330}) a la solución.

El átomo de cobre del centro T1 es responsable del color azul característico de las lacasas, aunque pueden existir enzimas que carecen de este átomo tomando el nombre de lacasas blancas o amarillas (Brijwani, Rigdon, & Vadlani, 2010). De manera análoga los átomos de cobre de los centros T2 y T3 se organizan en un centro trinuclear que es imprescindible para el sistema catalítico (Antonio Revuelta, 2013). En la figura 15 se evidencia la estructura de la enzima y a continuación se especifican las etapas catalíticas.

Figura 15. Estructura de los centros activos de lacasa.*

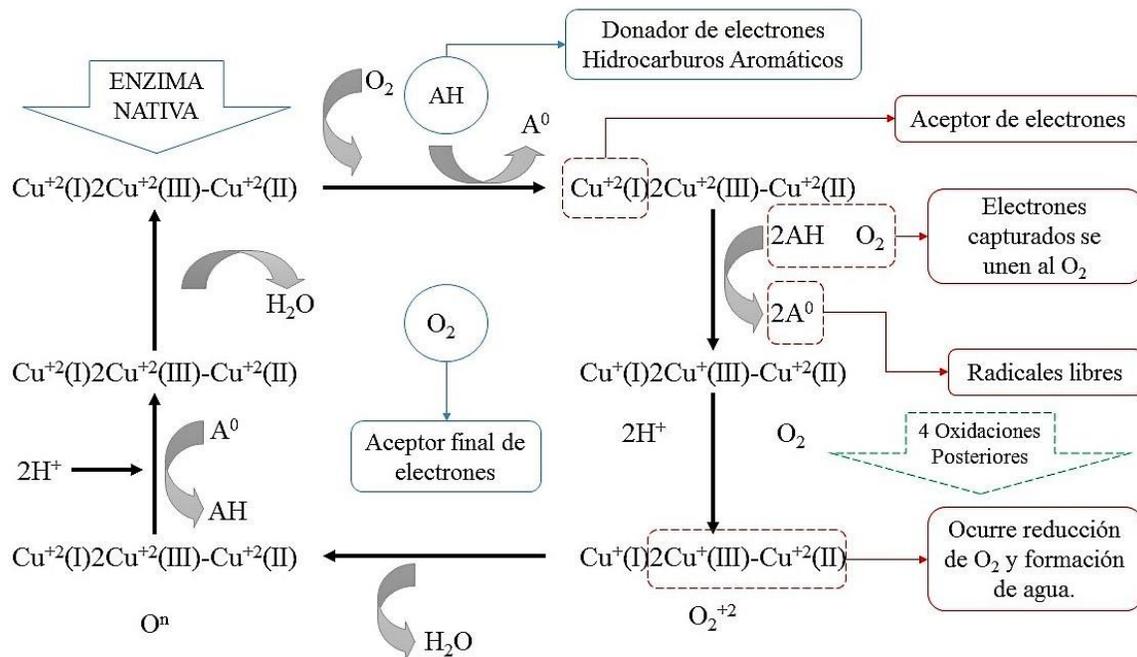


*Centro activo T1 con metionina axial (a), sin metionina axial (b), en amarillo se evidencian las cisteínas, en azul las histidinas. Centros activos T2 y T3 (c), se marcan histidinas H454 y H452 que conectan los centros T3 con el centro T1. Fuente: Jones & Solomon (2015).

3.1.1.1 Etapas de catálisis enzimática

En la Figura 16 se observa como la oxidación de un sustrato inicia en el centro T1, donde el cobre funciona como aceptor de electrones, estos son transferidos a través de un complemento de aminoácidos histidina-cisteína-histidina hacia el centro T3-T2-T3 donde ocurre la reducción de oxígeno y formación de agua (Albarracín Pardo, 2016).

Figura 16. Mecanismo catalítico de Lacasa.*



*Fuente: Albarracín Pardo (2016) & Páez Llerena (2012).

Según Brijwani, Rigdon, Vadlani (2010), Caudillo Pérez & Hernández Monjaraz (2015) la catálisis da lugar a radicales libres que pueden ser sometidos a una oxidación posterior sea o no enzimática, como es el caso de la conversión a quinonas en un segunda reacción catalítica de lacasa, además especifican las etapas de la siguiente forma:

- Etapa 1: Reducción del cobre de T1 por oxidación del sustrato para permitir la separación de electrones, produciendo radicales libres.
- Etapa 2: Transferencia de electrones capturados por Cu T1 hacia la ramificación trinuclear de T3-T2-T3, dónde se unen al oxígeno molecular.
- Etapa 3: Reducción de oxígeno a agua llevada a cabo en el centro T3-T2-T3.

3.2. Purificación de Proteínas

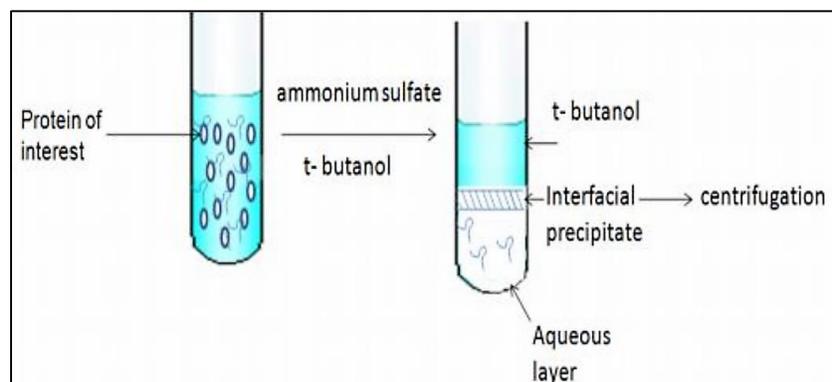
Entre las técnicas más usadas para la purificación de proteínas se encuentran la formación de dos y tres fases, en donde los compuestos son separados formando sustancias insolubles o inmiscibles, manteniendo la enzima estable en alguno de ellos (Tangarife Morales, 2016). La partición de tres fases (TPP three-phase partitioning) es un proceso no cromatográfico de separación y purificación de proteínas de mezclas complejas, se ha utilizado intensivamente para

la purificación de macromoléculas diana, considerándose como una herramienta de bioseparación versátil con un amplia área de aplicación; se fundamenta en la colectividad de principios usados en otras técnicas como salado, precipitación isotónica, precipitación codisolvente, precipitación osmótica y cosmotrópica de proteínas (Gagaoua & Hafid, 2016).

3.2.1. Principio de la Partición de Tres Fases

Según Gagaoua, Hafid (2016) & Tangarife Morales (2016) se parte de la mezcla entre extracto crudo de proteína junto con un compuesto salino sólido, usualmente sulfato de amonio, y un solvente orgánico (que debe ser un alcohol orgánico de alto peso molecular), frecuentemente ter-butanol, con el fin de obtener tres fases tras una hora de reacción con aumento de temperatura, formando un precipitado intermedio entre una fase superior orgánica y una salina inferior. La solución se fracciona selectivamente hacia las dos fases inmiscibles, en la fase salina se ubican compuestos polares como proteínas y carbohidratos, mientras que contaminantes no polares como pigmentos y lípidos se trasladan a la fase orgánica, quedando un precipitado enzimático interfacial (Figura 17). El ter-butanol convierte la solución en parcialmente hidratada y parcialmente t-butanolada respecto a la abundancia de los disolventes, la adición de la sal secuestra el agua debido a la gran afinidad entre sus moléculas, de forma que el sulfato de amonio se hidrata y disminuye la proporción de agua en la conformación proteica.

*Figura 17. Representación gráfica del sistema TPP.**



*El precipitado interfacial se forma de manera más compacta tras la centrifugación de la solución trifásica. Fuente: Rachana & Lyju (2014).

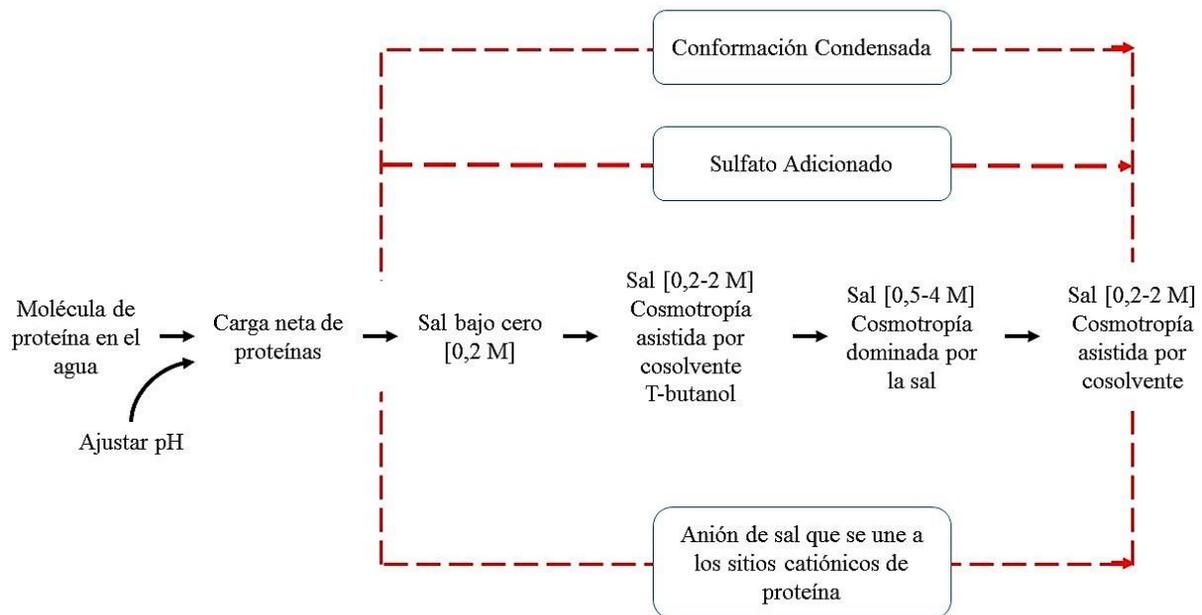
En este sentido la formación de tres fases depende de la presencia o ausencia de proteína en la mezcla, de no existir la enzima habrá división en dos fases pese a que la solución madre

contenga agua, porque parte de ella se hace no disponible para el t-butanol; si hay disponibilidad enzimática ocurrirá un equilibrio entre las proporciones de solventes y en este caso el proceso de TPP se verá afectado por factores proteicos como hidrofobicidad, peso molecular, carga, punto isoeléctrico y condiciones físicas del sistema de fases (Gagaoua & Hafid, 2016).

La capacidad de la partición trifásica para precipitar proteínas se basa en dos reacciones descritas en 2014 por Rachana y Lyju, partiendo de la molécula en solución libre, permeada y completamente soluble (Figura 18):

- Reacción 1: La molécula de proteína pasa a estar conformacionalmente más compacta y menos permeada por el agua.
- Reacción 2: Se observa cambios en la viscosidad, la proteína interactúa de forma hidrófoba con otras, produce precipitación (con sulfato incluido) y hay formación de la fase intermedia.

Figura 18. Representación esquemática de las reacciones de TPP.*



*La TPP trabaja con dos clases del ion sulfato, uno que es ligado a la proteína y otro que permanece en el volumen de solución para actuar como cosmótopo⁶ cuando la concentración

⁶ Los agentes cosmótopicos producen interacción favorable en la estructura tridimensional del agua, estabilizando también las interacciones proteicas intramoleculares (Gagaoua & Hafid, 2016).

aumenta a 0,5 M o mayor. Lo mismo ocurre con el solvente orgánico al quedar un remanente en la solución, actuando como cosmótopo. Fuente: Dennison & Lovrien (1997).

3.2.1.1. Sulfato de Amonio

La sal $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se encarga en este caso del proceso de salting out, es decir que al aumentar su concentración, disminuye la cantidad de agua disponible para la proteína; es la más usada por su alta solubilidad y fuerza iónica, también por ser económica, de fácil disposición y suave con proteínas. Entre los principales beneficios que presta para la partición trifásica se encuentran la estabilidad de proteínas por su alta solubilidad y de interacciones intermoleculares en macromoléculas con estructuras protéicas, la importancia de la saturación para la interacción proteína-proteína y el bajo índice de efectos caotrópicos (desorden de la red tridimensional del agua). (Gagaoua & Hafid, 2016; Tangarife Morales, 2016)

3.2.1.2. Ter-butanol

Este alcohol orgánico C4 funciona en la TPP como solvente diferenciador, luego de la adición de sal sólida a la solución; se usa normalmente debido a sus propiedades de solubilidad y miscibilidad en agua, reducción de efectos caotrópicos y amplias propiedades como agente cosmotrópico. Para la precipitación enzimática es benéfico en cuanto no puede penetrar dentro de la estructura por su gran tamaño molecular, además tiene importantes efectos de amontonamiento de la proteína de interés con una incubación entre 20 y 40 °C (temperatura cercana a la ambiente), mejorando la estabilidad del compuesto. (Gagaoua & Hafid, 2016; Tangarife Morales, 2016).

3.2.1.3. Ventajas y Desventajas

En las ventajas se incluye la rapidez, simplicidad y eficacia en el manejo y concentración de soluciones de proteínas, el uso de menos cantidad de reactivos frente a precipitaciones salinas, permite el manejo de temperaturas cercanas al ambiente y de condiciones que favorecen la estabilidad enzimática que también maximizan la TPP; en cuanto a la proteína purificada se obtiene una estructura más rígida, aumenta su concentración con respecto a procesos cromatográficos y permite fraccionamientos preliminares del extracto crudo. Contrariamente, en las desventajas resalta la desnaturalización de proteínas con estructuras cuaternarias, la eliminación del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mediante diálisis, la inactividad de algunas enzimas en presencia de grandes cantidades de t-

butanol y que no permite el aislamiento de las proteínas menos concentradas en una solución. (Gagaoua & Hafid, 2016; Tangarife Morales, 2016).

3.3. Metodología

Al comenzar con la producción enzimática de lacasa, fue necesario conocer de antemano los requerimientos nutricionales en los medios de cultivo que serían utilizados para tal fin. Por esta razón se toma como referencia lo recopilado por Tangarife Morales (2016), en donde menciona como fuentes de carbono que pueden ser usadas la glucosa, xilosa, manosa, fructosa, sacarosa, galactosa, lactosa, ácido galacturónico, pectina, inulina, residuos a base de celulosa y almidón como el arroz y el maíz; también alude como fuentes de nitrógeno el tartrato de amonio, peptona, caseína, sales de nitrato, ácido glutámico, glicina, desechos de maíz, extracto de levadura y extracto de carne; por parte de los inductores señala el ABTS⁷, HBT, ácido verátrico, ácido ferúlico, sales de cobre, etanol y metanol, indicando como valor de pH óptimo de 4 a 6 y temperatura promedio de 30° C.

3.3.1. Preparación de inóculo microbiano

Por otra parte para tener certeza de la cantidad de inóculo a sembrar se realizaron métodos de cuantificación bacteriana y micótica, los cuales se describen a continuación.

3.3.1.1. Conteo de conidias en hemocitómetro o cámara de Neubauer

Para hacer el montaje en la cámara se inició con la preparación de una suspensión de conidias, tomando un disco de agar de 5 mm proveniente de reactivación del moho en medio PDA y llevándolo a 20 ml de agua destilada esteril, tras homogenizar la suspensión se mezcló una pequeña porción junto con azul de lactofenol, de allí una gota de la mezcla fue colocada en la parte superior del cubreobjetos sobre el hemocitómetro, cuidando que la cantidad inoculada llenara el campo de medición por capilaridad (Peña Sánchez & Páez Mendieta, 2014). El montaje consiste en una placa de vidrio que tiene dos cámaras, divididas cada una en nueve cuadrados de 1 mm² cubriendo un área total de 9 mm², de los cuales se toman cinco para el conteo de esporas grandes, dando importancia a las divisiones marcadas que señalan las conidias a contar, generalmente se

⁷ ABTS abreviatura para 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)

toman los cuerpos de esporas que se encuentran en todo el campo incluyendo la primera línea superior y derecha, no así la primera línea inferior e izquierda (Cañedo & Ames, 2004). Con el fin de abarcar el campo visual necesario se hizo observación microscópica con el objetivo 40x y se aplicó la siguiente ecuación (Bustillo Pardey, 2010):

$$\text{Número total de células} \left[\frac{\text{células}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{Número de células contadas} * \text{Dilución} * 10^4}{\text{Número de áreas contadas}}$$

3.3.1.2. Conteo de colonias bacterianas en placa con diluciones seriadas.

Se comenzó con la preparación de una solución madre, inoculando colonia bacteriana con un asa redonda en 10 ml de solución salina isotónica estéril (preparación en el Anexo 2.1.), la referencia de turbiedad fue el nivel 4 de la escala de McFarland mostrada en la Figura 6. Posteriormente se tomó un mililitro de solución sin diluir y se completó a volumen de 10 ml con solución salina para la dilución 10^{-1} , de la misma forma se prepararon las demás diluciones, partiendo de 1 ml de la dilución anterior hasta llegar a 10^{-4} . Para el conteo en placa se elaboró siembra en profundidad, inoculando 1 ml de cada dilución en cajas de Petri estériles y vaciando posteriormente agar nutritivo estéril a 45° C, se llevó a incubación por 24 horas a 36° C prosiguiendo con el recuento de unidades formadoras de colonia (UFC) por caja y reportando el resultado en UFC/ml. (Corral Lugo, et al., 2012).

3.3.2. Valoración cualitativa de producción de lacasa

3.3.2.1. Siembra en medios de cultivo sólidos

Ahora bien, la técnica de rastreo de lacasa utilizada en esta investigación requiere como inductor enzimático el ABTS (que también hace parte del sustrato oxidable) en los medios de cultivo usados, cuya composición se describe en el Anexo 1.1. Para el caso de la especie fúngica se probaron tres medios, uno selectivo diferencial enriquecido con extracto de salvado de trigo (EST), otro medio mineral basal (Medio Básico para Lacasa MBL) y un agar OGYE comercial enriquecido; mientras que para la especie bacteriana se tomó agar nutritivo como base, enriquecido con carboximetilcelulosa y una alta variación del inductor enzimático. Los medios son suplementados con sulfato de cobre, que adiciona los iones Cu^{+2} necesarios para la función de lacasa y provee un efecto regulador positivo en la expresión de esta oxidasa de organismos ligninolíticos (Falero Bilbao, 2013; Revollo Escudero, Serna Daza, & Hernández Torres, 2012).

La metodología de siembra utilizada en este caso para mohos se trata de la forma de sándwich, tomando círculos de agar de 5 mm de diámetro provenientes de la reactivación de colonia y poniéndolos con la cara del micelio hacia el medio de cultivo limpio; a diferencia de la especie bacteriana con la que se mantuvo la técnica de agotamiento, partiendo de la dilución 10^{-4} . Seguidamente se llevaron las cajas a incubación por 14 días a temperatura ambiente para *Fusarium sp* y por 7 días a 37° C para *Bacillus sp*. (Antonio Revuelta, 2013).

3.3.2.2. Índice de Potencia

Posteriormente para los medios que mostraron halo de coloración se tomó medición de este, indicando [++] para diámetro mayor a 3 cm, [+] entre 1 y 2,9 cm y [-] menor a 1 cm. De allí se partió para evaluar el índice de potencia, que define Antonio Revuelta (2013) como la razón entre el área de crecimiento del halo de (oxidación) y el área de crecimiento de la colonia microbiana.

3.3.3. Valoración cuantitativa de producción de lacasa

3.3.3.1. Siembra en medios de cultivo líquidos

En esta fase de la investigación el ABTS no debió ser agregado al caldo de cultivo, sin embargo fue necesario seleccionar un inductor complementario de los mencionados al inicio del apartado 3.3., para el caso metanol al 1% (v/v) (Tangarife Morales, 2016) agregado posteriormente de la esterilización.

La composición de los medios para moho y bacteria (Anexo 1.2.) se fundamentó en las especificaciones descritas anteriormente, asegurando que contaran con al menos una de las fuentes de carbono y nitrógeno requeridas para la producción enzimática de interés. Cabe aclarar que las bases fueron agares comerciales mezclados en agua destilada y filtrados antes de la completa dilución con adición de calor, para eliminar el contenido de elemento gelificante.

Continuando con el método de siembra, se tomaron 120 ml de caldo OGYE y se inocularon con 6 discos de agar de 5 mm de diámetro, obtenidos de la reactivación del hongo *Fusarium sp* en PDA, a fin de coincidir con el conteo de conidias en 1 disco por cada 20 ml de solución (Sivakumar, Rajendram, Balakumar, & Tamilvendan, 2010) . De manera semejante fue manejado el inculo en los medios PDB y Nutritivo con *Bacillus sp*, partiendo de 10 ml de dilución 10^{-3} adicionados a 90

ml de caldo, para completar 100 ml de dilución 10^{-4} . Los dos microorganismos fueron puestos en incubación a 30° C para finalmente realizar las mediciones fotométricas de la enzima en cuestión.

3.3.3.2. Medición fotométrica del extracto enzimático

Por lo referente a la preparación de la muestra de extracto enzimático, se probaron dos metodologías diferentes; en la primera se tomó una alícuota de 10 ml de caldo de cultivo con crecimiento microbiano y se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 minutos (Revollo Escudero, Serna Daza, & Hernández Torres, 2012); en la segunda se manejaron 12 ml de alícuota y se filtraron con filtros cualitativos Munktell (Ahlstrom) No. 2, usando una jeringa para crear vacío en el montaje (Páez Llerena, 2012). En los dos métodos se tomó el fluido limpio para medición, evitando cuidadosamente el precipitado o el material filtrado.

La mezcla de reacción referida por Antonio Revuelta (2013) con un contenido de 100 μ L de Buffer acetato 0,1 M pH 5 (preparación Anexo 2.2.), 800 μ L de extracto enzimático y 100 μ L de ABTS, para un volumen total de 1000 μ L; en caso del blanco se reemplaza la cantidad de inductor con el mismo volumen de solución tampón. De allí se partió para establecer la mezcla que completara volumen de 3000 μ L, cerciorando que ocupara más del 50% de la celda fotométrica de cuarzo de 10 mm, llegando finalmente a volúmenes de 300 μ L de Buffer, 2400 μ L de muestra y 300 μ L de inductor ABTS, sustituido en el blanco por 300 μ L de solución tampón.

De forma previa a la medición, se realizó un barrido de absorbancias utilizando el software UV Probe para identificar puntualmente la longitud de onda en que debe ser analizada la oxidación de ABTS. La medición fotométrica se realizó en dos tiempos, un tiempo $t=0$ con la mezcla de reacción recientemente preparada y un tiempo $t=3$ después de la incubación de la muestra a 30 °C en baño maría, también se manejó la ecuación del cálculo de la actividad enzimática (EA), descrita en la Tabla 10, para el tratamiento de los datos obtenidos fotométricamente.

Tabla 10. Ecuación de actividad enzimática para lacasa.*

$$EA = \frac{\Delta Abs * Fd * VT}{t * \epsilon * L * VM}$$

EA	Actividad Enzimática [U/L] ⁸	
ΔAbs	Diferencia de absorbancias	
Fd	Factor de dilución debido a ε	1.000.000
VT	Volumen total [ml]	3,0
t	Tiempo de reacción [min]	3
ε	Coefficiente de extinción molar [M ⁻¹ cm ⁻¹]	36
L	Longitud de la celda [cm]	1
VM	Volumen de la muestra de extracto enzimático [ml]	2,4

*Fuente: Páez Llerena (2012).

3.3.4. Purificación de lacasa

3.3.4.1. Partición Trifásica (TPP)

Una vez obtenido el fluido limpio (3.3.3.2), se procedió a adicionar ter-butanol a la solución en razón de 1:1,1 y sulfato de amonio en un porcentaje de 73% p/v, que según Tangarife Morales (2016) mejoran en mayor medida la producción de lacasa de *Fusarium spp* los valores del arreglo que se encuentran cercanos a estos, De la misma forma mencionan Yadav, Gupta, & Khare (2017) para *Bacillus sp.*, que las proporciones cercanas a 1:1 de t-butanol y a un 60% de (NH₄)₂SO₄ mejoran el proceso de purificación enzimática.

Después de realizada la mezcla, se homogenizó en un equipo vortex y se incubó por una hora en baño maría a 38° C, luego se usó un embudo de separación para disgregar las fases formadas y se prosiguió con centrifugación de la fase intermedia a 4000 rpm durante 10 minutos, facilitando de esta manera la separación de la composición proteica más compacta, la cual fue suspendida en 15 ml de buffer pH 7 (preparación en Anexo 2.2.) para finalmente ser utilizada como muestra en la medición fotométrica descrita en el apartado 3.3.3.2. (Shah, Sharma, & Gupta, 2004; Tangarife Morales, 2016).

⁸ Una unidad internacional de actividad enzimática de lacasa [U] representa la cantidad de enzima capaz de oxidar 1μmol de ABTS por minuto, siendo L⁻¹ cada litro de disolución enzimática (Koch, Naranjo, & Páez, 2011).

3.3.5. Actividad enzimática específica (SEA)

Esta unidad es mucho más concreta para la cuantificación de la producción de lacasa, se maneja como el cociente entre la actividad enzimática [U/L] y la biomasa en base seca [mg/ml], y permite conocer la cantidad de enzima producida respecto a la masa de contenido proteico celular en la alícuota tomada (Chávez López, Esparza García, Hidalgo Lara, Loera Corral, & Rodríguez Vázquez, 2005).

$$SEA \left[\frac{U}{mg} \right] = \frac{EA \left[\frac{U}{L} \right]}{Biomasa \left[\frac{mg}{ml} \right]}$$

3.3.5.1. Determinación de la biomasa en peso seco

La técnica usada requirió alícuotas de 10 ml de caldo de cultivo con crecimiento microbiano, las cuales se filtraron habiendo pesado previamente los filtros, el conjunto se colocó en un horno de secado a 105 °C por 15 minutos y se pesó nuevamente. Para la determinación de biomasa en la partición de tres fases, se tomó la fase intermedia centrifugada proveniente de 10 ml de extracto crudo y se llevó a las mismas condiciones anteriormente mencionadas, esta vez en tubos de ensayo con peso conocido para su resta del pesaje final (Torres Vargas, 2013).

3.3.5.2. Tratamiento de datos

A fin de excluir los valores anómalos en las mediciones hechas de actividad enzimática, se recurrió a la prueba Q de Dixon para rechazo de datos con el 90% de confianza, aplicando un criterio de discordancia de 0.6789 para un total de 4 datos (Verma & Quiroz Ruiz, 2006). A continuación se especifica la ecuación empleada (Clavijo Diaz, 2002):

$$Q = \frac{Desvío}{Amplitud} = \frac{(Valor sospechoso - Valor vecino más cercano)}{(Mayor valor - Menor valor)}$$

Seguidamente para evaluar la posibilidad de emplear el método de partición de tres fases, Berg, Tymoczko, Stryer (2007) y Tangarife Morales (2016) proponen el uso de dos parámetros:

- Rendimiento (R): mide la actividad enzimática existente después del proceso de purificación, tomando el extracto inicial como 100%.

$$R = \frac{EA \text{ Extracto Purificado}}{EA \text{ Extracto Crudo}} * 100$$

- Grado de Purificación (P): también conocido como veces de purificación, es la medida del incremento en pureza de la producción enzimática.

$$P = \frac{EAspec\ Extracto\ Purificado}{EAspec\ Extracto\ Crudo}$$

3.4. Resultados y Análisis

3.4.1. Cuantificación de células microbianas

En lo referente a la medición en cámara de Neubauer para conteo de esporas de *Fusarium sp.*, se obtuvo un total de 7566 células en las cinco áreas contadas (Anexo 3). Aprovechando la ecuación se calculó el número de conidios por ml de suspensión:

$$\frac{7556 * 1 * 10^4}{5} = 15132 * 10^3 \frac{Células}{ml}$$

De forma concordante en el caso de *Bacillus sp.*, el número de unidades formadoras de colonia que resultó de interés para la investigación fue de 81 UFC, pertenecientes a la dilución 10^{-4} por ser la que permitiera un mejor conteo. A su vez debido la proveniencia directa de la dilución 10^{-3} que también arrojó resultado cuantificable (302 UFC), permitió elaborar las suspensiones requeridas para el desarrollo de las cepas en medio de cultivo líquido.

3.4.2. Valoración cualitativa de producción de lacasa

La siembra en medios de cultivo sólidos arrojó resultados variables entre ambos microorganismos, que al ser monitoreados continuamente debían impartir un halo de coloración proveniente de la oxidación del sustrato por parte de la enzima en cuestión, sin embargo *Fusarium sp* no mostró coloración del medio de cultivo en ninguno de los casos (Figura 19), en comparación con *Bacillus sp* que si manifestó pigmento verde azulado (Figura 21). Al ver que el agar nutritivo para *Bacillus sp* expuso coloración, se hizo el montaje con un medio comercial para mohos, en este caso OGYE, con el fin valorar los distintos tipos de evolución del moho respecto a la oxidación del sustrato, aunque definitivamente no fue posible poner de manifiesto la oxidación por producción de lacasa de *Fusarium sp*, pese a que se hizo variación en el tipo de sustrato con la adición ETS y carboximetilcelulosa (Figura 19).

Figura 19. Crecimiento de *Fusarium sp* para valoración cualitativa de lacasa.*



*A la derecha medio selectivo diferencial con EST no presenta halo de coloración. A la izquierda medio de cultivo OGYE con EST y carboximetilcelulosa, no presenta halo de oxidación, imágenes tomadas el día 10 de crecimiento. Fuente: Autor.

Como explicación pertinente Páez Llerena (2012) en su investigación muestra que este género fúngico presenta cambio leve en la coloración del medio con ABTS, y equivalentemente Brijwani, Rigdon, & Vadlani (2010) aseguran que no todas las isoformas de lacasa poseen un átomo de cobre tipo I, de forma que no sería posible evidenciar el color azul característico, en su lugar poseen otro átomo metálico que cumple la misma función oxidativa (Arana, Tellez, & González, 2002). Para el caso de *Fusarium sp* se trataría de una lacasa blanca o amarilla que pese a la falta de pigmento puede llegar a oxidar los sustratos respectivos, ya que contaría con los centros de cobre tipo 2 y 3, ineludibles en el proceso de catálisis. En este sentido se ve necesario hacer pruebas cuantitativas que cuentan con mayor especificidad y pueden dar certeza de la producción de la enzima en cuestión en los mohos evaluados.

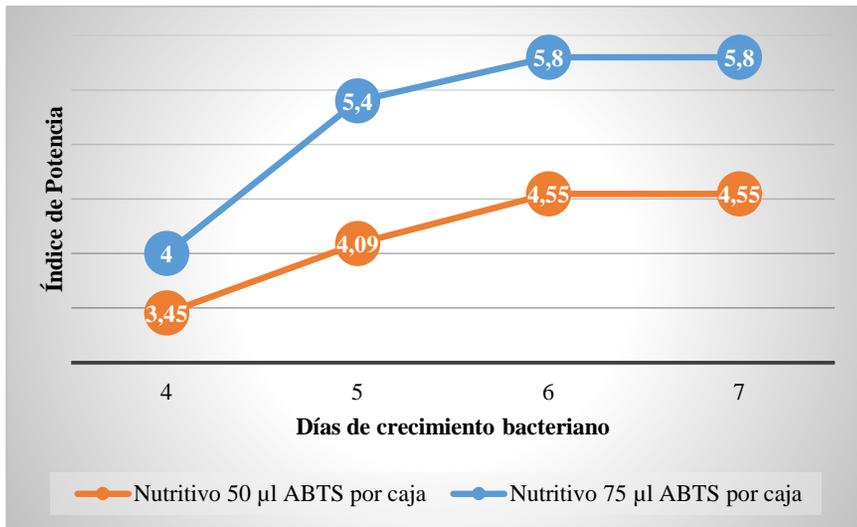
En la Tabla 11 se muestra la relación utilizada para el cálculo del índice de potencia de *Bacillus sp.*, con aumento de actividad enzimática manifestada en las cajas de Petri con mayor contenido de inductor enzimático. Para una explicación más detallada de los resultados obtenidos, se observa en la Figura 20 el índice de potencia obtenido respecto a las dos concentraciones de ABTS, entre las cuales existe menor pendiente en el desarrollo del halo de coloración de la menor concentración.

Tabla 11. Medición del diámetro de crecimiento frente al halo de coloración de *Bacillus sp.**

Día de	Nutritivo 50 µl ABTS/caja		Nutritivo 75 µl ABTS/caja	
	Ø Crecimiento	Ø Halo	Ø Crecimiento	Ø Halo
	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)
1	0,9	-	0,85	-
2	1	-	0,9	-
3	1,1	-	0,9	-
4	1,1	3,8 [++]	1	4 [++]
5	1,1	4,5 [++]	1	5,4 [++]
6	1,1	5 [++]	1	5,8 [++]
7	1,1	5 [++]	1	5,8 [++]

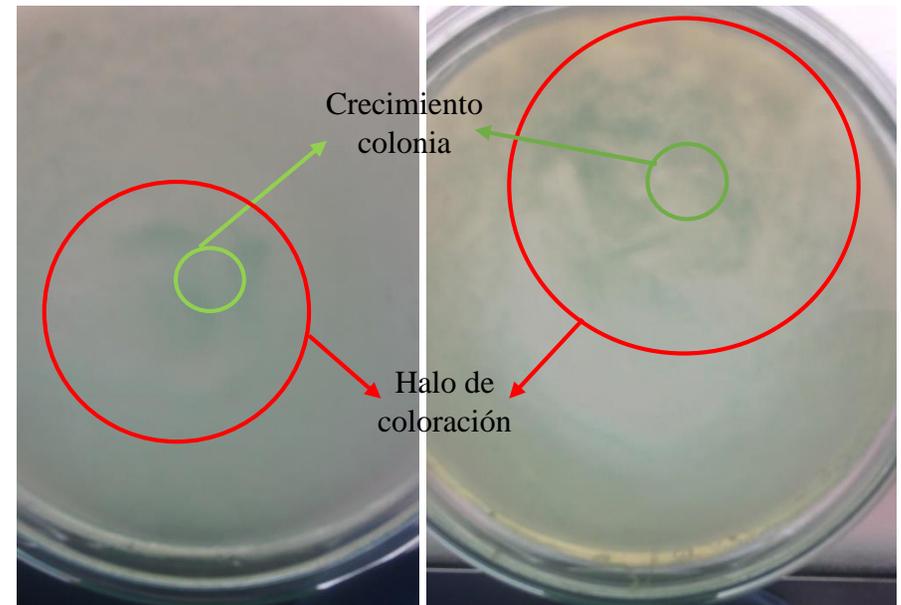
* Fuente: Autor.

Figura 20. Índice de potencia para *Bacillus sp.**



*Fuente: Autor

Figura 21. Crecimiento de *Bacillus sp* para valoración cualitativa de *lacasa*.*



*Derecha: Agar nutritivo con 50 µl ABTS por caja. Izquierda: Agar nutritivo con 75 µl ABTS por caja. Imagen tomada a los 6 días de crecimiento bacteriano. Fuente: Autor

El comportamiento del índice de potencia depende del contenido de sustrato susceptible de oxidación, de manera que el día de crecimiento en que se inició la coloración se debe a la disponibilidad de otras sustancias, tomando de referencia que cuando se agotan los demás sustratos y comienza a estar disponible el inductor, es el momento en que se da la síntesis enzimática (Lewin, 1996; Mateos, 2000). También es necesario tener en cuenta que la velocidad de una reacción de catálisis enzimática es directamente proporcional a la relación enzima-sustrato (Voet & Voet, 2004); así, es posible afirmar que con un mayor contenido de ABTS actuando como sustrato, *Bacillus sp* produce mayor cantidad de enzima e igualmente agiliza la velocidad de reacción, mostrándose un mayor diámetro en el halo de pigmentación.

3.4.3. Valoración cuantitativa de producción de lacasa

En esta fase del proceso se adquirieron resultados representativos a partir del día 10 de medición fotométrica a λ_{430} nm, y se evidenció una mejor obtención de extracto enzimático con el método de filtración frente al de centrifugación, valorando dos criterios particulares como la obtención de absorbancias y actividades enzimáticas negativas. La Tabla 12 contiene los resultados con mayor uniformidad en las repeticiones, a partir de los cuales se lleva a cabo la estrategia de selección de la cepa adecuada; es importante mencionar que en el día 17 se evaluó la producción de lacasa con una concentración menor del sustrato, usando ABTS diluido al 50% y en esta ocasión fue posible evidenciar coloración de la solución tras el tiempo de reacción.

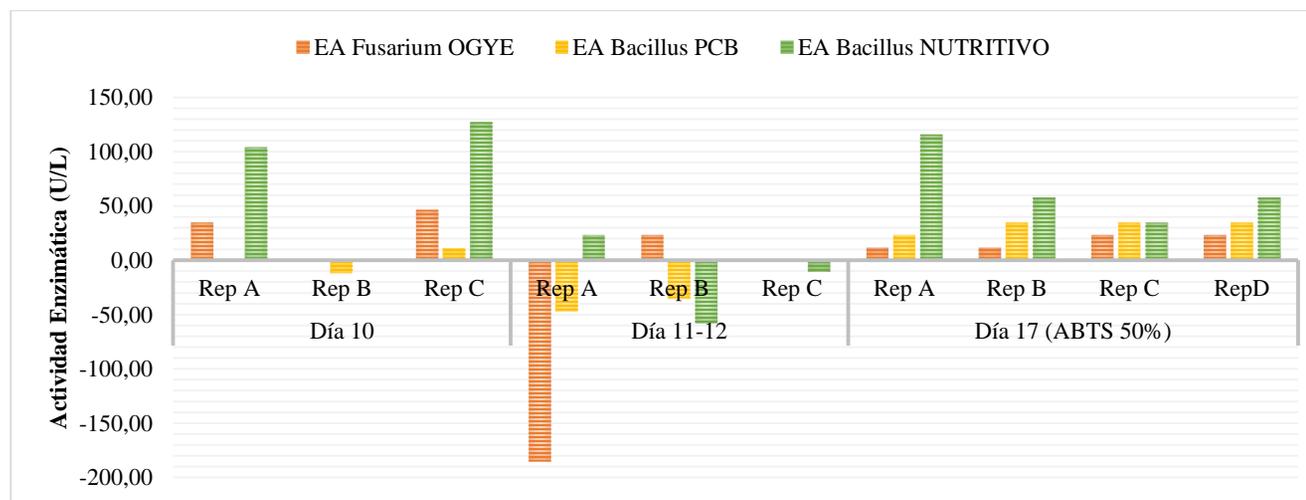
Usando la técnica de centrifugación para la síntesis de extracto enzimático, se vio necesario descartar la totalidad de los datos de actividad enzimática (Anexo 4), en primer lugar por tratarse de absorbancias negativas, lo que indica que el valor obtenido para el blanco es mayor que el de la muestra, teniendo en cuenta que la absorbancia se toma como el valor del analito menos el valor del blanco, suprimiendo inmediatamente el dato por poca fiabilidad (Boqué, 2012); en segundo lugar, aunque las absorbancias fueran positivas, si en $t=0$ arrojaba un valor mayor que en $t=3$, el cálculo tendría un resultado negativo para la actividad enzimática, igualmente un elemento descartable debido a que representa una disminución en la concentración de ABTS oxidado por lacasa.

Tabla 12. Actividad enzimática de extracto crudo de lacasa.*

Día	Rep	<i>Fusarium</i> Filtración OGYE			Día	Rep	<i>Bacillus</i> Filtración PCB			<i>Bacillus</i> Filtración NUT		
		Abs t=0	Abs t=3	EA			Abs t=0	Abs t=3	EA	Abs t=0	Abs t=3	EA
10	A	0,004	0,007	34,72	10	A	-0,031	-0,031	0,000	0,212	0,221	104,167
	B	-0,003	0,0029	68,29		B	0,087	0,086	-11,574	-0,018	0,179	2280,093
	C	0,002	0,006	46,30		C	0,088	0,089	11,574	0,126	0,137	127,315
12	A	0,009	0,008	-185,19	11	A	0,254	0,25	-46,296	0,056	0,058	23,148
	B	0,002	0,004	23,15		B	0,024	0,021	-34,722	0,002	-0,003	-57,870
	C	-0,008	-0,005	34,72		C	-0,003	-0,002	11,574	0,006	0,0051	-10,417
17	A	0,001	0,002	11,57	17	A	0,038	0,04	23,148	0,004	0,014	115,741
	B	0,002	0,003	11,57		B	0,182	0,185	34,722	0,014	0,019	57,870
	C	0,005	0,007	23,15		C	0,21	0,213	34,722	0,011	0,014	34,722
	D	0,004	0,006	23,15		D	0,254	0,257	34,722	0,001	0,006	57,870

*Se muestran en color rojo los valores no descartados para el análisis. EA=Actividad enzimática en U/L. Fuente: Autor.

Figura 22. Extractos enzimáticos mediante la técnica de filtración.*



*Fuente: Autor

Uno de los factores determinantes durante esta fase fue el tipo de tratamiento para separación de enzimas, en este caso la centrifugación diferencial que busca dividir el homogenado celular en dos fases diferentes, poniendo como precipitado el material insoluble y dentro del sobrenadante las proteínas solubles (Lodish, et al., 2005), no obstante la miscibilidad de la lacasa a causa de la baja solubilidad del cobre, impide que se mantenga estable en la fase acuosa y causa su precipitación (Kemira, 2010). De ahí que el sistema de filtración fuera más productivo para la separación enzimática, reteniendo los componentes sólidos insolubles y dejando los líquidos miscibles en la solución, lo que se traduce en un aumento en la medición.

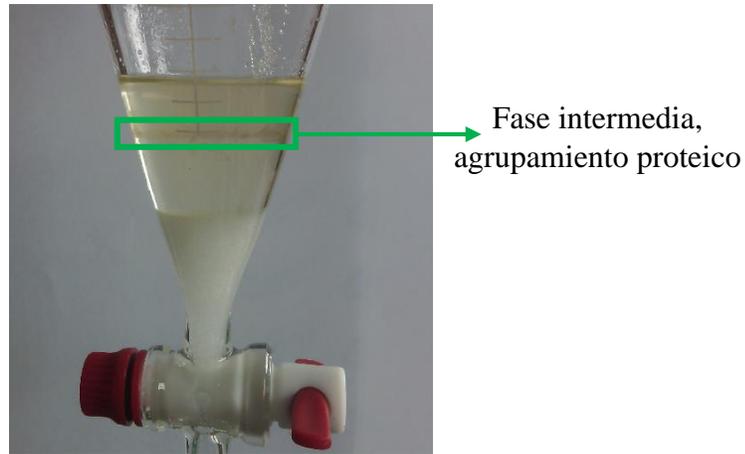
De igual forma los días de crecimiento microbiano en que se llevó a cabo la medición, junto con la concentración de sustrato son determinantes en la actividad enzimática para ambos microorganismos, en la Figura 22 se observa gráficamente el comportamiento de estos dos factores. Primeramente menciona Páez Llerena (2012) que la mayor actividad de lacasa para *Fusarium sp* se presenta alrededor del día 16, concordando con el resultado en esta investigación para el día 17 de crecimiento; así mismo *Bacillus sp* ingresa en su fase estacionaria entre el segundo y séptimo día de crecimiento en promedio, momento en el que inicia la producción de sustancias metabólicas como las enzimas (Universidad Nacional de Córdoba, 2014), lo que se evidenció con un aumento en la actividad enzimática desde el día 10.

Seguidamente se tiene una concentración alta de ABTS en las primeras mediciones hechas, dando importancia a que en la preparación de la mezcla de reacción no se utilizó como inductor sino como compuesto diana para oxidación; se observaron modificaciones en la actividad enzimática de lacasa con disminución de las reacciones por exceso de sustrato, que tiende a saturar los mecanismos de oxidoreducción (Repetto Jiménez & Repetto Kuhn, 2009) y puede generar falsos positivos en las absorbancias, de manera que los resultados obtenidos para las mediciones hechas el día 10, 11 y 12 son poco confiables por la variabilidad observada en comparación con el día 17. Es así como la dilución del sustrato en la mezcla permitió una mayor velocidad en las reacciones y por tanto uniformidad en las mediciones de los dos microorganismos, dando certeza de la disponibilidad de la enzima para la oxidación parcial del sustrato, de forma que el mismo día de crecimiento permite realizar el procesos de purificación por partición de tres fases.

3.4.4. Purificación enzimática por Partición Trifásica

Por lo relacionado con la purificación de lacasa se visualiza la formación de las tres fases del complejo orgánico-salino, mostrado en la Figura 23, adicionalmente las mediciones fotométricas evidencian coherencia en las actividades enzimáticas calculadas (Tabla 13).

Figura 23. Formación de tres fases en la TPP.



*Fuente: Autor.

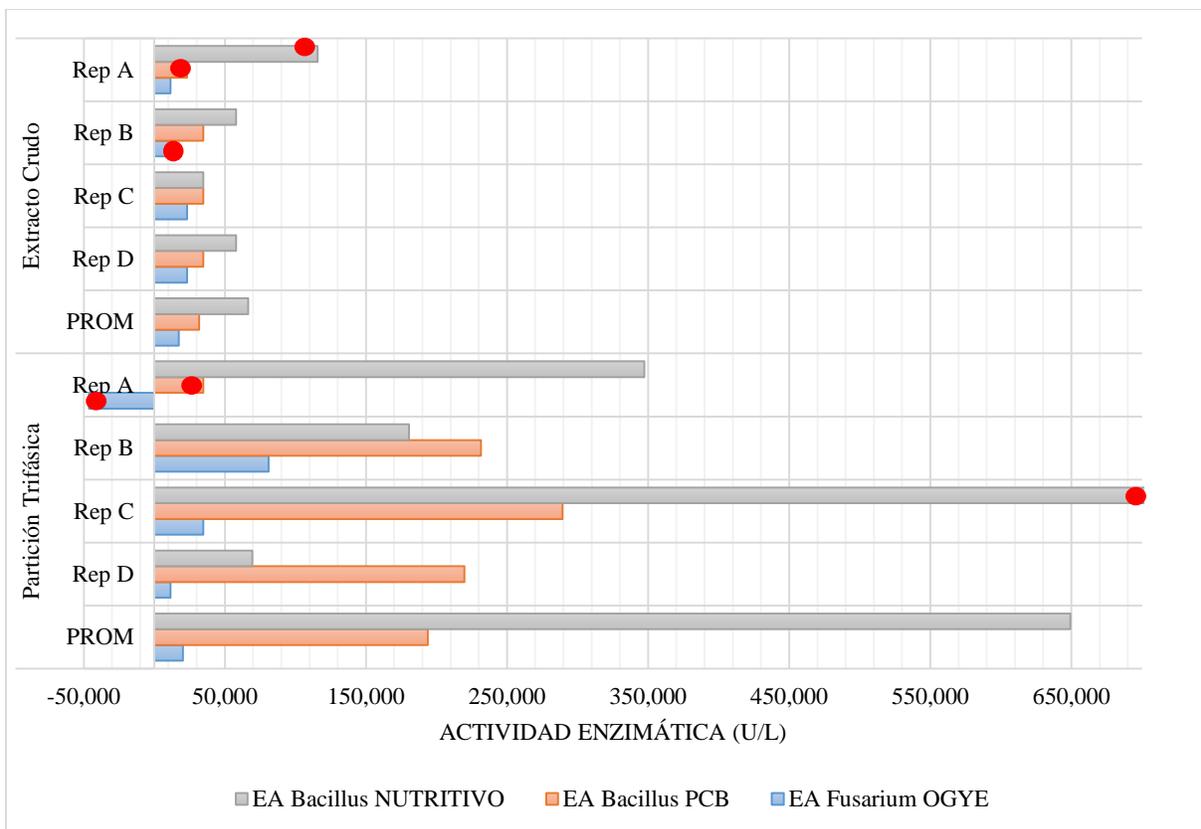
Tabla 13. Actividad enzimática de purificación de proteínas por TPP.

	Rep	Abs t=0	Abs t=3	EA
<i>Fusarium</i> OGYE	A	0,011	0,007	-46,30
	B	0,004	0,011	81,02
	C	0,009	0,012	34,72
	D	0,012	0,013	11,57
<i>Bacillus</i> PCB	A	0,002	0,005	34,72
	B	0,006	0,026	231,48
	C	0,003	0,028	289,35
	D	0,012	0,031	219,91
<i>Bacillus</i> NUTRITIVO	A	0,004	0,029	347,22
	B	0,007	0,02	180,56
	C	0,013	0,157	2000,00
	D	0,007	0,012	69,44

*EA=Actividad enzimática en U/L. Fuente: Autor.

El caso de la primera repetición en la medición de lacasa de *Fusarium sp* incumple uno de los criterios mencionados en el apartado anterior, la actividad enzimática negativa como dato inconsistente dentro del grupo. Al respecto es importante considerar los valores sospechosos para suprimirlos de la comparación a partir de la prueba de Q, que evidentemente alteran el comportamiento del promedio como se puede ver en la Figura 24, que pone en paralelo las actividades enzimáticas medidas el día 17 para el extracto crudo y purificado, y muestra un incremento considerable en la actividad de lacasa usando la TPP, sin embargo no es suficiente el aumento de los valores para definir que este tipo de purificación es viable en la investigación.

Figura 24. Actividades enzimáticas del extracto de lacasa crudo y purificado.*



*Las EA sospechosas se marcan con un punto rojo. Fuente: Autor.

Las respectivas pruebas de Q se observan en la Tabla 14 con los valores ordenados de menor a mayor, con el fin de dejar un conjunto de 3 datos de actividad enzimática para cada variante de los microorganismos, posteriormente en la Tabla 15 se incluye el cambio en el promedio de EA en cada microorganismo junto con las determinaciones de biomasa en peso seco

de ambos casos (antes y después de la purificación), para finalmente ver la actividad enzimática específica correspondiente.

Tabla 14. Tratamiento de datos de actividad enzimática antes y después de purificación.*

	Rep	Extracto Crudo		Extracto Purificado	
		EA	Q-Dixon	EA	Q-Dixon
<i>Fusarium</i> OGYE	A	11,57	0,000	-46,30	0,455
	B	11,57	1,000	11,57	0,182
	C	23,15	0,000	34,72	0,182
	D	23,15	0,000	81,02	0,364
<i>Bacillus</i> PCB	A	23,15	1,000	34,72	0,727
	B	34,72	0,000	219,91	0,045
	C	34,72	0,000	231,48	0,227
	D	34,72	0,000	289,35	0,227
<i>Bacillus</i> NUTRITIVO	A	34,72	0,286	60,19	0,058
	B	57,87	0,286	156,48	0,086
	C	57,87	0,286	300,93	0,086
	D	115,74	0,714	1733,33	0,856

*En color rojo se muestran los resultados de la prueba de Q que indican inconsistencias.

EA=Actividad Enzimática (U/L). Fuente: Autor.

Tabla 15. Biomasa en peso seco y actividad enzimática específica (SEA).*

	Extracto Crudo			Extracto Purificado			R	P
	EA Prom	Biomasa	SEA	EA Prom	Biomasa	SEA		
<i>Fusarium</i> OGYE	19,29	1,26	15,25	42,44	4,80	8,84	220%	0,58
<i>Bacillus</i> PCB	34,72	4,91	7,07	246,91	0,80	308,64	711%	43,64
<i>Bacillus</i> NUT	50,15	4,37	11,49	172,53	2,90	59,49	344%	5,18

*EA Prom=Actividad Enzimática promedio con exclusión de datos (U/L). Biomasa (mg/ml).

SEA=Actividad Enzimática Específica (U/mg). R= Rendimiento. P=Veces de purificación.

Fuente: Autor.

La actividad enzimática específica explica la cantidad de material celular y proteico en miligramos, que se requiere para producir cierta actividad de lacasa en unidades por litro, lo que quiere decir que antes del proceso de purificación *Fusarium sp* usa una mínima cantidad de biomasa para producir actividad enzimática considerable, mientras que para originar la misma actividad enzimática *Bacillus sp* necesita mayor contenido proteico y por tanto un mayor volumen de suspensión de extracto crudo. Contrariamente, después de la partición trifásica los papeles se intercambian, siendo más productiva una mínima cantidad de biomasa en *Bacillus sp* que en *Fusarium sp*.

Ahora bien, para facilitar la evaluación de productividad enzimática (equivalente a la actividad específica) en la fase posterior a la purificación, se tiene el porcentaje de rendimiento que muestra en qué medida es viable aplicar la partición trifásica, considerando la actividad enzimática inicial como un 100%, y por lo mismo, que cualquier valor superior indica que la purificación fue exitosa al producir mayor actividad enzimática, partiendo del mismo volumen de extracto crudo.

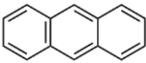
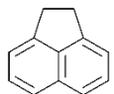
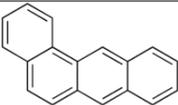
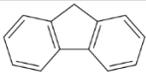
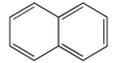
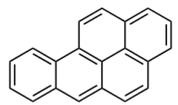
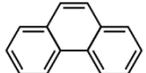
En este sentido las dos cepas microbianas arrojaron porcentajes de rendimiento mayores al 200%, lo que indica que la actividad enzimática incrementó más del doble, un comportamiento normal para la partición trifásica que puede tener rendimientos entre 100 y 1000% para diferentes enzimas (Rajeeva, 2011), particularmente pueden ser iguales o superiores al 160% en lacasas fúngicas y al 300% en lacasas bacterianas. Adicionalmente el grado de purificación es bastante variable, pero puede encontrarse cercano a 8 y 10 veces la actividad específica, de forma que las veces de purificación obtenidas para *Bacillus sp* en medio PCB resultan bastante altas conforme al promedio y por esta razón se decide trabajar más adelante únicamente con los extractos enzimáticos provenientes de los medios OGYE y Nutritivo (Dennison & Lovrien, 1997) (Vinoth, Sathayaselvabala, Premkumar, Vidyadevi, & Sivanesan, 2011).

CAPÍTULO 4: Efecto de *Lacasa microbiana* sobre HAPs.

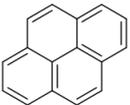
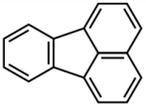
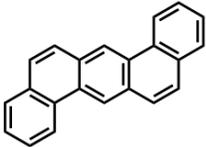
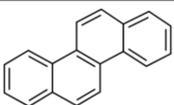
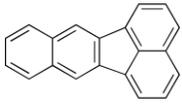
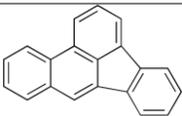
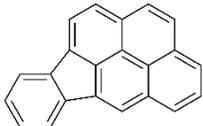
4.1. Propiedades Físico-Químicas de los HAPs.

Los hidrocarburos poliaromáticos se componen por dos o más anillos de benceno fusionados, son no polares, altamente hidrofóbicos, con baja solubilidad en el agua que disminuye con forme aumenta el número de anillos (García Martínez, 2005). Estas sustancias poseen la mayor variabilidad estructural en la naturaleza con distintos pesos moleculares, si se compara con las demás moléculas no halogenadas, así mismo su composición química es variable y compleja; estas características se encuentran contenidas en la Tabla 14 (Kadri et al., 2017). (Quinceno Pérez & Rios Osorio, 2014).

Tabla 16. Propiedades físico-químicas de algunos HAPs.

HAP	ESTRUCTURA QUÍMICA	FÓRMULA QUÍMICA	MASA MOLAR (g/mol)	DENSIDAD (g/cm ³)	SOLUBILIDAD (mg/L)
Antraceno		C ₁₄ H ₁₀	178,22	1,28	0,015
Acenafteno		C ₁₂ H ₁₀	154,2	1,2	NR
Benzo (a) antraceno		C ₁₈ H ₁₂	228,3	1,28	NR
Fluoreno		C ₁₃ H ₁₀	166,22	1,2	NR
Naftaleno		C ₁₀ H ₈	128,18	1,14	30
Benzo (a) pireno		C ₂₀ H ₁₂	252,31	1,4	0,0038
Fenantreno		C ₁₄ H ₁₀	178,23	1,18	1 a 2

Continuación Tabla 16. Propiedades físico-químicas de algunos HAPs.*

Pireno		C16H10	202,26	1,27	0,12 a 0,18
Fluoranteno		C16H10	202,26	1,25	0,25
Dibenzo (a,h) antraceno		C22H14	278,36	1,23	NR
Criseno		C18H12	228,29	1,27	NR
Benzo (k) fluoranteno		C20H12	252,32	1,28	NR
Benzo (b) fluoranteno		C20H12	252,31	1,27	NR
Benzo (g,h,i) perileno		C22H12	276,33	1,24	NR
Indeno (1,2,3cd) pireno		C22H12	276,33	1,07	NR

*NR=No reporta solubilidad, los valores son tan bajos que no tienen gran relevancia. Fuente: Kadri et al. (2017), Martínez Jara (2017).

4.1.1. Técnicas de análisis químico de HAPs en agua

Estos hidrocarburos al entrar en el agua se adsorben rápidamente en el material particulado, quedándose en los sedimentos y condicionando la concentración a ser menor en la columna de agua que en el depósito de los cuerpos hídricos (García Martínez, 2005). Por esta razón suelen encontrarse en niveles traza y requieren instrumentación analítica avanzada para su análisis, al respecto la EPA establece el método 610 para análisis químico orgánico de aguas residuales

municipales e industriales, y el método 510 para determinar HAP en agua potable mediante cromatografía de líquidos (Díaz, Alfaro, & Garza, 2001); igualmente el Registro Estatal de Emisiones y Fuentes Contaminantes de España (2013) propone la determinación por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC/Fluorescencia), la medición por fluorescencia UV tras cromatografía en capas finas y la evaluación por cromatografía en fase gaseosa como posibles técnicas para análisis de HAP.

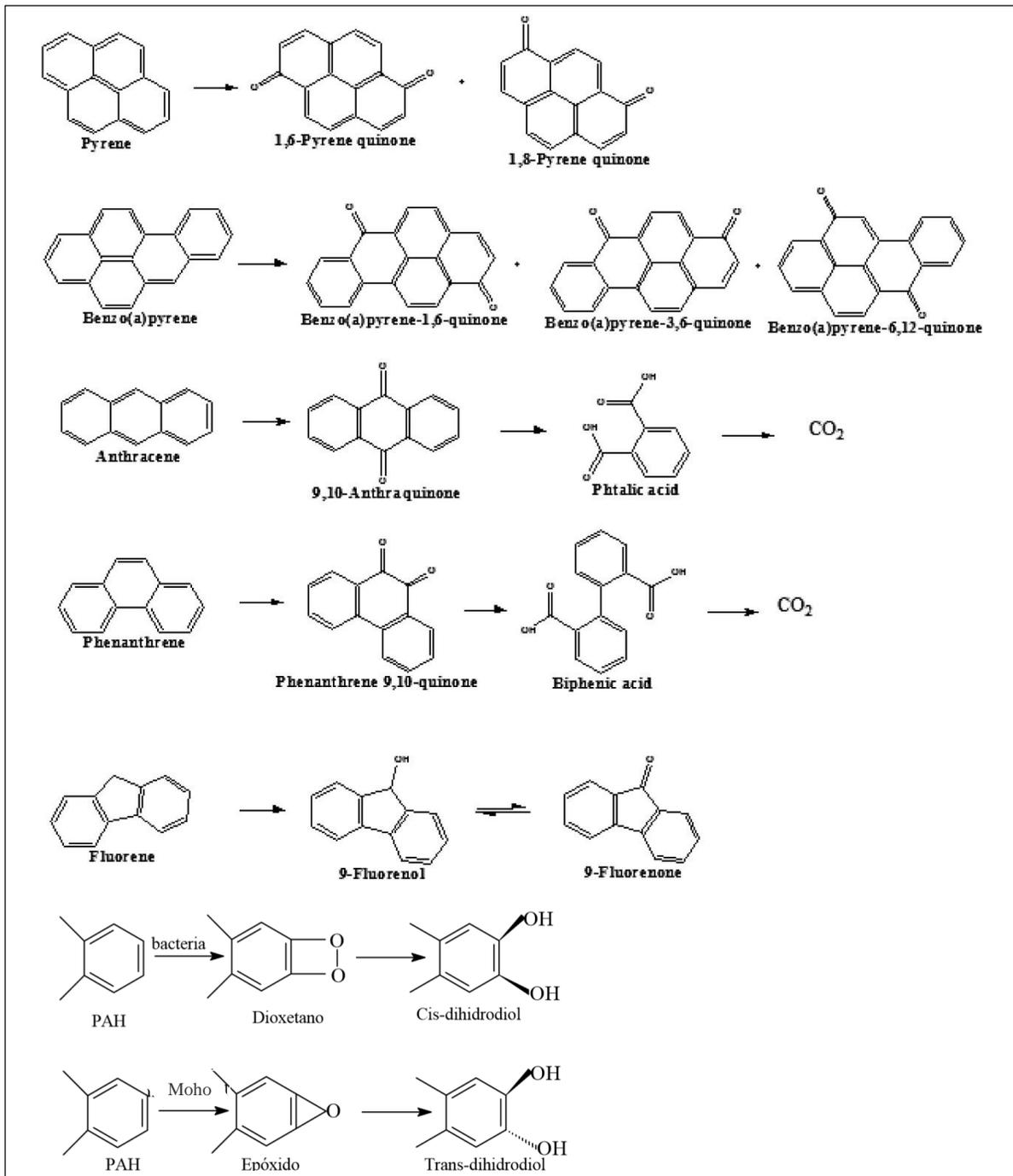
4.2. Biotransformación de HAP en el agua

Debido a la capacidad que poseen los microorganismos para transformar compuestos hidrocarbonados, se emplean en la recuperación de ambientes contaminados con HAPs (Bracho, Díaz, & Soto, 2004), usando generalmente productos metabólicos que permitan la oxidación de los contaminantes, sin necesidad de producir un crecimiento directo en los cuerpos de agua.

El proceso biorremediador depende directamente de los mecanismos de sorción, adsorción o desorción que determinan la accesibilidad de los contaminantes para ser degradados, de forma que en ocasiones se requieren estrategias de intensificación, con el uso de potenciadores metabólicos de los microorganismos, que apoyen las técnicas de biotransformación y mejoren sus resultados (Quinceno Pérez & Rios Osorio, 2014). Así mismo la tasa de biorremediación está ligada a las condiciones ambientales, el tipo de microorganismo del que se obtiene el producto metabólico, la naturaleza y estructura del compuesto a eliminar (Kadri et al., 2017).

Las enzimas microbianas, entre ellas las lacasas, se consideran una opción eficaz para la degradación de HAPs, con factores ligados directamente al nivel de biodegradación como el oxígeno, la accesibilidad de los nutrientes y las condiciones óptimas de pH y temperatura para las enzimas (Kadri et al., 2017). La lacasa actúa como catalizador en la oxidación de cuatro electrones de los compuestos ricos en radicales libres, con la reducción simultánea de O₂ a agua (Bautista, Morales, & Sanz, 2015). Esta oxida los HAP a dihidroles que con una segunda oxidación pueden ser llevados a catecoles y finalmente a CO₂ y agua, si es proveniente del metabolismo bacteriano se producen cis-dihidrodióles a través de un dióxetano, mientras que al ser lacasas fúngicas se producen trans-dihidrodióles con la formación previa de un epóxido (García Martínez, 2005). Se pueden encontrar en la Figura 25 los productos obtenidos después de oxidación por parte de metabolitos microbianos para el caso de algunos HAP.

Figura 25. Productos de la oxidación de HAPs.*



*Productos de la oxidación de pireno, benzo(a)pireno, antraceno, fenantreno y fluoreno. Los dos últimos corresponden a la acción de lacasas propias del metabolismo microbiano. Fuente: Kadri et al. (2017), García Martínez (2005).

4.3. Metodología

4.3.1. Preparación del analito

Con fines de preparación de una muestra inicial de agua, que tuviera contenida la mayor variedad de hidrocarburos aromáticos policíclicos, se realizó un montaje para introducir gases provenientes de la combustión incompleta de gasolina y carbón (Trujillo Mejía, 2010), que consistía en un bidón con agua destilada al cual se conectó de forma hermética una manguera plástica y un embudo en el extremo (Figura 26), para permitir la entrada de humo procedente de los tubos de escape de un vehículo automotor y de una chimenea.

*Figura 26. Montaje de preparación de agua contaminada con HAPs.**



*Fuente: Autor.

Posteriormente se cerró el bidón y se almacenó en un lugar frío, cubriéndolo con papel de aluminio para proteger la muestra de la luz solar, tratando de prevenir su degradación debido a la inestabilidad fotoquímica que poseen (Chirino Betancourt, Benzo, & Fernández, 2015). La muestra fue enviada al laboratorio SGS Colombia S.A.S, siguiendo el protocolo de refrigeración y entrega de cuatro litros en frascos de vidrio con tapa de tetrafluoroetileno (TFE), donde se realizó el análisis químico por el método EPA 610-GC/FID.

4.3.2. Biotransformación de HAP con el uso de lacasa

En este proceso se retomaron las suspensiones de crecimiento microbiano hechas en agar OGYE y Nutritivo con 17 días de crecimiento, se tomaron 120 ml de cada una y se realizó

purificación por partición de tres fases. El complejo proteico fue homogenizado en 150 ml de buffer acetato pH 7 con posterior adición a la muestra contaminada.

Para la preparación de la mezcla de reacción se tomaron las proporciones usadas previamente en la medición fotométrica, poniendo en 31,25 ml de solución un 80% de enzima purificada junto con 10% de buffer acetato 0,1 M pH 5 y 10% de ABTS al 50%, esta composición se aforó a 1 litro con el agua hidrocarbonada, con el objetivo de alcanzar una concentración cercana a 5 U/L y 20 U/L para cada 100 ml de agua. El proceso se realizó directamente en frascos de vidrio con tapa de TFE, dejándolos en incubación por 24 horas a 25°C, para llevarlos posteriormente al análisis químico de HAPs. (Alcalde, Bulter, & Arnold, 2002; Eibes González, 2007).

4.4. Resultados y análisis

Para conocer la cantidad de lacasa que fue utilizada en ambas muestras, basta con la realización del cálculo respectivo de la actividad enzimática (U/L) total en 100 ml de solución con buffer pH 7, que se puede ver en la Tabla 17.

Tabla 17. Cálculo de U/L de lacasa por muestra de HAPs.*

Muestra con lacasa fúngica	Muestra con lacasa bacteriana
$\frac{(42.44 \text{ U/L})(100 \text{ ml})}{15 \text{ ml} * 40} = 7.073 \text{ U/L}$	$\frac{(172.53 \text{ U/L})(100 \text{ ml})}{15 \text{ ml} * 40} = 28.75 \text{ U/L}$
Actividad enzimática después de purificación=	42.44 U/L (<i>Bacillus</i>) 172.53 U/L (<i>Fusarium</i>)
Total de solución buffer + lacasa purificada=	100 ml
Solución medida inicialmente =	15 ml
Factor de dilución para U/L por cada 100ml =	40

*En negrita la actividad enzimática de lacasa agregada por cada 100 ml de muestra. Fuente: Autor.

A partir de las alícuotas enviadas para el análisis químico en laboratorio certificado, se reportan los resultados antes y después de la inoculación con lacasa microbiana en la Tabla 18, se especifican los valores obtenidos para un total de 19 hidrocarburos aromáticos policíclicos, dos de los cuales no muestran reducción alguna en la concentración con ninguno de los tipos de lacasa y uno que solo disminuye con el uso de lacasa bacteriana, también contiene los porcentajes de remoción de cada contaminante. De igual manera fue reportada la presencia de decafluobifenilo,

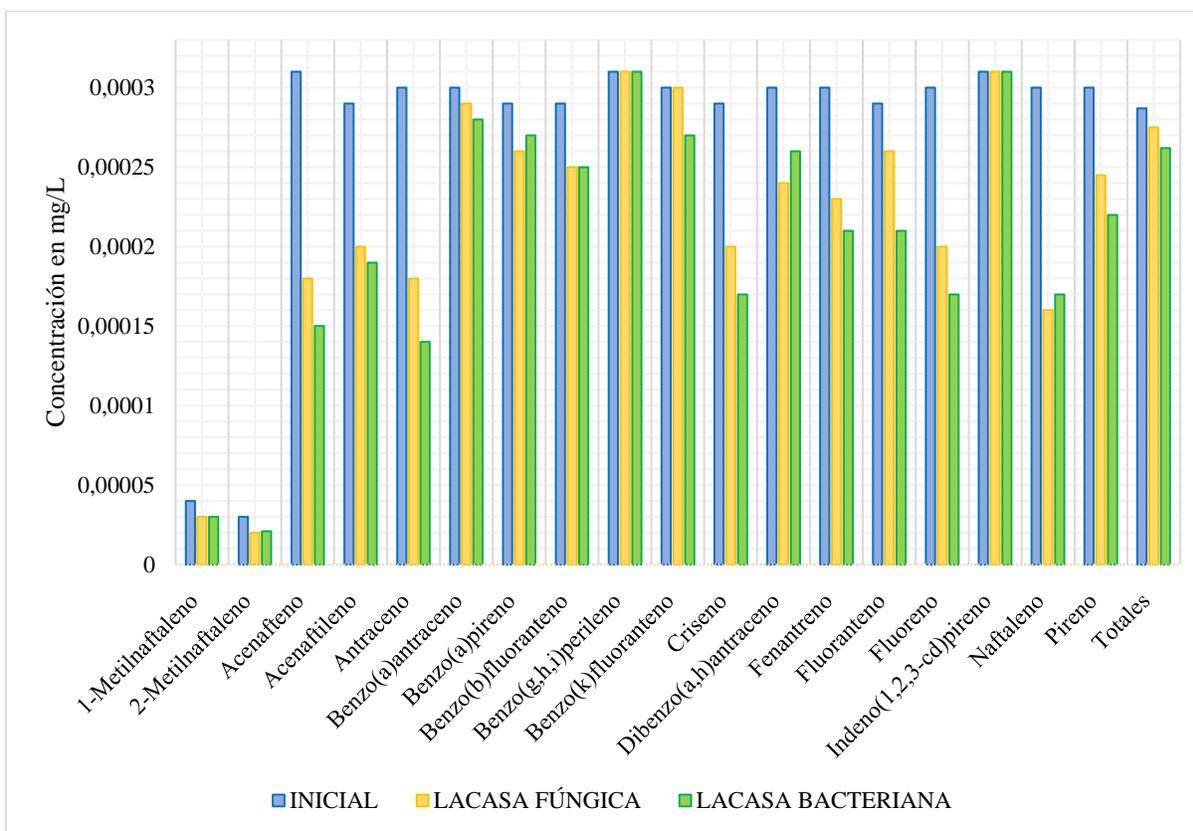
sin embargo su baja concentración no se hace detectable para cuantificación mediante la técnica (Anexo 5).

Tabla 18. Resultados del análisis químico de HAPs.

COMPUESTO	Inicial	Lacasa Fúngica		Lacasa Bacteriana	
	(mg /L)	(mg /L)	% Rem	(mg /L)	% Rem
1-Metilnaftaleno	0.00004	0.000030	25%	0.000030	25%
2-Metilnaftaleno	0.00003	0.000020	33%	0.000021	30%
Acenafteno	0.00031	0.00018	42%	0.00015	52%
Acenaftileno	0.00029	0.00020	31%	0.00019	34%
Antraceno	0.00030	0.00018	40%	0.00014	53%
Benzo(a)antraceno	0.00030	0.00029	3%	0.00028	7%
Benzo(a)pireno	0.00029	0.00026	10%	0.00027	7%
Benzo(b)fluoranteno	0.00029	0.00025	14%	0.00025	14%
Benzo(g,h,i)perileno	0.00031	0.00031	0%	0.00031	0%
Benzo(k)fluoranteno	0.00030	0.00030	0%	0.00027	10%
Criseno	0.00029	0.00020	31%	0.00017	41%
Decafluobifenilo	0,00000	0,00000	-	0,00000	-
Dibenzo(a,h)antraceno	0.00030	0.00024	20%	0.00026	13%
Fenantreno	0.00030	0.00023	23%	0.00021	30%
Fluoranteno	0.00029	0.00026	10%	0.00021	28%
Fluoreno	0.00030	0.00020	33%	0.00017	43%
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0.00031	0.00031	0%	0.00031	0%
Naftaleno	0.00030	0.00016	47%	0.00017	43%
Pireno	0.00030	0.000245	18%	0.00022	27%
Totales	0.000287	0.000275	4%	0.000262	9%
Promedio			20%		25%

*En rojo las concentraciones que no disminuyen después del tratamiento. En verde los porcentajes de remoción mayores o iguales al 40%. Fuente: Autor, Laboratorio SGS Colombia SAS.

Figura 27. Comparación de concentraciones de HAPs.*



*Fuente: Autor.

Las Figuras 27 y 28 muestran la diferencia entre las concentraciones y los porcentajes de remoción encontrados en las tres situaciones: la muestra de agua contaminada con hidrocarburos, el uso de lacasa purificada proveniente de *Fusarium sp*⁹ y de *Bacillus sp*¹⁰. Para efectos del análisis se determinó la tasa de remoción promedio que generaron los dos tipos de lacasa, siendo de 22,5% y enmarcada en la figura 28 como la línea horizontal de color naranja.

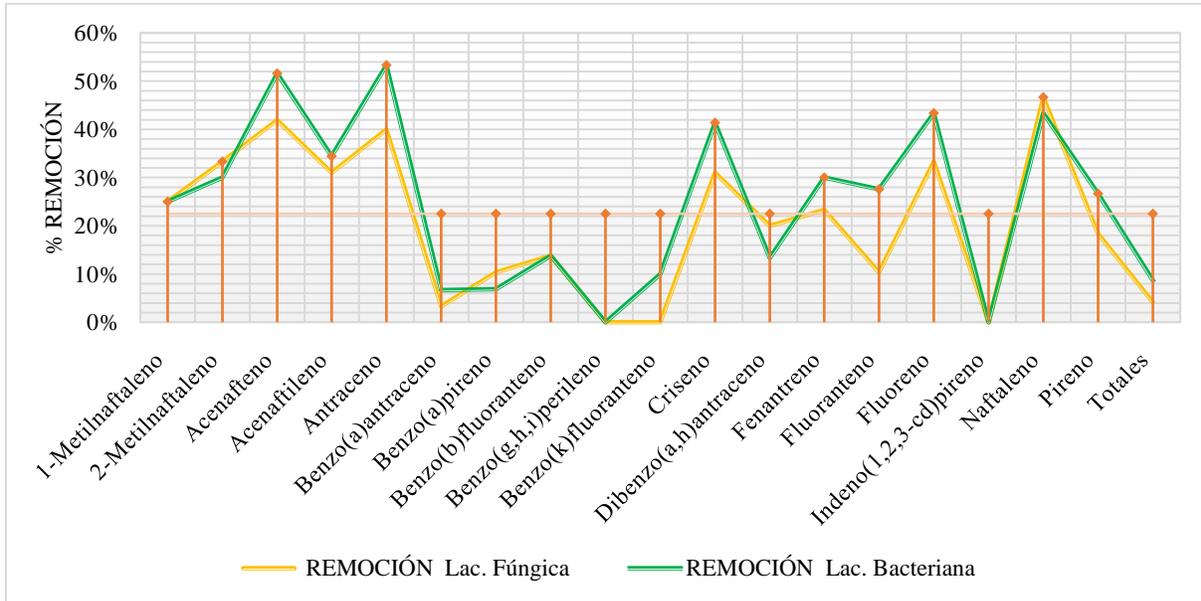
Se observa que el 1-metilnaftaleno y 2-metilnaftaleno presentan concentraciones bajas en las tres muestras, con una mínima disminución después del tratamiento con ambas lacasas, aun así posee un porcentaje alto de remoción cercano al promedio; particularmente el 2-metilnaftaleno se ve disminuido en mayor proporción por LacFuP que por LacBaP, al igual que el naftaleno,

⁹ En adelante entiéndase como lacasa fúngica o lacasa de *Fusarium sp* con la abreviatura LacFu para el extracto crudo y LacFuP para el extracto purificado.

¹⁰ En adelante entiéndase como lacasa bacteriana o lacasa de *Bacillus sp* con la abreviatura LacBa para el extracto crudo y LacBaP para el extracto purificado.

benzo(a)pireno, y dibenzo(a,h)antraceno, estos dos últimos por debajo de la media de remoción, mientras que el naftaleno cuenta con la mayor eliminación para lacasa de *Fusarium sp.*

Figura 28. Comparación porcentajes de remoción de HAPs.*



*Fuente: Autor.

Por parte de los compuestos que mostraron mayores tasas de remoción, el acenafteno, acenaftileno, antraceno, criseno y fluoreno, coinciden en tener una disminución de la concentración más marcada con el uso de LacBa, aunque todos superan el promedio de remoción, específicamente el antraceno cuenta con el porcentaje más representativo para lacasa bacteriana; es debido mencionar que el comportamiento del criseno y el fluoreno es muy similar, con diferencia entre las tasas de remoción de LacBaP y LacFuP de 10%.

En sentido contrario el benzo(a)antraceno, el benzo(b)fluoranteno y los hidrocarburos totales se encuentran entre los porcentajes más bajos de remoción, con acción mayor de LacBa para los dos primeros, e igual representatividad de lacasa fúngica y bacteriana para el tercero. Los compuestos que tienen tasas de remoción cercanas a la media son 1-metilnaftaleno, dibenzo(a,h)antraceno, fenantreno, fluoranteno y pireno, siendo el fluoranteno mas variable para los dos tipos de lacasa, con un porcentaje de diferencia del 18% entre LacBaP y LacFuP.

Adicionalmente, el benzo(g,h,i)perileno y el indeno(1,2,3-cd)pireno están exentos de disminución de su concentración en ambos tratamientos, al igual que el benzo(k)fluoranteno únicamente frente al tratamiento con LacFuP y con una baja remoción por parte de LacBaP.

En resumen, el tratamiento que presentó tasas de remoción más altas fue el realizado con lacasa de *Bacillus sp*, viendo que generalmente las bacterias son más eficientes en la degradación metabólica de HAPs, debido a la necesidad que presenta el metabolismo fúngico de producir cometabolitos (en este caso enzimas complementarias como las peroxidasas) para su degradación (Lladó Fernández, 2012). Es importante mencionar que 1 U/L de LacFuP produjo un 2.84 % de remoción total de hidrocarburos aromáticos policíclicos, mientras que 1 U/L de LacBaP tiene una tasa de 0.87 %, lo que indica que en términos de efectividad del tratamiento, existe un mejor comportamiento para lacasa fúngica.

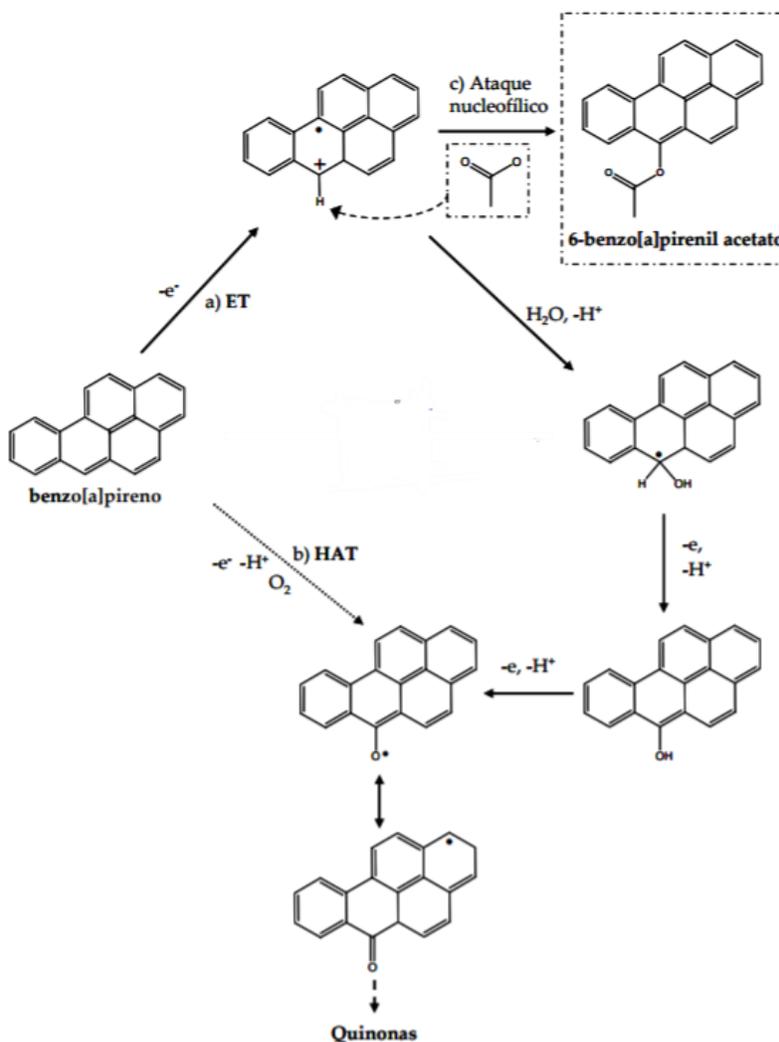
Generalmente las especies bacterianas no son capaces de transformar benzo(a)pireno cuando se usa como única fuente de carbono, sin embargo, se ha demostrado que al fomentar la producción metabólica con el uso de una fuente de carbono diferente, se puede lograr la oxidación a cis-dihidrodiol y la reducción de O₂ a agua. De forma que se evidencia la disminución de la concentración de este compuesto aunque con un menor porcentaje para LacBa que para LacFu (Ye, Siddigi, Maccubin, Kumar, & Sikka, 1995).

También se observa que la complejidad en las estructuras de los contaminantes y su peso molecular, influyen directamente en la efectividad de cada tipo de lacasa; en este sentido las enzimas bacterianas pueden no ser capaces de degradar de forma eficiente los HAP de 4 o más anillos aromáticos, por lo cual compuestos como el pireno y el dibenzo(a, h)antraceno mostraron más eficiencia con el tratamiento de LacFuP (Lladó Fernández, 2012; Solanas, 2009).

La lacasa en la oxidación de HAPs está dirigida por el uso de un mediador y por el tipo de metabolismo microbiano, con la opción de tomar dos rutas alternas en la reacción. La primera es utilizar la transferencia de electrones (ET) aprovechando la diferencia entre las energías de disociación, producida por los enlaces rotos en los hidrocarburos (C-H) y formados en el mediador (RO-H, en este caso el ABTS), dando lugar a la sustracción de un anillo del HAP y formando su radical catiónico, el cual puede originar un intermediario por el ataque nucleofílico de los aniones de acetato que existen en el medio. Esta vía es más común para lacasa de *Bacillus sp*, que es anaerobio facultativo con metabolismo fermentativo (Rodríguez Millán, et al. 2013), y por tanto

requiere de una sustancia adicional para extraer los electrones y oxidar el sustrato. La segunda ruta no produce el intermediario, debido a la formación de radicales libres con la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT), y utiliza el oxígeno del medio para obtener energía, junto con la formación de los enlaces en ABTS y una posterior oxidación del sustrato. Este es el caso de LacFu, cuyo organismo de origen es aerobio estricto con metabolismo oxidativo (Davis, 2012). (Cañas Portilla, 2009). Por esta razón la lacasa de *Fusarium sp* resultó más eficiente en el tratamiento de HAPs, debido a la posibilidad de tener mayor energía en las reacciones, producto del mediador y del oxígeno molecular. En la figura 29 se muestra el ejemplo de oxidación de benzo(a)pireno con las diferentes rutas explicadas anteriormente.

Figura 29. Oxidación con lacasa de benzo(a)pireno.



*Fuente: Autor.

CAPÍTULO 5: Selección de especie con análisis estadístico.

5.1. Pruebas de estadística inferencial

Para comenzar, las pruebas estadísticas inferenciales permiten confirmar una propiedad que se cree que tiene una población, a partir de la observación de una muestra y llevando como procedimiento la formulación de hipótesis poblacionales, con posterior elección de la prueba adecuada para su aplicación y contraste (Sábado, 2009).

Los test inferenciales pueden clasificarse en paramétricos y no paramétricos, los primeros son formulados a partir de supuestos o características paramétricas que debe tener la muestra, relacionadas con el ajuste a distribuciones conocidas previamente y que, en caso de no cumplirse, pueden originar errores en el desarrollo de los mismos y lógicamente conclusiones equivocadas (Marín, Jiménez, & Hernández, 2015). Los segundos, por lo contrario, no requieren distribución particular, por lo que comúnmente se denominan “Test de libre distribución”, que generalmente obtienen sus resultados con métodos de observación y recuento (Sábado, 2009).

Ahora bien, los supuestos que se manejan generalmente en las pruebas paramétricas son (Marín, Jiménez, & Hernández, 2015):

- a. Los valores de la variable dependiente siguen una distribución normal.
- b. Las varianzas son aproximadamente iguales, es decir hay homogeneidad de varianzas u homoscedasticidad.
- c. Las muestras de las que se obtiene la variable dependiente, son independientes entre ellas.

5.1.1. Análisis de varianza (ANOVA)

El ANOVA¹¹ es una potente herramienta estadística, ideada por R, A Fisher, que tiene gran utilidad en la industria para el control de procesos y en el laboratorio de análisis para el control de métodos analíticos. Esta prueba paramétrica de significación, ayuda al estudio de la diferencia entre las medias de varias poblaciones (Marín, Jiménez, & Hernández, 2015), mediante el cálculo de la probabilidad que existe de encontrar medias muestrales con igual o mayor disparidad que las

¹¹ Por sus siglas en ingles Analysis of Variance, también llamado ADEVA.

analizadas (Prieto Valiente & Herranz Tejedor, 2010). Concretamente, determina que porcentaje de la variación entre las medias puede ser explicado mediante el error intrínseco de las medidas experimentales, o mediante el factor que diferencia los grupos muestrales, denominado factor controlado o efecto fijo (Serrano Gallego, 2003). Específicamente cuando existe un solo factor controlado o aleatorio, se hablará de ANOVA unifactorial, es decir que la media de cada variable solo depende de un factor conocido que es la muestra a la que pertenece (Moynihan, 2005).

5.1.2. Prueba t de Student

La prueba t de Student-Fisher, desarrollada por William Seally Gosset, se deriva de la familia de distribuciones simétricas t con forma de campana, es decir que se encuentran en una distribución normal, aclarando que la forma cambia a medida que varía el tamaño de la muestra. Se emplea para comparar diferencias entre los promedios de dos muestras de tamaño menor a 30, que pueden tener observaciones independientes o apareadas. (Moncada Jiménez, 2005; Sánchez Turcios, 2015). Particularmente, la prueba t de student para muestras independientes, debe usarse para comparar la media de una variable cuantitativa, entre dos grupos muestrales distintos cuando sean distintos, es decir que los sujetos pertenecientes a un grupo son diferentes a los de otro (García Bellido, González Such, & Jornet Meliá, 2010; Guardia & Peró, 2001).

5.2. Metodología

Para los análisis estadísticos se empleó el software IBM® SPSS Statistics®. Creando inicialmente una base de datos que proporcionara todos los datos relacionados con el modelo (García Bellido, González Such, & Jornet Meliá, 2010):

Variables Independientes:

- Tipo de microorganismo para extracción de lacasa.
- Muestra de agua con HAPs.
- Muestra de agua inoculada con lacasa microbiana.

Variables Dependientes:

- Actividad enzimática de lacasa.
- Concentración de HAPs.
- Porcentaje de remoción de HAPs.

Adicionalmente se requirió plantear las hipótesis a corroborar:

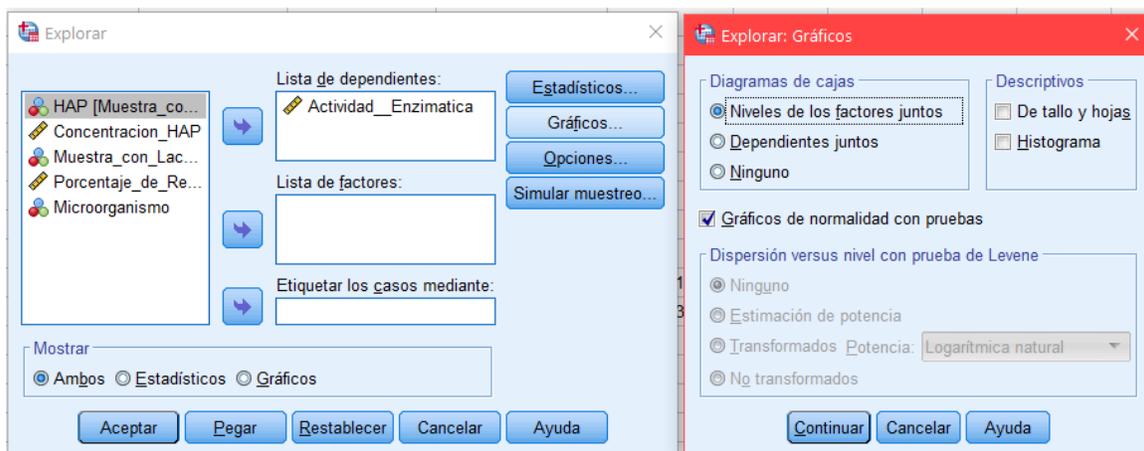
- H_0 (Hipótesis nula): No existe diferencia significativa en las medias de las poblaciones muestrales.
- H_1 (Hipótesis alternativa): Al menos una de las medias de las poblaciones muestrales presenta diferencia frente a las demás.

5.3.1. Validación de Supuestos

El Software provee la técnica analítica específica para la validación de los supuestos de normalidad y homoscedasticidad, aunque solo fue necesario realizar la primera de forma individual, que se toma como Kolmogorov y Smirnov para menos de 50 datos y como Shaphiro Wilk para más de 50, y la homogeneidad de varianzas se calculó junto con los métodos de análisis de medias.

Para iniciar con la validación de normalidad, en la base de datos se abrió la pestaña *Analizar*, luego se seleccionó la opción *Estadísticos descriptivos y Explorar*, donde posteriormente apareció la ventana correspondiente (Figura 29). Allí fue necesario seleccionar las parejas de variables, poniendo la variable dependiente en el recuadro *Lista de dependientes*, luego se abrió la opción *Gráficos* y se seleccionó *Gráficos de normalidad con pruebas*, se oprimió en aceptar e inmediatamente el software arrojó los cálculos en la ventana de resultados.

Figura 30. Procedimiento prueba de normalidad en SPSS.*

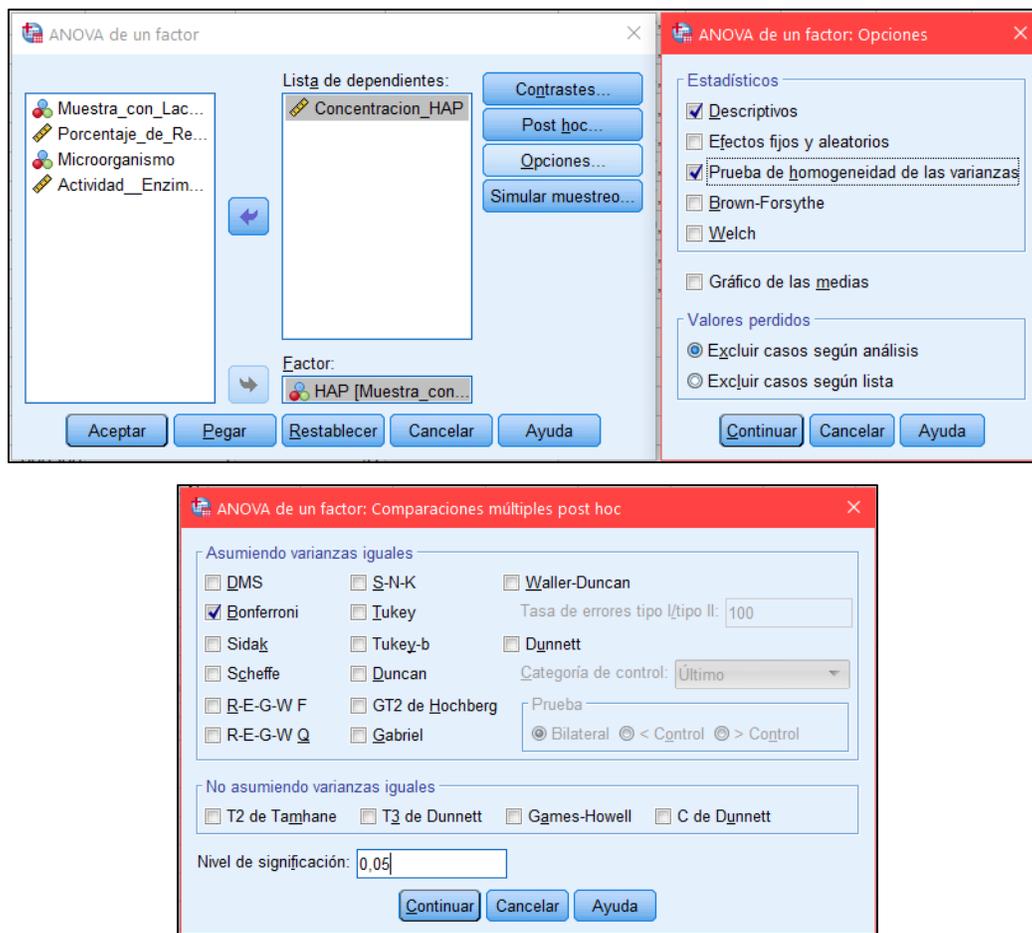


*Fuente: Autor.

5.2.2. Prueba de ANOVA unifactorial

Para el análisis de varianza, se procedió a seleccionar la pestaña *Analizar*, luego la opción *Comparar medias* y *ANOVA de un factor*, de ahí se abrió la ventana respectiva en donde se colocó la variable dependiente en *Lista de dependientes* y la independiente en *Factor*, teniendo en cuenta que deberían ser variables con más de 2 poblaciones muestrales (Figura 30). Después fue necesario abrir *Opciones* y elegir los estadísticos *Descriptivos* y *Prueba de homogeneidad de las varianzas*, que el software toma como el test de Levene, dando la opción de continuar; a continuación se abrió *Post hoc* y se seleccionó la comparación de varianzas múltiples asumiendo varianzas iguales mediante la prueba *Bonferroni*, con un nivel de significación entre 0.05 y 0.1. De forma inmediata, el programa estadístico mostró los datos en la ventana de resultados (Serra Año, Ponce Darós, López Bueno, González Moreno, & García Massó, 2014).

Figura 31. Procedimiento prueba de ANOVA unifactorial en SPSS.*

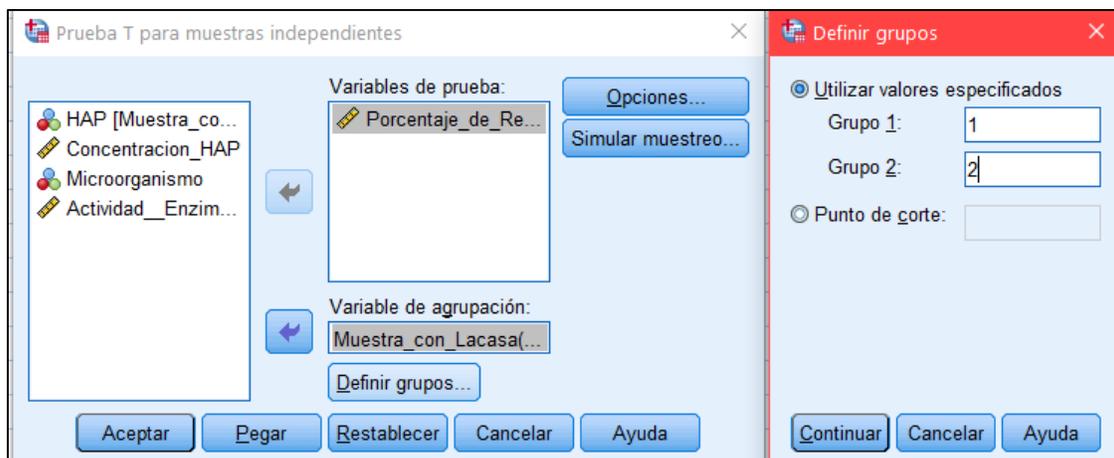


*Fuente: Autor.

5.2.3. Prueba t de Student para muestras independientes

En esta prueba se siguieron los pasos iniciales de igual forma que para el ANOVA hasta comparación de medias, de ahí en adelante se abrió la ventana de la *Prueba T para muestras independientes*, en donde se ubicó la *Variable de agrupación* como la variable dependiente que manifestaba la necesidad de *Definir grupos*, poniendo respectivamente los números asignados a las dos poblaciones muestrales, y la variable independiente se localizó en las *Variables de prueba* (Figura 31) (García Bellido, González Such, & Jornet Meliá, 2010).

Figura 32. Procedimiento prueba t de Student para muestras independientes en SPSS.*



*Fuente: Autor.

5.3. Resultados y Análisis

Los resultados concretos de los análisis estadísticos arrojados por el software SPSS pueden encontrarse en el Anexo 4.

5.3.1. ANOVA de producción de lacasa microbiana

El conjunto de datos relacionados con la producción de lacasa microbiana mostró validación del supuesto de normalidad, con el estadístico de Kolmogorov-Smirnov, por tener menos de 30 datos; se acepta con un 95% de confianza la H_0 que representa una distribución normal ($E = 0.291$, $p > 0.05$, Sig. = 0.122), por lo tanto es válido iniciar con el ANOVA.

Respecto al test de homoscedasticidad, el estadístico de Levene permite aceptar la hipótesis nula, con un 95% de confianza, que afirma que existe homogeneidad en las varianzas, es decir que no son significativamente diferentes ($L [3, 8] = 2.578, p > 0.05, \text{Sig.} = 1.26 \text{ y } 2.60$).

Ahora bien, el ANOVA permite afirmar con un 90% de confianza que las medias encontradas en los conjuntos de datos respectivos son significativamente diferentes unas de otras, rechazando H_0 ($F [3, 8] = 3.833, p < 0.1, \text{Sig.} = 0.57$), es decir que las actividades enzimáticas difieren según el tipo de microorganismo que se esté analizando. Complementariamente el tamaño del efecto ($\eta^2 = 1.44$), indica que la variación de los resultados obtenidos para EA dependen significativamente del modelo que se manejó y no de las características intrínsecas de cada microorganismo (Serra Año et.al, 2014), en este sentido se puede afirmar que las condiciones externas como la temperatura, el tipo de sustrato y las fuentes de carbono y nitrógeno influyen en la síntesis enzimática de lacasa con *Bacillus sp* y *Fusarium sp* (Caudillo Pérez & Hernández Monjaraz, 2015).

Por otra parte las comparaciones múltiples hechas mediante la prueba de Bonferroni, dan cuenta de la diferencia existente en la producción de LacFu y LacBa, particularmente en las enzimas bacterianas purificadas que con una media de 199.073 U/L superan bastante la producción enzimática en el extracto crudo proveniente de *Fusarium sp* (Dif.medias [LacFu, LacBaP] = 179.78, $t [8] = 3.04, p < 0.1; \text{Sig.} = 0.97$).

Adicionalmente la comparación hecha entre las lacasas purificadas arroja un nivel de significancia insuficiente para rechazar la hipótesis nula que afirma la igualdad en actividades enzimáticas (Dif.medias [LacFuP, LacBaP] = 156.64, $t [8] = 2.65, p > 0.1; \text{Sig.} = 0.177$). No obstante la diferencia entre las medias es bastante alta y aunque la variabilidad de las unidades enzimáticas no se manifiesta en el estadístico t, es válido decir con un porcentaje de 80% de seguridad, que *Bacillus sp* es significativamente más productivo en actividad enzimática de lacasa purificada que *Fusarium sp*; es decir que existe un 17.7% de probabilidades de que la productividad de lacasa sea igual para ambos microorganismos o mayor para el hongo (Prieto Valiente & Herranz Tejedor, 2010).

5.3.2. ANOVA de concentraciones de HAPs

Las concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos en las tres muestras (inicial sin inóculo enzimático, con LacFuP, con LacBaP), no evidencian una distribución normal con la prueba de Shapiro-Wilk ($E = 0.810$, $p < 0.05$), y aunque Serra Añó et.al (2014) afirman que ANOVA es robusta para el no cumplimiento de este primer supuesto, se puede trabajar eliminando los datos extremos, de tal forma que se decide continuar con el análisis.

La homogeneidad de las varianzas es confirmada, se acepta H_0 con un 95% de confianza en el test de Levene, confirmando que no existe diferencia significativa entre las mismas ($L [3, 8] = 0.05$, $p > 0.05$, Sig. = 0.995)

En cuanto al estadístico F encontrado mediante ANOVA, existen grandes diferencias entre las medias de las concentraciones de las muestras, que se ven reflejadas por el 95% de confianza ($F [2, 47] = 3.363$, $p < 0.05$, Sig. = 0.43), lo que permite rechazar la hipótesis nula de que no existe variación entre las muestras de agua con hidrocarburos poliaromáticos.

Además el tamaño del efecto ($\eta^2 = 0.143$), muestra que un 10% de la variabilidad en los resultados es explicado por el modelo, es decir el tipo y la cantidad de lacasa microbiana adicionada, y por tanto un 90% depende de las propiedades inherentes a los sujetos evaluados, en este caso los HAPs; esto corrobora la explicación planteada en el capítulo anterior, afirmando que la efectividad de cada lacasa se encuentra ligada al tamaño de las estructuras de los HAPs y también a los pesos moleculares, mostrando mayor dificultad de degradación en estructuras más complejas y pesadas (de más de cuatro anillos aromáticos) (Lladó Fernández, 2012; Solanas, 2009).

Continuando con la prueba de Bonferroni, se observa una diferencia significativa entre la muestra sin inóculo y con inóculo bacteriano, lo que permite rechazar la H_0 con un 90% de confianza (Dif.medias [Inicial, con LacBaP] = 7.48×10^{-5} , $t [47] = 2.46$, $p < 0.1$; Sig. = 0.052), y afirmar que la concentración es mucho menor en la muestra con lacasa de *Bacillus sp*, con un valor promedio de 1.93×10^{-4} mg HAP/L. Si se observan las demás comparaciones, cabe la posibilidad de asegurar con un 80% de confianza que la diferencia entre la muestra inicial y la muestra con LacFuP es significativa, mayor para la segunda (Dif.medias [Inicial, con LacFuP] = 5.59×10^{-5} , t

[47] = 1.95, $p < 0.2$; Sig. = 0.169), aunque en otras investigaciones que manejen las mismas características muestrales existe la probabilidad de que ocurra una igualdad en las concentraciones (Prieto Valiente & Herranz Tejedor, 2010). Finalmente se evidencia que la diferencia entre las medias de las dos muestras con inóculo es insignificante, es decir que los dos tratamientos mostraron concentraciones iguales en promedio (Dif.medias [con LacBaP, con LacFuP] = 1.45×10^{-5} , $t [47] = 0.52$, $p > 0.1$; Sig. = 1).

5.3.3. Prueba t de Student de porcentajes de remoción de HAPs

Los valores calculados para el porcentaje de remoción de HAPs, cumplen con los supuestos usando las pruebas de Shapiro-Wilk y de Levene (E = 0.944, $p > 0.05$, Sig: 0.057; L = 0.321, $p > 0.05$, Sig. = 0.574), y aceptando las hipótesis nulas de normalidad e igualdad entre varianzas.

Con el fin de tener certeza de la diferencia existente en los porcentajes de remoción para LacFuP y LacBaP, se realiza la prueba asumiendo varianzas iguales ($t [36] = -0.803$, $p > 0.05$, Sig. = 0.428) y se confirma la hipótesis nula de una igualdad de la media en los dos casos, también es posible corroborar a partir del efecto ($r = 0.1326$) que la varianza se ve directamente afectada por las características del hidrocarburo y no por el modelo. Así mismo se reafirma que la efectividad tiende a ser mayor por lacasa de *Fusarium sp* que por *Bacillus sp*, debido a la diferencia de concentraciones de enzima manejada en cada una de las muestras, siendo menor para la primera, y teniendo en cuenta que la tasa de remoción es equitativa en ambas.

CAPÍTULO 6: Conclusiones y Recomendaciones

6.1. Conclusiones

- La isoforma de la enzima producida por *Fusarium sp* no manifiesta índice de potencia en las pruebas cualitativas por tratarse de una lacasa blanca o amarilla, al carecer del átomo de cobre que proporciona la coloración. Por otra parte la concentración más alta del inductor enzimático, permite la mayor coloración del sustrato por *Bacillus cereus*, dada a partir del día 4 de crecimiento microbiano.
- En la valoración cuantitativa de lacasa, hubo mayor efectividad con el método de filtración que con el de centrifugación en la obtención del extracto crudo enzimático, e igualmente mejora el comportamiento de la actividad enzimática con la disminución en la concentración del sustrato ABTS.
- La actividad enzimática específica (SEA) de lacasa, al ser mayor en el extracto crudo fúngico que en el bacteriano, indica que se requiere menor cantidad de biomasa de *Fusarium sp* para producir una unidad de actividad enzimática (EA), contrariamente en el extracto purificado es necesaria menos biomasa de *Bacillus sp*.
- La partición trifásica con proporción 1:1,1 de ter-butanol y 73% de sulfato de amonio, permite evidenciar la formación de tres fases en el complejo orgánico-salino; se corrobora que la técnica es viable para la purificación de lacasa en las especies estudiadas, con un rendimiento de 220% para *Fusarium sp* y de 344% para *Bacillus sp* y veces de purificación de 0.58 y 5.18 respectivamente, produciendo mayor actividad específica con el extracto puro bacteriano.
- Condiciones externas al cultivo microbiano como la temperatura, el tipo de sustrato e inductor, las fuentes de carbono y de nitrógeno tienen influencia directa en la producción de lacasa para ambos microorganismos.
- La actividad enzimática de lacasa purificada tiene un promedio de 199.07 U/L en *Bacillus sp*, superando estadísticamente la cantidad sintetizada por *Fusarium sp*, sin embargo existe

un 17.7% de probabilidades de que la productividad sea igual para ambos géneros o mayor para el segundo en mediciones próximas.

- Respecto a la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos, las isoformas enzimáticas presentan una eficiencia equitativa, aun así la mayor tasa de remoción que produce la lacasa de *Fusarium sp* se da en el naftaleno y en el caso de *Bacillus sp* es para antraceno, ambos tipos de enzima tienen la capacidad de transformar benzo(a)pireno pese a su complejidad estructural.
- En términos generales la efectividad de lacasa se encuentra ligada al tamaño y peso de las estructuras moleculares de HAP, evidenciándose en el presente estudio una mayor dificultad de transformación en estructuras de más de cuatro anillos aromáticos, como es el caso de benzo(g, h, i)perileno, indeno(1, 2, 3-cd)pireno que no presentan disminución en la concentración después de los tratamientos enzimáticos.
- Los tratamientos con lacasa de *Fusarium sp* y de *Bacillus sp*, presentan promedios de disminución de la concentración de HAP muy cercanos y porcentajes de remoción homogéneos, de forma que no se manifiesta distinción de los contaminantes poliaromáticos por una u otra isoforma de enzima.
- Entre las dos especies evaluadas se selecciona *Bacillus cereus* como la mejor en términos de productividad enzimática, y aunque en la disminución de HAPs no difiere significativamente entre los dos tipos de lacasa, es *Fusarium sp* quien produce la isoforma con mayor efectividad en el tratamiento, ya que se requiere menos cantidad de enzima para biotransformar en una tasa equivalente a la de *Bacillus sp*.

6.2. Recomendaciones

- Se recomienda realizar la clasificación taxonómica del microorganismo fúngico para profundizar en el comportamiento que tiene la especie en la síntesis de lacasa, así como estudiar la genética microbiana para conocer puntualmente los mecanismos de regulación enzimática.

- Valorar cualitativamente la producción enzimática de lacasa en *Fusarium sp*, con la variación de temperatura, los tipos de sustrato, concentración de inductores enzimáticos y condiciones de agitación.
- Evaluar el uso de diferentes concentraciones de ABTS en la medición fotométrica de lacasa, con el fin de poder identificar en qué punto se produce la mayor actividad enzimática.
- Realizar estudios de partición de tres fases para purificación de lacasa, que propongan distintos arreglos en la concentración de ter-butanol y la saturación de sulfato de amonio y den a conocer el nivel óptimo para enzimas de *Fusarium sp* y *Bacillus sp*.
- Profundizar en la biotransformación de HAPs por parte de LacFuP y LacBaP mediante el cambio en la mezcla de reacción, variación de tiempo, temperatura de incubación, concentración enzimática, teniendo en cuenta otros factores externos que puedan incidir en la remoción de estos contaminantes.
- Evaluar el potencial biotransformador de lacasas fúngicas y bacterianas de las especies trabajadas en este estudio, frente a otras sustancias de interés sanitario y ambiental como los plaguicidas y los contaminantes orgánicos persistentes (COPs).

Bibliografía

- Agencia de Noticias UN. (12 de Noviembre de 2015). En 20 años Colombia aumentó uso de plaguicidas en un 360 %. *Agencia de Noticias Universidad Nacional de Colombia*.
- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (06 de Mayo de 2016). *ATSDR USA en Español*. Recuperado el 02 de Agosto de 2017, de Resúmenes de Salud Pública - Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) [Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PHA)]: https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs69.html
- Albarracín Pardo, D. A. (2016). *Mejoramiento del medio de cultivo para producción de la lacasa recombinante POXA 1B de Pleurotus ostreatus en Pichia pastoris*. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá D.C.
- Albert, L. A. (1998). Compuestos Orgánicos Persistentes.
- Alcalde, M., Bulter, T., & Arnold, F. (2002). Colorimetric Assays for Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Fungal Laccases. *Journal of Biomolecular Screening*, 547-553.
- Antonio Revuelta, B. (2013). *Evaluación del potencial enzimático de macromicetos lignícolas del centro del estado de Veracruz*. Universidad Veracruzana, Facultad de Biología, Xalapa.
- Arana, A., Tellez, A., & González, T. (2002). Aspectos generales de la biodegradación de la Madera: Aplicaciones industriales de las Laccasas. *Biotecnología*, 40-45.
- Araujo, J., Yegres, F., Barreto, G., & Antequera, A. (2016). Biocatalizadores fúngicos hidrocarbonoclasticos del genero *Aspergillus* para la descontaminación de agua con Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (HPAs). *Revista Cubana de Química*, Vol. 28, 703-735.
- Bautista, L. F., Morales, G., & Sanz, R. (2015). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by laccase from *Trametes versicolor* covalently immobilized on amino-functionalized SBA-15. *Chemosphere*, 273-280.
- Becton Dickinson BD Brasil. (2017). *Products*. Recuperado el 18 de Septiembre de 2017, de BD BBL™ Crystal™ - Sistema de Identificação de Microrganismos Clinicamente Relevantes: <http://www.bd.com/scripts/brasil/productsdrilldown.asp?CatID=115&SubID=308&siteID>

=10056&d=brasil&s=brasil&sTitle=&metaTitle=Microbiologia&dc=brasil&dcTitle=BD
+--+Brasil

- Benavides Rodríguez, G. D., & Hermida Silva, A. M. (2008). *Aislamiento e identificación de flora bacteriana nativa de suelo de los páramos Cruz Verde y Guasca (Cundinamarca)*. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá D.C.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2007). *Bioquímica*. Barcelona: Reverté.
- Boqué, R. (2012). *El Límite de Detección de un Método Analítico*. Universitat Rovira i Virgili, Grupo de Quimiometría y Cualimetría, Tarragona.
- Bracho, M., Díaz, L., & Soto, L. M. (2004). Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y heterocíclicos por *Pseudomonas* spp. *CIENCIA*, 269-275.
- Breed, R. S., Murray, E. G., & Smith, N. R. (1957). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore.
- Brijwani, K., Rigdon, A., & Vadlani, P. V. (2010). Fungal Laccases: Production, Function, and Applications in Food Processing. *Hindawi Enzyme Research*, 10.
- Bustillo Pardey, A. E. (2010). *Método para Cuantificar Suspensiones de Esporas de Hongos y de otros Organismos*. Universidad Nacional de Colombia, Patología de Insectos, Palmira.
- Calvo, P., & Zúñiga, D. (2010). Caracterización Fisiológica de Cepas de *Bacillus* spp. Aisladas de la Rizósfera de Papa. *Ecología Aplicada*.
- Camarero Fernández, S., & Cañas, A. I. (2012). *Compuestos naturales como mediadores de las lacasas fúngicas: Mecanismos de acción y degradación de contaminantes aromáticos*. Académica Española.
- Cañas Portilla, A. I. (2009). *Diseño de nuevos sistemas lacasa-mediador: empleo de mediadores de origen natural y mejora de lacasas por evolución dirigida*. Universidad de Alcalá, Departamento de microbiología y parasitología, Madrid.
- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). *Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos*. Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa.

- Carrera Cabezas, M. D. (2009). *Producción de Bacillus thuringiensis, berliner a nivel de laboratorio*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Escuela de Bioquímica y Farmacia, Riobamba, Ecuador.
- Castañeda Álvarez, E., & Sánchez, L. C. (2016). Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género Bacillus sp., primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre Fusarium sp. *NOVA, Vol. 13*(No. 26), 53-65.
- Castells, X. E. (2000). *Reciclaje de Residuos Industriales*. Madrid, España: Díaz de Santos.
- Caudillo Pérez, C., & Hernández Monjaraz, W. S. (2015). *Medición de la actividad enzimática de laccasas en cepa silvestre 4287 y cepa mutante rho1::hyg de Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici bajo condiciones de inducción y en presencia de agentes quelantes*. Instituto Politécnico Nacional , Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería, Guanajuato.
- Chaparro Sosa, D. F., & Rosas Wanumen, D. C. (2006). *Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de madera en la reserva natural La Montaña del Ocaso*. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Quimbaya, Quindío.
- Chávez López, C., Esparza García, J. F., Hidalgo Lara, M. E., Loera Corral, O., & Rodríguez Vázquez, R. (2005). Producción de la enzima lacasa por el hongo Cladosporium cladosporoides en presencia de fenantreno. *VI Congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería*, 4.
- Chirino Betancourt, Y., Benzo, Z., & Fernández, R. (2015). Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en Partículas Atmosféricas Sedimentadas. Un estudio comparativo en diversas áreas en la ciudad de Caracas-Venezuela. *Revista de Investigación de la Universidad Pedagógica Experimental Libertador*, 157-180.
- Clavijo Diaz, A. (2002). *Fundamentos de química analítica, equilibrio iónico y análisis químico*. Bogotá D.C.: Universidad Nacional de Colombia.
- Constitución Política de Colombia. (1991). Capítulo 3: De los derechos colectivos y del Ambiente. *En Título 2: De los derechos, las garantías y los deberes*.
- Corral Lugo, A., Morales García, Y. E., Pazos Rojas, L. A., Ramírez, V. A., Martínez Contreras, R. D., & Muñoz Rojas, J. (2012). Cuantificación de bacterias cultivables mediante el

- método de "Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo". *Revista Colombiana de Biotecnología*, 147-156.
- Corrales Ramírez, L. C., Sánchez Leal, L. C., Arévalo Galvez, Z., & Moreno Burbano, V. E. (2014). Bacillus: género bacteriano que demuestra ser un importante solubilizador de fosfato. *NOVA*, 165-178.
- Cuervo Lozada, J. P. (2010). *Aislamiento y caracterización de Bacillus spp como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales*. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias Básicas, Bogotá D.C.
- Davis, L. (2012). *Basic methods in molecular biology*. Elsevier.
- Decreto 1594. (23 de Julio de 1984). *Ministerio de Agricultura, Ministerio de Salud, Departamento Nacional de Planeación*.
- Decreto 3930. (25 de Octubre de 2010). *Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial*.
- Decreto-Ley 2811. (18 de Diciembre de 1974). *Presidencia de la República de Colombia*.
- Dennison, C., & Lovrien, R. (1997). Three Phase Partitioning: Concentration and Purification of Proteins. *PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION II*, 149-161.
- Diario Oficial de la Unión Europea. (2008). *Directiva 2008/105/CE* . Parlamento Europeo y del Consejo.
- Díaz, N. E., Alfaro, J. M., & Garza, H. (Octubre-Diciembre de 2001). Método analítico para detectar hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua potable. *Ciencia UANL*, 4, 420-425.
- Duarte Puentes, A. M. (2004). *Evaluación de la producción de enzimas lignolíticas por hongos de pudrición blanca en fermentación semisólida, utilizando desechos agroindustriales como sustrato*. Universidad Industrial de Santander, Escuela de Química, Bucaramanga.
- Dussán Garzón, J., Vives-Flores, M. J., Sarria, V. M., Sánchez Medina, O. F., Delgado, L. F., Hernández Sierra, S., & González Barrios, A. F. (2009). Aproximaciones Biológicas y Fisicoquímicas en el tratamiento de contaminantes: un resumen del aporte de la Universidad de los Andes. *Revista de Ingeniería*(Número 30), 100-111.

- Eibes González, G. (2007). *Enzymatic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by manganese peroxidase in reactors containing organic solvents*. Universidad de Santiago de Compostela, Departamento de Ingeniería Química, Santiago de Compostela.
- Engelkirk, P. G., & Duben-Engelkirk, J. (2008). *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases: Essentials of Diagnostic Microbiology*. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business.
- EPA. (1986). *440/5-86-001 Quality Criteria For Water*. United States: Environmental Protection Agency.
- EPA. (2009). *816-F-09-004 National Primary Drinking Water Regulations*. United States: Environmental Protection Agency.
- EPA. (16 de May de 2017). *United States Environmental Protection Agency*. Recuperado el 12 de August de 2017, de National Recommended Water Quality Criteria - Human Health Criteria Table: <https://www.epa.gov/wqc/national-recommended-water-quality-criteria-human-health-criteria-table>
- Fagundo Castillo, J. R., & González Hernández, P. (2002). *Aguas Narutales, Minerales y Mineromedicinales*.
- Falero Bilbao, E. (2013). *Identificación y caracterización de enzimas bacterianas de origen antártico, con potencial aplicación biotecnológica*. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas, Uruguay.
- Fimbres López, F. (2010). *Efecto de extractos de plantas silvestres en el desarrollo de Fusarium verticillioides*. Universidad de Sonora, Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Hermosillo, Sonora.
- Food & Agriculture Org. (1993). *Prevención de la contaminación del agua por agricultura y actividades afines*. Santiago, Chile: Informes sobre Temas hídricos.
- Forbes, B. A., Sahm, D. F., & Weissfeld, A. S. (2007). *Bailey & Scott Diagnóstico Microbiológico*. Madrid, España: Médica Panamericana.

- Gagaoua, M., & Hafid, K. (2016). Three Phase Partitioning System, an Emerging Non-Chromatographic Tool for Proteolytic Enzymes Recovery and Purification. *Biosensors Journal*, Vol. 5, 4.
- García Bellido, R., González Such, J., & Jornet Meliá, J. M. (2010). *SPSS: Prueba T*. Universitat de València, Grupo de Innovación Educativa, València.
- García Botero, C., Obando Anzola, C., Martínez, W., & Rodríguez, R. (2015). *Proyección de Demanda de Combustibles en el Sector Transporte en Colombia*. Ministerio de Minas Y Energía, UPME.
- García Martínez, M. J. (2005). *Los Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos Asociados a Combustibles Fósiles. Caracterización, Análisis y Remediación*. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Minas, Departamento de Ingeniería Química y Combustibles, Madrid.
- Gómez, E. A., Ríos, L. A., & Peña, J. D. (2012). Madera, un Potencial Material Lignocelulósico para la Producción de Biocombustibles en Colombia. *Información tecnológica*, Vol. 23, 73-86.
- González Arzola, K., & Falcón, S. M. (2008). Propiedades físico-químicas y cinéticas de la enzima lacasa inmovilizada de *Fusarium proliferatum*. *Departamento de Microbiología y Biología Celular*.
- Guardia, J., & Però, M. (2001). *Esquemas de Estadística Aplicaciones en Intervención Ambiental*. Barcelona: Universitat de Barcelona.
- Gupta, N., & Farinas, E. T. (2010). Directed evolution of CotA laccase for increased substrate specificity using *Bacillus subtilis* spores. *Protein Engineering, Design & Selection*, Vol. 23(No. 8), 679-682.
- Gutiérrez Morales, N. (2012). *Estado de la Vegetación en Núcleos de Restauración Utilizados para el Restablecimiento del Bosque Altoandino del Parque Forestal Embalse del Neusa, Cundinamarca, Colombia*. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de estudios Ambientales y Rurales, Bogotá D.C.
- Gutiérrez, A., & Martínez, A. T. (1996). Mecanismo de Biodegradación de la lignina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 18-23.

- ICA. (2009). *Aislamiento e identificación de especies de fusarium, a partir de plantas con infecciones sistémicas o localizadas, mediante morfometría*. Instituto Colombiano Agropecuario.
- ICONTEC. (2015). *Norma Técnica Colombiana 813*. Recuperado el 13 de Octubre de 2015, de <http://www.bvsde.ops-oms.org/bvsacg/e/cd-cagua/normas/lac/05.COL/01.norma.pdf>
- IDEAM. (2015). *Estudio Nacional del Agua 2014*. República de Colombia: Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible.
- International Agency for Research on Cancer. (28 de Junio de 2017). *World Health Organization*. Recuperado el 12 de Agosto de 2017, de IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>
- Jiménez, G., & Penninx, M. (2003). Nuevo proceso de biodegradación de colorantes, utilizando hongos de la podredumbre blanca de la madera. *Vitae, Revista de la facultad de Química Farmacéutica*, 52-59.
- Jones, S. M., & Solomon, E. I. (2015). Electron transfer and reaction mechanism of laccases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69-83.
- Kadri, T., Rouissi, T., Brar, S. K., Cledon, M., Sarma, S., & Verma, M. (2017). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes: A review. *Journal of Environmental Sciences*, 52-74.
- Kemira. (2010). *ECOSTONE LCC 10*. Recuperado el 13 de Oct de 2017, de [http://www.aniq.org.mx/pqta/pdf/Respaldo/Ecostone%20LCC%2010%20\(L\).pdf](http://www.aniq.org.mx/pqta/pdf/Respaldo/Ecostone%20LCC%2010%20(L).pdf)
- Koch, A., Naranjo, B., & Páez, M. (2011). Determinación de la actividad enzimática de lacasas y lignina peroxidasas de hongos degradadores de colorantes, seleccionados para el tratamiento de aguas residuales de la industria textil. *Escuela Politécnica del Ejército*, 12.
- Koneman, E. (2006). *Koneman Diagnóstico Microbiológico*. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
- Koolman, J., & Röhm, K. H. (2004). *Bioquímica Texto y Atlas*. Madrid, España: Médica Panamericana.

- Laboratorios Britania S.A. (2001). *Sangre Agar Base*. Caba, Argentina.
- Larraea Izurieta, I., Falconí Borja, C., & Arcos Andrade, A. (2015). Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* spp. con actividad contra *Tetranychus urticae* Koch en cultivos comerciales de rosas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, Vol. 17(No. 2), 140-148.
- León, J. D., González, M. I., & Gallardo, J. F. (2011). Ciclos biogeoquímicos en bosques naturales y plantaciones de coníferas en ecosistemas de alta montaña de Colombia. *Revista de Biología Tropical*, Vol. 59, 1883-1894.
- Lewin, B. (1996). *GENES*. Barcelona: Reverté.
- Ley 99. (22 de Diciembre de 1993). *Presidencia de la República, Ministerio de Hacienda y Crédito Público, Ministerio de Agricultura*.
- Lladó Fernández, S. (2012). *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, y caracterización de las comunidades microbianas implicadas*. Tesis Doctoral, Universitat de Barcelona, Departamento de Microbiología, Barcelona, España.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., . . . Darnell, J. (2005). *Biología Celular y Molecular*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
- López, C. E. (1998). Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos como Contaminantes Atmosféricos. *Información Tecnológica*, 11-18.
- Macarulla, J. M., Marino, A., & Macarulla, A. (2002). *Bioquímica Cuantitativa* (Vol. II Cuestiones sobre Metabolismo). Barcelona: Reverté S.A.
- Marín, D., Jiménez, E., & Hernández, F. (2015). Comparación de pruebas paramétricas y no paramétricas vía simulación. *XXV Simposio Internacional de Estadística*, 1-4.
- Martínez Jara, D. C. (2017). *Elaboración y Evaluación de la Actividad Fotocatalítica de un Biocompuesto para su Potencial Aplicación en la Degradación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos Presentes en el Agua*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Escuela de Ciencias Químicas, Riobamba, Ecuador.
- Martínez Ruiz, J. (2013). *Caracterización Cinética y aplicaciones Biotecnológicas de Lacasa*. Universidad de Murcia, Facultad de Biología, Murcia.

- Mastandrea, C., Chichizola, C., Ludueña, B., Sánchez, H., Álvarez, H., & Gutiérrez, A. (Enero-Marzo de 2005). Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 27-36.
- Mateos, P. (2000). Mecanismos reguladores y fermentaciones industriales. 23-29.
- Mathews, C., Van Holde, K. E., & Ahern, K. (2002). Función y evolución de las proteínas. En *Bioquímica* (págs. 258-259). Madrid: Pearson Educación S. A.
- Mayolo, C., Machín, C., Rito, M., & Trejo, M. D. (2009). Recovery of laccase from the residual compost of *Agaricus bisporus* in aqueous two-phase systems. *XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*.
- McFaddin, J. (2000). *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica* (3 ed. ed.). Montevideo: Médica Panamericana.
- Mendoza Patiño, N. (2008). *Farmacología Médica*. México: Panamericana.
- Mesdia Co. (2011). *McFarland Equivalence Turbidity Standard 0.5 - R20410*. Recuperado el 18 de Septiembre de 2017, de http://m.mesdia.com/product_view.php?no=401
- MicroKit. (14 de Enero de 2015). *Microkit: Medios de Cultivo*. Obtenido de *Bacillus cereus Mossel Agar* (Base): <http://www.medioscultivo.com/bacillus-cereus-mossel-agar-base/>
- Ministerio de Agricultura de Chile. (2009). *Instructivo Técnico para el Diagnóstico de Fusarium circinatum en Muestras de Viveros Bajo Control Oficial*. Gobierno de Chile.
- Ministerio de Ambiente. (2015). *Decreto Supremo N° 015*. Perú.
- Ministerio del Ambiente . (2014). *Norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes al recurso agua*. Ecuador.
- Moncada Jiménez, J. (2005). *Estadística Para Ciencias del Movimiento Humano*. San José: Universidad de Costa Rica.
- Montoya , S., Sánchez, O. J., & Levin, L. (2014). Evaluación de actividades endoglucanasa, exoglucanasa, lacasa y lignina peroxidasa en diez hongos de la pudrición blanca. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, Vol. 12(No. 2), 115-124.

- Monzón, A., & Rodríguez Tudela, J. L. (1997). *Infecciones Causadas por el Género Fusarium*. Majadahonda, España: Servicio de Micología. Centro Nacional de Microbiología Instituto de Salud Carlos III.
- Moss, G. P. (2017). *Recomendaciones del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular sobre la Nomenclatura y Clasificación de Enzimas por las Reacciones que Catalizan*. Londres: Universidad de Queen Mary.
- Moynihan, M. (2005). Análisis de la Varianza. En S. Ross, *Introducción a la estadística* (págs. 493-524). Barcelona: Reverté.
- Muñoz Couto, R. (2009). Fundamentos del tratamiento Biológico. En *Uso de humedales para el tratamiento de aguas residuales municipales en el entorno de la Laguna de Tamiahua, Veracruz* (págs. 6-22). Puebla, Tesis de Licenciatura Ingeniería Civil y Ambiental, México: Universidad de Las Américas.
- Nelson, P., Dignani, C., & Anaissie, E. (1994). Taxonomy, Biology, and Clinical Aspects of Fusarium Species. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 7(No. 4), 479-504.
- Nogueira, S., Nogueira, T. V., Soares, S., & De Lencastre, H. (1997). The Bacillus subtilis L-arabinose (ara) operon: nucleotide sequence, genetic organization and expression. *Microbiology Society*, 957-969.
- Organización Mundial de la Salud. (2006). *Guías para la calidad del agua potable*. Ginebra, Suiza: OMS.
- Orozco, C., Pérez, A., González, M. N., Rodríguez, F., & Alfayate, J. M. (2003). *Contaminación Ambiental: Una visión desde la química*. Madrid, España: Paraninfo.
- Ortíz, I., Sanz, J., Dorado, M., & Villar, S. (2007). *Técnicas de recuperación de suelos contaminados*. Circulo de Innovación en Tecnologías Medioambientales y Energía. Madrid: Universidad de Alcalá.
- Oxoid Microbiology Products. (2007). *Thermo Scientific*. Recuperado el 28 de Septiembre de 2017, de Dehydrated Culture Media: http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0325&cat=&sec=1

- Páez Llerena, M. G. (2012). *Determinación de la actividad enzimática de lacasas y lignina peroxidasas de hongos degradadores de colorantes seleccionados para el tratamiento de aguas residuales de la industria textil*. Escuela Politécnica del Ejército, Departamento de ciencias de la vida, Sangolquí.
- Pascual Anderson, M. D., & Calderón y Pascual, V. (2000). *Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas*. Madrid: Diaz de Santos.
- Peña Sánchez, R. R., & Páez Mendieta, J. E. (2014). *Guía para el cálculo de la concentración de inóculo*. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Fitopatología General.
- Peralta Villalobos, R. A. (2015). *Obtención de una lacasa bacteriana termoestable y alcalina para funcionalizar fibras textiles*. Tesis de Doctorado, Universidad de Santiago de Chile, Departamento de Biología, Santiago de Chile.
- Pérez Vicente, L., Batlle, A., & Martínez, E. (2014). *Isolation of Fusarium oxysporum f. sp. cubense: obtaining single spore cultures*. INISAV-FAO.
- Pérez-Morales, G., Morales Gómez, P., & Haza Duaso, A. (2016). Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) (I): Toxicidad, exposición de la población, y alimentos implicados. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 1-15.
- Plaza, V. (2008). *La Neumología que Viene*. Valencia: ICG Marge, SL.
- Prieto Valiente, L., & Herranz Tejedor, I. (2010). *Bioestadística sn dificultades matemáticas*. Buenos Aires: Diaz de Santos.
- Pro-Lab-Diagnostics. (2013). *Rabbit Coagulase Plasma*. Canadá.
- Quijano Parra, A., Quijano Vargas, M. J., & Meléndez Gélvez, I. (2016). Influencia de la combustión vehicular en la calidad del aire de Pamplona-Colombia. *Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 17-31.
- Quinceno Pérez, E., & Rios Osorio, L. A. (2014). Potenciadores en el proceso de remoción biológica de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PHAS). *Hechos Microbiológicos*, 36-50.

- Rachana, C. R., & Lyju, J. V. (2014). Three Phase Partitioning - A Novel Protein Purification Method. *International Journal of ChemTech Research*, Vol. 6(No. 7), 467-472.
- Rajeeva, S. (2011). Three-phase partitioning for concentration and purification of laccase produced by submerged cultures of *Ganoderma* sp. WR-1. *Biochemical Engineering Journal*, 103-110.
- Redacción Negocios y Economía. (9 de Septiembre de 2016). El parque automotor colombiano supera los 12'600.000 unidades. *El Espectador*.
- RENALOA. (2013). *Análisis Microbiológico de los Alimentos*. Argentina: Grupo Técnico de la Red Nacional de Laboratorios Oficiales de Análisis de Alimentos.
- Repetto Jiménez, M., & Repetto Kuhn, G. (2009). *Toxicología Fundamental*. Díaz de Santos.
- Resolución 2115. (22 de Junio de 2007). *Ministerio de la Protección Social, Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial*.
- Resolución 631. (17 de Marzo de 2015). *Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible*.
- Revollo Escudero, E. L., Serna Daza, O. D., & Hernández Torres, J. (2012). Caracterización de actinobacterias raras, degradadoras de lignocelulosa: Demostración de actividad lacasa en dos aislados de *Tsukamurella* sp y *Cellulosimicrobium* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, Vol. 14(No. 2), 70-80.
- Rivas, D. (2012). *Roza, Tumba, Quema*. Chiapas.
- Rodríguez Cavallini, E., Gamboa Coronado, M. D., Hernández Chavarría, F., & García Hidalgo, J. D. (2005). *Bacteriología General: Principios y Prácticas de Laboratorio*. Costa Rica: Universidad de Costa Rica.
- Rodríguez Millán, C. A., Monreal Vargas, C. T., Huerta Díaz, J., Soria Colunga, J. C., & Jarquín Gálvez, R. (2013). Aporte de Microorganismos Benéficos por la Incorporación al Suelo de Residuos Deshidratados de Col (*Brassica oleracea* var *capitata*) y su Efecto en el pH. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 29-44.

- Rodríguez Sánchez, E. (2010). *Caracterización molecular de lacasas de Plerotus eryngii: expresión heteróloga de estas enzimas y aplicaciones en la degradación de contaminantes poliaromáticos*. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Biológicas, Madrid.
- Rozo Torres, J. A. (2015). *Sistemas de Siembra para Hongos y Bacterias*. Bogotá D.C.: Universidad Manuela Beltrán.
- Sábado, J. T. (2009). *Fundamentos de Bioestadística y Análisis de datos para Enfermería*. Barcelona: Servei de Publicacions.
- Sánchez Turcios, R. A. (2015). t-Student. Usos y Abusos. *Revista Mexicana de Cardiología*, 59-61.
- Sánchez y Gándara, A. (2011). *Conceptos básicos de gestión ambiental y desarrollo sustentable*. México D.F., Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales: S y G Editores.
- Sánchez, H. (2008). *Código de Derecho Internacional Ambiental*. Bogotá D.C., Colombia: Universidad del Rosario.
- Sánchez, J., Correa, M., & Castañeda, L. M. (2016). Bacillus cereus un patógeno importante en el control microbiológico de los alimentos. *Facultad Nacional de Salud Pública, Universidad de Antioquia*, 230-242.
- Sapag, M., & Schmidt, H. (2002). *Generalidades sobre las Enzimas*. Recuperado el 17 de Octubre de 2015, de Biblioteca Digital de la Universidad de Chile: http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/schmidt_h02/parte02/01.html
- Serra Añó, P., Ponce Darós, M., López Bueno, L., González Moreno, L. M., & García Massó, X. (12 de Jun de 2014). *Análisis de Varianza de un Factor (ANOVA)*. (Universitat de València SFPIE, Editor) Recuperado el 19 de Oct de 2017, de <https://www.youtube.com/watch?v=leHF2OKwT80>
- Serrano Gallego, R. (2003). *Introducción al Análisis de Datos Experimentales: Tratamiento de Datos en Bioensayos*. Castelló de la Plana: Universitat Jaume.

- Shah, S., Sharma, A., & Gupta, M. N. (2004). Extraction of oil from *Jatropha curcas* L. seed kernels by enzyme assisted three phase partitioning. *Industrial Crops and Products*, 275-279.
- Sharma, S. (2012). Bioremediation: Features, Strategies and applications. *Asian Journal of Pharmacy and Life Science; Vol 2*, 202-2013.
- Sivakumar, R., Rajendram, R., Balakumar, C., & Tamilvendan, M. (2010). Isolation, screening and optimization of production medium for thermostable laccase production from *Ganoderma* sp. *International Journal of Engineering Science and Technology*, Vol. 2(No. 12), 133-141.
- Solanas, A. M. (2009). La biodegradación de hidrocarburos y su aplicación en la biorremediación de suelos. *Estudios en la zona no saturada del suelo*, Vol. 9, 1-8.
- Sosa López, A., Pazos Álvarez, V., Torres Campos, D., & Casadesús Romero, L. (2011). Identificación y caracterización de seis aislados pertenecientes al género *Bacillus* promisorios para el control de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad*, 39-43.
- Tangarife Morales, Y. (2016). *Evaluación de la Separación y Purificación de Lacasa a partir de Fusarium spp para su Aplicación en Materiales Lignocelulósicos*. Universidad Nacional de Colombia, Departamento de procesos y energía, Medellín.
- Torres Vargas, G. M. (2013). *Cuantificación del contenido de proteína celular en la biomasa de la levadura Saccharomyces cerevisiae producida a partir de residuos de cáscaras de naranja Citrus sinensis L var valencia y papa Solanum tuberosum variedad diacol capiro*. Universidad Nacional Abierta y a Distancia-UNAD, Escuela de Ciencias Agrarias, Pecuarias y del Medio Ambiente, Duitama.
- Trujillo Mejía, M. (2010). *Análisis de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en la cuenca del rio Otún y en el agua potable de la ciudad de Pereira mediante cromatografía de gases capilar (GC- FID)*. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira.
- Unidad III: Taxonomía y Crecimiento Bacteriano. (2014). En *Microbiología* (págs. 55-64). Universidad Central de Venezuela. (2009). *Coagulasa*. Caracas, Venezuela.

- Universidad Nacional de Córdoba. (2014). *Taxonomía y crecimiento Bacteriano*. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Córdoba, Argentina.
- Valencia Guerrero, M. F. (2009). *Caracterización enzimática de cepas de Fusarium aisladas de lesiones de animales, humanos y plantas*. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá D.C.
- Vera, G., Tam, J., & Pinto, E. (2008). Efectos toxicológicos del petróleo crudo, diesel 2 y kerosene sobre el crecimiento poblacional de la microalga *Chaetoceros gracilis schutt*. *Biotempo*, Vol. 8, 65-75.
- Verma, S., & Quiroz Ruiz, A. (2006). Valores críticos de seis pruebas de Dixon para datos desviados en muestras normales con tamaños de hasta 100 y aplicaciones en ciencias y ingenierías. *Revista mexicana de ciencias geológicas*, 133-161.
- Vian Ortuño, A. (2006). La Biósfera III: El árbol vivo como fuente de materias primas. En *Introducción a la Química Industrial* (págs. 491-526). Barcelona: Reverté S.A.
- Vidal, C., Flores, C., Trejo, M., Galindo, E., & Serrano, L. (2009). *Producción de lacasas y generación de nuevas isoformas en cultivo sólido de Pleurotus ostreatus y Agaricus bisporus infectados con Trichoderma spp.* XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.
- Villamar, Z. (2011). Cuál fue la visión oficial estadounidense del daño ambiental producido por el derrame de crudo del pozo Macondo. *Norteamérica*, Vol. 6(No. 1), 205-218.
- Villota Calvachi, G. E. (2016). *Actividad Biofloculante de Pseudomonas luteola, Bacillus coagulans y Bacillus amyloliquefaciens en Suspensiones de Caolín*. Universidad Católica de Manizales, Instituto de Investigación en Microbiología y Biotecnología Agroindustrial, Manizales.
- Vinoth, V., Sathayaselvabala, V., Dinesh, S., Murugesan, A., Vidyadevi, T., & Sivanesan, S. (2011). Application of Response Surface Methodology to Optimize Three Phase Partitioning for Purification of Laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Separation Science and Technology*, Vol. 46.

- Vinoth, V., Sathayaselvabala, V., Premkumar, M. P., Vidyadevi, T., & Sivanesan, S. (2011). Biochemical characterization of three phase partitioned laccase and its application in decolorization and degradation of synthetic dyes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 63-72.
- Vives, Í., Grimalt, J., & Guitart, R. (2001). Los hidrocarburos aromáticos policíclicos y la salud humana. *Apuntes de Ciencia y Tecnología*, 45-51.
- Voet, D., & Voet, J. G. (2004). *Bioquímica*. Montevideo, Uruguay: Médica Panamericana.
- Volke Sepúlveda, T., & Velasco, J. A. (2002). *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*. Instituto Nacional de Ecología.
- Waxman, J. (12 de Marzo de 2013). *Hidrocarburos aromáticos policíclicos*. Obtenido de Academia Americana de Toxicología Clínica.
- Winkler. (2014). *Sistemas de Identificación BBL Crystal ID: Equipo para la identificación de bacterias grampositivas*.
- Yadav, N., Gupta, M. N., & Khare, S. K. (2017). Three phase partitioning and spectroscopic characterization of bioactive constituent from halophilic *Bacillus subtilis* EMB M15. *Bioresource Technology*, 242, 283-286.
- Ye, D., Siddigi, A., Maccubin, A., Kumar, S., & Sikka, H. (1995). Degradation of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis*. *Environmental, Science & Technology*, 136-142.
- Zaid Núñez, L. K. (2004). *Estudio del Biodeterioro en Madera de Eucalyptus globulus Lab. Por método Gravimétrico*. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Forestales, Departamento de Ingeniería de la Madera, Santiago de Chile.
- Zaragoza Carmona, J. A. (2011). *Aislamiento de esporas de Bacillus productoras de proteasas con potencial uso industrial*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Químicas, San Nicolás de los Garza, Nuevo León.

Zúñiga Bravo, O. M. (2009). *Crecimiento de Bacillus pumilus Productor de la Auxina Ácido Indolacético, Como Base para Formular un Biofertilizante en Polvo*. Universidad Austral de Chile, Escuela de Ingeniería en Alimentos, Valdivia, Chile.

ANEXOS

Anexo 1: Composición de Medios de Cultivo para Lacasa

Anexo 1.1: Medios de cultivo sólidos para medición cualitativa de lacasa.

Agar	Composición (g/L)	Fuente	Agar	Composición (g/L)	Fuente
Selectivo diferencial enriquecido con EST	Celulosa	10	Medio básico para lacasa MBL	Glucosa	10
	Peptona	5		KH ₂ PO ₄	2
	Extracto de Levadura	2		Extracto de levadura	0,2
	MnSO ₄ · H ₂ O	0,075		MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5
	CuSO ₄ · 7H ₂ O	0,1		CaCl ₂	0,1
	Agar Agar	20		CuSO ₄ · 7H ₂ O	0,0064
	Extracto de salvado de trigo	Solución de aforo		(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5
	ABTS	50, 100, 150, 200 μL/caja		Agar agar	22
OGYE enriquecido	Agar OGYE	37	Nutritivo enriquecido	Agar nutritivo	28
	Carboximetil-celulosa	5		Carboximetil-celulosa	5
	CuSO ₄ · 7H ₂ O	0,1		CuSO ₄ · 7H ₂ O	1,25
	ABTS	0,35		ABTS	75 y 50 μL/caja
	Extracto de salvado de trigo	Solución de aforo			

(Chaparro Sosa & Rosas Wanumen, 2006)

(Montoya , Sánchez, & Levin, 2014)

Autor

(Revollo Escudero, Serna Daza, & Hernández Torres, 2012)

Anexo 1.2: Medios de cultivo líquidos para medición fotométrica de lacasa.

Medio	Composición (g/L)	Medio	Composición (g/L)	
Caldo OGYE* (Oxytetracycline- Glucose-Yeast Extract)	Extracto de	4	Caldo Nutritivo	
	Levadura**			
	Glucosa***	20		
	Metanol	1% [v/v]		
	pH	7,6 +/- 0,2		
PCB (Plate- Count Broth)	Triptona	5	Extracto de carne**	1
	Extracto de levadura**	2,5	Extracto de levadura**	2
	Glucosa***	1	Peptona**	5
	Metanol	1% [v/v]	Cloruro de Sodio	5
	pH	7 +/- 0,2	Metanol	1% [v/v]
		pH	7,4 +/- 0,2	

*El caldo OGYE fue el único empleado para crecimiento y producción enzimática de *Fusarium sp.*, mientras que los dos restantes se usaron con *Bacillus sp.* **Fuente de nitrógeno. ***Fuente de carbono. Fuente: Oxoid Microbiology Products (2007).

Anexo 2: Preparación de Soluciones

Anexo 2.1: Solución salina isotónica estéril.

Concentración	0,9% p/v
Agua Destilada (AD)	250 ml
Cloruro de Sodio (NaCl)	2,25 g
$250 \text{ ml AD} \left(\frac{0,9 \text{ g NaCl}}{100 \text{ ml AD}} \right)$	
$= 2,25 \text{ g de sal}$	

Anexo 2.2: Solución buffer acetato.

	Constante ácida (Ka) =	1,75X10 ⁻⁵
Ácido acético (CH ₃ COOH)	Masa molar [g/mol] =	60.05
	Densidad [g/ml] =	1,05
Acetato de sodio (C ₂ H ₃ NaO ₂)	Masa molar [g/mol] =	140
Concentración de la solución buffer	[Ácido] =	0,1 M o 0,001 M
pH de la solución buffer	[H ⁺] =	5 o 7
Volumen final de la solución buffer	[ml] =	250
$[H^+] = Ka \frac{[\text{Ácido}]}{[\text{Sal}]} \rightarrow [\text{Sal}] = Ka \frac{[\text{Ácido}]}{\text{Antilog}(-\text{pH})}$		

Para solución buffer pH 5 [0,1M]:

- Solución de ácido acético 0,1 M:

$$250 \text{ ml} \left(\frac{0,1 \text{ mol}}{1000 \text{ ml}} \right) \left(\frac{60,05 \text{ g}}{1 \text{ mol}} \right) \left(\frac{1 \text{ ml}}{1,05 \text{ g}} \right) = 1,43 \text{ ml CH}_3\text{COOH}$$

- Concentración de acetato de sodio:

$$1,75 \times 10^{-5} \frac{[0,1 \text{ M}]}{\text{Antilog}(-5)} = 0,175 \text{ M C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$$

- Cantidad de acetato de sodio:

$$250 \text{ ml} \left(\frac{0.175 \text{ mol}}{1000 \text{ ml}} \right) \left(\frac{140 \text{ g}}{1 \text{ mol}} \right) = 6,125 \text{ g } C_2H_3NaO_2$$

Para solución buffer pH 7 [0.001M]:

- Solución de ácido acético 0.1 M:

$$250 \text{ ml} \left(\frac{0.001 \text{ mol}}{1000 \text{ ml}} \right) \left(\frac{60,05 \text{ g}}{1 \text{ mol}} \right) \left(\frac{1 \text{ ml}}{1.05 \text{ g}} \right) = 0.0143 \text{ ml } CH_3COOH$$

- Concentración de acetato de sodio:

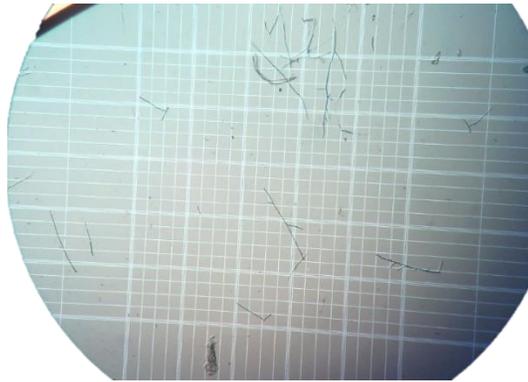
$$1.75 \times 10^{-5} \frac{[0,001 \text{ M}]}{\text{Antilog}(-7)} = 0,175 \text{ M } C_2H_3NaO_2$$

- Cantidad de acetato de sodio:

$$250 \text{ ml} \left(\frac{0,175 \text{ mol}}{1000 \text{ ml}} \right) \left(\frac{140 \text{ g}}{1 \text{ mol}} \right) = 6,125 \text{ g } C_2H_3NaO_2$$

Anexo 3: Conteo de esporas de *Fusarium sp*

Anexo 3.1: Hemocitómetro con objetivo 10X.



Anexo 3.2: Recuento en hemocitómetro o cámara de Neubauer.

42	49	20	12						53	44	46	62
20	21	33	31						53	74	90	57
21	24	14	21						41	90	71	93
32	15	40	49						34	85	72	71
				128	165	165	136	107				
				120	153	175	147	104				
				142	133	127	18	99				
				112	107	144	144	111				
				102	122	112	154	161				
79	98	86	70						77	33	82	54
86	142	157	103						80	68	67	81
130	166	133	132						57	86	56	70
102	110	118	107						60	66	68	74

Recuento = 7566

$$Total = \frac{Recuento \times 10^4}{5} = 15'132.000$$

Anexo 4: Datos de Actividad Enzimática

Anexo 4.1: Datos rechazados correspondientes al extracto crudo.

<i>Bacillus</i> Centrifugación PCB					<i>Bacillus</i> Centrifugación NUTRITIVO					<i>Fusarium</i> Centrifugación OGYE				
Día	Rep	Abs t=0	Abs t=3	EA	Día	Rep	Abs t=0	Abs t=3	EA	Día	Rep	Abs t=0	Abs t=3	EA
1	A	-0,012	-0,013	-55,56	1	A	-0,004	-0,008	-222,22	2	A	-0,006	-0,013	-388,89
	B	-0,011	-0,013	-111,11		B	-0,008	-0,017	-500,00		B	-0,009	-0,01	-55,56
	C	-0,012	-0,009	166,67		C	-0,005	-0,019	-777,78		C	-0,012	-0,013	-55,56
2	A	0,001	-0,002	-166,67	2	A	-0,012	-0,013	-55,56	5	A	0,007	-0,003	-555,56
	B	0,004	-0,002	-333,33		B	-0,013	-0,011	111,11		B	0,004	-0,003	-388,89
	C	-0,008	-0,01	-111,11		C	-0,006	0,004	555,56		C	0,002	-0,001	-166,67
5	A	-0,002	-0,005	-166,67	5	A	-0,002	0,001	166,67	8	A	-0,004	-0,001	166,67
	B	0,025	-0,015	-2222,22		B	0,002	0,002	0,00		B	-0,013	-0,007	333,33
	C	-0,003	-0,006	-166,67		C	0,004	0,002	-111,11		C	-0,004	-0,001	166,67
11	A	-0,006	-0,01	-46,30	11	A	-0,004	-0,008	-46,30	12	A	0,073	0,169	1111,11
	B	0,031	0,019	-2222,22		B	0,173	0,114	-10925,9		B	-0,008	-0,007	11,57
	C	-0,188	-0,171	3148,15		C	0,014	0,01	-740,74		C	-0,013	-0,011	23,15

*En rojo se muestra el único dato que no tenía susceptibilidad de rechazo.

Anexo 5: Análisis de HAP en laboratorio certificado

Anexo 5.1: Muestra inicial sin inóculo microbiano.



EHS-LAB-1-F-09-05
Versión 5. 2017 Junio

INFORME DE ENSAYO BO1706972

Página 2 de 3

Hidrocarburos Aromáticos Polinucleares

	L.C.	Fecha de Análisis	
Identificación SGS			BO1706972.001
Matriz			AGUA_RESIDUAL
Muestreado por			CLIENTE
Especificación del Producto Cliente			AGUA_RESIDUAL
Identificación de la Muestra - Cliente			PREPARACIÓN LABORATORIO UDEC FACATIVA
Lugar de Muestreo			2017-08-28 11:30
Fecha de Muestreo			
1-Metilnaftaleno (mg Compuesto/L) (A)	3.7e-005	2017-09-06 - 2017-09-06	<0.00004
2-Metilnaftaleno (mg Compuesto/L) (A)	3.3e-005	2017-09-06 - 2017-09-06	<0.00003
Acenafteno (mg Compuesto/L) (A)	0.000313	2017-09-06 - 2017-09-06	<0.00031
Acenaftileno (mg Compuesto/L) (A)	0.000293	2017-09-06 - 2017-09-06	<0.00029
Antraceno (mg Compuesto/L) (A)	0.000298	2017-09-06 - 2017-09-06	<0.00030
Benzo(a)antraceno (mg Compuesto/L) (A)	0.000304	2017-09-06 - 2017-09-06	<0.00030
Benzo(a)pireno (mg Compuesto/L) (A)	0.000287	2017-09-06 - 2017-09-06	<0.00029
Benzo(b)fluoranteno (mg Compuesto/L) (A)	0.00029	2017-09-06 - 2017-09-06	<0.00029
Benzo(g,h,i)perileno (mg Compuesto/L) (A)	0.000307	2017-09-06 - 2017-09-06	<0.00031
Benzo(k)fluoranteno (mg Compuesto/L) (A)	0.000296	2017-09-06 - 2017-09-06	<0.00030
Criseno (mg Compuesto/L) (A)	0.000291	2017-09-06 - 2017-09-06	<0.00029
Decalfluobifenilo (mg Compuesto/L) (A)	--	2017-09-06 - 2017-09-06	0.00000
Dibenzo(a,h)antraceno (mg Compuesto/L) (A)	0.000296	2017-09-06 - 2017-09-06	<0.00030
Fenantreno (mg Compuesto/L) (A)	0.000299	2017-09-06 - 2017-09-06	<0.00030
Fluoranteno (mg Compuesto/L) (A)	0.00029	2017-09-06 - 2017-09-06	<0.00029
Fluoreno (mg Compuesto/L) (A)	0.000298	2017-09-06 - 2017-09-06	<0.00030
Indeno(1,2,3-cd)pireno (mg Compuesto/L) (A)	0.000307	2017-09-06 - 2017-09-06	<0.00031
Naftaleno (mg Compuesto/L) (A)	0.000297	2017-09-06 - 2017-09-06	<0.00030
Pireno (mg Compuesto/L) (A)	0.0003	2017-09-06 - 2017-09-06	<0.00030
Totales (mg Compuesto/L) (A)	0.000287	2017-09-06 - 2017-09-06	<0.000287

La fecha de análisis relacionada en la tabla de resultados corresponde a la fecha de reporte de resultados.

(A) = Estos resultados de Análisis están acreditados por el IDEAM bajo Resolución Número 1566 del 21 de Julio de 2016, 2271 del 5 de octubre de 2016, 1083 del 16 de mayo de 2017.

Para Barranquilla aplican las resoluciones: 2631 del 18 de noviembre de 2016, 0859 del 27 de abril de 2017

N.R. = No Reportado

ADVERTENCIA: La(s) muestra(s) a la(s) que se refiere(n) las conclusiones registradas en este documento (los "Resultados") fueron elaboradas y/o proporcionadas por el Cliente o por un tercero que actúa bajo las directrices del Cliente. Los hallazgos no constituyen garantía de la representatividad de la muestra de ninguna mercancía y se refieren estrictamente a la(s) muestra(s). La Compañía no acepta ninguna responsabilidad con respecto al origen o la fuente de donde se indica que la(s) muestra(s) es/ fue

SGS COLOMBIASAS Environment Health and Safety, Carrera 100 No. 25C-11, Bogotá - Cundinamarca
Calle 30 Km 8 Vía al Aeropuerto, Barranquilla - Atlántico

Member of the SGS Group (Société Générale de Surveillance)

Este documento es emitido por la Compañía bajo sus Condiciones Generales de Servicio accesibles en <http://www.sgs.com/en/Terms-and-Conditions.aspx>. Se destacan las estipulaciones que sobre limitación de responsabilidad, indemnización y jurisdicción se encuentran incluidas en las Condiciones Generales de Servicio. Se advierte a cualquier tenedor de este documento que la información aquí contenida refleja las conclusiones de la Compañía para el momento de su intervención y dentro de los límites de las instrucciones del Cliente, si las hubiere. La responsabilidad de la Compañía es exclusiva para con su Cliente y este documento no exonera a las partes de una transacción de ejercer todos sus derechos y obligaciones bajo los documentos de la misma. Cualquier alteración no autorizada, adulteración o falsificación del contenido o apariencia de este documento es ilegal y los infractores podrán ser procesados hasta los máximos que permita la ley.

Los reportes emitidos como consecuencia de inspecciones o ensayos con base en muestras, contendrán la opinión de la compañía, única y exclusivamente sobre las muestras que hayan sido objeto de inspección o ensayo, por lo que bajo ninguna circunstancia podrá interpretarse que contienen una opinión sobre la totalidad del lote del que haya sido obtenida la muestra objeto de la inspección o ensayo.

Las quejas, apelaciones o consultas sobre la validez de este certificado podrán ser enviadas al correo co.servicioalcliente@sgs.com o al teléfono 7422274 extensión 2557.

Anexo 5.2: Muestras con inóculo bacteriano y fúngico.



EHS-LAB-I-F-09-05
Versión 5. 2017 Junio

INFORME DE ENSAYO BO1708095

Página 2 de 3

Hidrocarburos Aromáticos Polinucleares

	L.C.	Fecha de Análisis	BO1708095.001	BO1708095.002
			AGUA_RESIDUAL	AGUA_RESIDUAL
Identificación SGS			CLIENTE	CLIENTE
Matriz			AGUA_RESIDUAL_IND	AGUA_RESIDUAL_IND
Muestreado por			1 - BACILLUS LAB UDEC FACATATIVÁ 2017-09-29 08:30	2 - FUSARIUM LAB UDEC FACATATIVÁ 2017-09-29 08:50
Especificación del Producto Cliente				
Identificación de la Muestra - Cliente				
Lugar de Muestreo				
Fecha de Muestreo				
1-Metinaftaleno (mg Compuesto/L) (A)	3.7e-005	2017-10-06 - 2017-10-09	<0.000030	<0.000030
2-Metinaftaleno (mg Compuesto/L) (A)	3.3e-005	2017-10-06 - 2017-10-09	<0.000021	<0.000020
Acenafteno (mg Compuesto/L) (A)	0.000313	2017-10-06 - 2017-10-09	<0.00015	<0.00018
Acenaftileno (mg Compuesto/L) (A)	0.000293	2017-10-06 - 2017-10-09	<0.00019	<0.00020
Antraceno (mg Compuesto/L) (A)	0.000298	2017-10-06 - 2017-10-09	<0.00014	<0.00018
Benzo(a)antraceno (mg Compuesto/L) (A)	0.000304	2017-10-06 - 2017-10-09	<0.00028	<0.00029
Benzo(a)pireno (mg Compuesto/L) (A)	0.000287	2017-10-06 - 2017-10-09	<0.00027	<0.00026
Benzo(b)fluoranteno (mg Compuesto/L) (A)	0.00029	2017-10-06 - 2017-10-09	<0.00025	<0.00025
Benzo(g,h,i)perileno (mg Compuesto/L) (A)	0.000307	2017-10-06 - 2017-10-09	<0.00031	<0.00031
Benzo(k)fluoranteno (mg Compuesto/L) (A)	0.000296	2017-10-06 - 2017-10-09	<0.00027	<0.00030
Criseno (mg Compuesto/L) (A)	0.000291	2017-10-06 - 2017-10-09	<0.00017	<0.00020
Decafluobifenilo (mg Compuesto/L) (A)	--	2017-10-06 - 2017-10-09	0,00000	0,00000
Dibenzo(a,h)antraceno (mg Compuesto/L) (A)	0.000296	2017-10-06 - 2017-10-09	<0.00026	<0.00024
Fenantreno (mg Compuesto/L) (A)	0.000299	2017-10-06 - 2017-10-09	<0.00021	<0.00023
Fluoranteno (mg Compuesto/L) (A)	0.00029	2017-10-06 - 2017-10-09	<0.00021	<0.00026
Fluoreno (mg Compuesto/L) (A)	0.000298	2017-10-06 - 2017-10-09	<0.00017	<0.00020
Indeno(1,2,3-cd)pireno (mg Compuesto/L) (A)	0.000307	2017-10-06 - 2017-10-09	<0.00031	<0.00031
Naftaleno (mg Compuesto/L) (A)	0.000297	2017-10-06 - 2017-10-09	<0.00017	<0.00016
Pireno (mg Compuesto/L) (A)	0.0003	2017-10-06 - 2017-10-09	<0.00022	<0.000245
Totales (mg Compuesto/L) (A)	0.000287	2017-10-06 - 2017-10-09	<0.000262	<0.000275

La fecha de análisis relacionada en la tabla de resultados corresponde a la fecha de reporte de resultados.

(A) = Estos resultados de Análisis están acreditados por el IDEAM bajo Resolución Número 1566 del 21 de Julio de 2016, 2271 del 5 de octubre de 2016, 1083 del 16 de mayo de 2017.

Para Barranquilla aplican las resoluciones: 2631 del 18 de noviembre de 2016, 0859 del 27 de abril de 2017

N.R. = No Reportado

ADVERTENCIA: La(s) muestra(s) a la(s) que se refiere(n) las conclusiones registradas en este documento (los "Resultados") fueron elaboradas y/o proporcionadas por el Cliente o por un tercero que actúa bajo las directrices del Cliente. Los hallazgos no constituyen garantía de la representatividad de la muestra de ninguna mercancía y se refieren estrictamente a la(s) muestra(s). La Compañía no acepta ninguna responsabilidad con respecto al origen o la fuente de donde se indica que la(s) muestra(s) es/ fue extraída.

SGS COLOMBIASAS Environment Health and Safety, Carrera 100 No. 25C-11, Bogotá - Cundinamarca
Calle 30 Km 8 Vía al Aeropuerto, Barranquilla - Atlántico

Member of the SGS Group (Société Générale de Surveillance)

Este documento es emitido por la Compañía bajo sus Condiciones Generales de Servicio accesibles en <http://www.sgs.com/en/Terms-and-Conditions.aspx>. Se destacan las estipulaciones que sobre limitación de responsabilidad, indemnización y jurisdicción se encuentran incluidas en las Condiciones Generales de Servicio. Se advierte a cualquier tenedor de este documento que la información aquí contenida refleja las conclusiones de la Compañía para el momento de su intervención y dentro de los límites de las instrucciones del Cliente, si las hubiere. La responsabilidad de la Compañía es exclusiva para con su Cliente y este documento no exonera a las partes de una transacción de ejercer todos sus derechos y obligaciones bajo los documentos de la misma. Cualquier alteración no autorizada, adulteración o falsificación del contenido o apariencia de este documento es ilegal y los infractores podrán ser procesados hasta los máximos que permita la ley.

Los reportes emitidos como consecuencia de inspecciones o ensayos con base en muestras, contendrán la opinión de la compañía, única y exclusivamente sobre las muestras que hayan sido objeto de inspección o ensayo, por lo que bajo ninguna circunstancia podrá interpretarse que contienen una opinión sobre la totalidad del lote del que haya sido obtenida la muestra objeto de la inspección o ensayo.

Las quejas, apelaciones o consultas sobre la validez de este certificado podrán ser enviadas al correo co.servicialcliente@sgs.com o al teléfono 7422274 extensión 2557.

Anexo 6: Análisis Estadístico en SPSS

Anexo 6.1: ANOVA de la actividad enzimática de lacasa con extracto purificado.

- Estadísticos descriptivos:

	Descriptivos	Estadístico	Desv. Error	
Actividad Enzimática	Media	120,7550	51,12029	
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior		-10,6539
		Límite superior		252,1639
	Media recortada al 5%	114,2394		
	Mediana	75,2300		
	Varianza	15679,704		
	Desv. Desviación	125,21862		
	Mínimo	11,57		
	Máximo	347,22		
	Rango	335,65		
	Rango intercuartil	193,29		
	Asimetría	1,481	0,845	
	Curtosis	1,863	1,741	

- Prueba de normalidad:

Pruebas de normalidad	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Actividad Enzimática	0,291	6	0,122	0,848	6	0,150

- ANOVA unifactorial:

Actividad Enzimática	Prueba de homoscedasticidad	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
	Se basa en la mediana		2,578	3	8
Se basa en la mediana y con gl ajustado		2,578	3	2,429	0,260

ANOVA		Actividad Enzimática		
Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
60436,479	3	20145,493	3,833	,057
42042,569	8	5255,321		
102479,048	11			

Bonferroni							
	(I) mg/L de HAP	(J) mg/L de HAP	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
Var. Dep.: Actividad Enzimática	LacFu	LacBa	-23,14667	59,19077	1,000	-229,0642	182,7709
		LacFuP	-30,86400	59,19077	1,000	-236,7815	175,0535
		LacBaP	-179,78333	59,19077	,097	-385,7009	26,1342
	LacBa	LacFu	23,14667	59,19077	1,000	-182,7709	229,0642
		LacFuP	-7,71733	59,19077	1,000	-213,6349	198,2002
		LacBaP	-156,63667	59,19077	,177	-362,5542	49,2809
	LacFuP	LacFu	30,86400	59,19077	1,000	-175,0535	236,7815
		LacBa	7,71733	59,19077	1,000	-198,2002	213,6349
		LacBaP	-148,91933	59,19077	,216	-354,8369	56,9982
	LacBaP	LacFu	179,78333	59,19077	,097	-26,1342	385,7009
		LacBa	156,63667	59,19077	,177	-49,2809	362,5542
		LacFuP	148,91933	59,19077	,216	-56,9982	354,8369

Anexo 6.2: ANOVA de las concentraciones de HAPs.

- Estadísticos descriptivos:

Concentración HAP	Descriptivos	Estadístico	Desv. Error
	Media	0,00021950	0,000012608
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	0,00019427
		Límite superior	0,00024473
	Media recortada al 5%	0,00022667	
	Mediana	0,00026000	
	Varianza	0,000	
	Desv. Desviación	0,000097658	
	Mínimo	0,000000	
	Máximo	0,000310	
	Rango	0,000310	
	Rango intercuartil	0,000127	
	Asimetría	-1,167	0,309
	Curtosis	0,178	0,608

- Prueba de normalidad:

Pruebas de normalidad	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Concentración HAPs	0,177	60	0,000	0,810	60	0,000

- ANOVA unifactorial:

Concentración HAPs	Prueba de homoscedasticidad	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
	Se basa en la media	0,005	2	47	0,995
	Se basa en la mediana	0,467	2	47	0,630
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	0,467	2	38,871	0,630

ANOVA		Concentración HAPs			
Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	
4,51739E-08	2	2,25869E-08	3,363	0,043	
3,1563E-07	47	6,71553E-09			
3,60804E-07	49				

Bonferroni							
Var. Dep.: Concentración HAPs	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
	mg/L de HAP	mg/L de HAP				Límite inferior	Límite superior
		Inicial	LacFuP	0,000055879	0,000028544	,169	-0,00001499
		LacBaP	0,000070408	0,000028544	,052	-0,00000046	0,00014127
LacFuP		Inicial	-0,000055879	0,000028544	,169	-0,00012674	0,00001499
		LacBaP	0,000014529	0,000028108	1,000	-0,00005525	0,00008431
LacBaP		Inicial	-0,000070408	0,000028544	,052	-0,00014127	0,00000046
		LacFuP	-0,000014529	0,000028108	1,000	-0,00008431	0,00005525

Anexo 6.3: Prueba t de Student de los porcentajes de remoción de HAPs.

- Estadísticos descriptivos:

	Descriptivos	Estadístico	Desv. Error
	Media	0,2242	,02615
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	0,1713
		Límite superior	0,2772
	Media recortada al 5%	0,2200	
%Remoción HAP	Mediana	0,2417	
	Varianza	0,026	
	Desv. Desviación	0,16119	
	Mínimo	0,00	
	Máximo	0,53	
	Rango	0,53	
	Rango intercuartil	0,25	
	Asimetría	0,178	0,383
	Curtosis	-1,116	0,750

- Prueba de normalidad:

Pruebas de normalidad	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
%Remoción HAP	0,125	38	0,141	0,944	38	0,057

- Prueba t de Student para muestras independientes:

Prueba de muestras independientes		%Remoción HAP				
Prueba de Levene de igualdad de varianzas		Prueba t para la igualdad de medias				
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias
Se asumen varianzas iguales	0,321	0,574	-0,803	36	0,428	-0,04217
No se asumen varianzas iguales			-0,803	35,534	0,428	-0,04217

Prueba t para la igualdad de medias			
	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
		Inferior	Superior
Se asumen varianzas iguales	0,05255	-0,14875	0,06440
No se asumen varianzas iguales	0,05255	-0,14879	0,06445