

**Universidad
Autónoma
Metropolitana**



Casa abierta al tiempo **Azcapotzalco**

División de Ciencias Básicas e Ingeniería

Posgrado en Ingeniería de Procesos

**Proceso de degradación de atrazina en un suelo agrícola por actividad
enzimática de *Aspergillus niger*.**

Tesis que presenta:

I.Q. Brenda Elena Herrera Gallardo

Para obtener el grado de:

Maestro en Ingeniería de Procesos

Directores:

Dra. Margarita M. González Brambila.

Dr. Héctor Hugo León Santiesteban.

julio 2019

Agradecimientos.

A la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco, por facilitar los recursos y herramientas necesarias para el desarrollo de este proyecto.

Al M. en C. Raymundo Guzmán Gil por todo su apoyo y acompañamiento en el desarrollo de este proyecto.

A los directores de esta tesis. Dra. Margarita M. González Brambila y Dr. Héctor Hugo León Santiesteban, por su acompañamiento continuo y por compartir tan generosamente su conocimiento y experiencias de vida.

A mi esposo, Eduardo, por apoyarme incondicionalmente.

A mi hija, Silvana, por su infinita paciencia.

A mis padres. Martha y Ubaldo, porque con su ejemplo me demuestran que no existen límites cuando se tiene pasión, disciplina y entrega.

A Dios, por nunca dejarme sola.

Índice

Resumen	1
1. Introducción.....	3
1.1. Objetivos.....	8
1.1.1. Objetivo general.	8
1.1.2. Objetivos específicos.....	8
1.2. Hipótesis.	9
2. Antecedentes.....	10
2.1. Características fisicoquímicas de la atrazina.	10
2.2. Métodos de degradación de la atrazina.....	12
2.2.1. Métodos químicos.....	12
2.2.2. Métodos biológicos.....	13
2.2.3. Biodegradación de atrazina a través de <i>Aspergillus niger</i>	15
2.2.4. Utilización de residuos de nopal como cosustrato.....	19
2.3. Diseño estadístico de experimentos factorial 2^k completamente al azar.	21
2.3.1. Diseño de experimentos 2^3 completamente al azar.	22
2.3.2. Análisis de la varianza (ANOVA).....	25
2.4. Modelos cinéticos para la determinación de la velocidad de reacciones biológicas.	

2.4.1.	Cinética enzimática: Modelo de Michaelis – Menten.	30
2.4.2.	Cinética de crecimiento celular: Modelo de Monod.	34
2.4.3.	Modelo logístico basado en el modelo de Monod.	36
3.	Procedimiento experimental.	39
3.1.	Resiembra y preservación de una cepa original.....	39
3.2.	Pruebas toxicológicas.	41
3.3.	Adaptación.	42
3.3.1.	Pruebas de crecimiento de <i>A. niger</i> en medios líquidos contaminados.....	43
3.3.2.	Pruebas de crecimiento de <i>A. niger</i> en suelo contaminado.	45
3.4.	Proceso de biodegradación de atrazina.	46
3.4.1.	Diseño factorial 2 ³ completamente al azar.	46
3.4.1.1.	Diseño experimental.....	46
3.4.1.2.	Análisis de la varianza (ANOVA). Pruebas de Hipótesis.	49
3.4.1.3.	Modelo lineal general.....	52
3.4.2.	Cinética de degradación de atrazina.	53
3.5.	Métodos de Analíticos.	54
3.5.1.	Cuantificación de biomasa.....	54
3.5.1.1.	Curva de calibración para la cuantificación de biomasa.	54
3.5.2.	Cuantificación de carbohidratos reductores.	55

3.5.2.1.	Curva de calibración para la cuantificación de carbohidratos reductores.	55
3.5.3.	Cuantificación de amoniaco.	56
3.5.3.1.	Curva de calibración para la cuantificación de amoniaco.....	57
3.5.4.	Cuantificación de Atrazina.	58
3.5.4.1.	Cálculo de los coeficientes de rendimiento de la biorreacción por mol de carbono.	60
3.5.4.2.	Balance de atrazina.	63
3.5.4.3.	Balance de biomasa.....	64
3.5.4.4.	Balance de amoniaco.....	66
4.	Resultados y discusión.....	68
4.1.	Pruebas de toxicidad.	68
4.1.1.	Pruebas preliminares de toxicidad.....	68
4.1.2.	Pruebas de toxicidad.....	69
4.1.3.	Pruebas de crecimiento de <i>A. niger</i> en medios líquidos contaminados.....	73
4.1.4.	Pruebas de crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> en suelo contaminado.....	75
4.2.	Diseño estadístico de experimentos 2^3 completamente al azar.....	76
4.3.	Cinética de degradación de atrazina en suelo agrícola.	83
4.4.	Simulación de la cinética de degradación de atrazina aplicando un modelo logístico basado en el de Monod.	85

5. Conclusiones.....	89
6. Trabajo futuro.....	90
7. Referencias.....	91
Apéndice A.....	98
Apéndice B.....	101
Apéndice C.....	106
Apéndice D.....	110
Apéndice E.....	114

Índice de figuras

Figura 1. Fórmula estructural de la atrazina.	10
Figura 2. Rutas metabólicas de la biodegradación de atrazina por actividad enzimática de <i>A. niger</i> [10].	18
Figura 3. Diagrama de bloques de los experimentos de crecimiento de <i>A. niger</i> en suelos contaminados con atrazina.....	45
Figura 4. Diagrama de las combinaciones de parámetros del diseño estadístico de experimentos.....	47
Figura 5. Reacción de reducción del ácido 3, 5 dinitrosalicílico a ácido 3 – amino – 5 – nitrosalicílico.	55
Figura 6. Experimentos de control del proceso de degradación de atrazina para el balance de materia.	60
Figura 7. Resiembra de <i>A. niger</i> en el medio de cultivo contaminado con atrazina (t=5 h). (a) Control 0 ppm, (b) 20 ppm, (c)100 ppm, (d) 250 ppm, (e)500 ppm, (f) 1000 ppm.	68
Figura 8. Resiembra de <i>Aspergillus niger</i> en el medio de cultivo contaminado (t=48 h). (a) Control, (b) 20 ppm, (c)100 ppm, (d) 250 ppm, (e)500 ppm, (f) 1000 ppm.	69
Figura 9. Gráfica de promedio y desviación estándar de crecimiento del diámetro del halo de <i>A. niger</i> en un medio de cultivo (PDA,). Control (0 ppm de atrazina), (500ppm de atrazina) y (1000 ppm de atrazina).	71
Figura 10. Crecimiento de <i>A. niger</i> en medios contaminados (t= 7 días).	74
Figura 11. Gráfica de porcentaje de degradación de atrazina e intervalos de confianza después de siete días.....	82

Figura 12. Cinética de degradación de atrazina por actividad enzimática de *Aspergillus niger*.
Crecimiento de biomasa y concentración de atrazina contra el tiempo. 84

Figura 13. Simulación de la cinética de biodegradación de atrazina comparada con los datos
experimentales (donde $ATRAZINA_t$ es la cinética simulada con el modelo y $ATRAZINA_e$,
es la gráfica de datos experimentales). 88

Índice de tablas

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de la atrazina [2].	11
Tabla 2. Composición química del nopal (<i>Opuntia</i> sp.) con base a 100 g de.....	21
Tabla 3. Signos para el diseño de experimentos 2^3 y notación de YATES.....	24
Tabla 4. Análisis de varianza ANOVA para el diseño de experimentos 2^3 completamente al azar.....	26
Tabla 5. Composición del medio de cultivo para resiembra de <i>A. niger</i>	40
Tabla 6. Composición de la solución de oligoelementos para el medio de cultivo.....	40
Tabla 7. Pruebas de crecimiento de <i>A. niger</i> en medios contaminados.	44
Tabla 8. Combinaciones del diseño de experimentos 2^3	46
Tabla 9. Valores de los coeficientes de rendimiento de la ecuación de biodegradación de atrazina calculados por mol de carbono.	63
Tabla 10. Observaciones de las pruebas de crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> en medios contaminados con atrazina.....	74
Tabla 11. Resultados de las pruebas de crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> en suelo contaminados con atrazina.....	76
Tabla 12. Resultados experimentales de formación de biomasa y consumo de atrazina después de siete días. Diseño de experimentos 2^3 completamente al azar.	77
Tabla 13. Resultados del modelo lineal ($\alpha = 0.01$, 99% confianza). Análisis de varianza del modelo lineal general. Pruebas de los efectos inter – sujetos.....	78
Tabla 14. Pruebas post hoc y subconjuntos homogéneos para la combinación Temperatura- porcentaje de residuos.	79

Tabla 15. Pruebas post hoc y subconjuntos homogéneos para la combinación porcentaje de residuos – humedad.	80
Tabla 16. Pruebas post hoc y subconjuntos homogéneos para la combinación Temperatura – humedad.....	80
Tabla 17. Pruebas post hoc y subconjuntos homogéneos para la combinación Temperatura - porcentaje de residuos – humedad.....	81
Tabla 18. Resultados de la cinética de degradación de atrazina por actividad enzimática de <i>Aspergillus niger</i>	83
Tabla 19. Valores de los parámetros cinéticos de biodegradación de atrazina comparados con los reportados en la literatura [51].....	87

Resumen

La atrazina es un herbicida que se aplica en cultivos y en áreas donde se requiere controlar la maleza, es uno de los más usados a nivel mundial. Este agroquímico puede provocar diversos daños a la salud y al medio ambiente, entre los cuales se encuentran alteraciones en las funciones de algunos órganos, problemas de reproducción, alteración en los niveles de hormonas sexuales, etc. En este trabajo se diseñó un proceso para la degradación de atrazina en un suelo agrícola, utilizando un hongo llamado *Aspergillus niger* en presencia de residuos de nopal, los cuales fueron utilizados como fuente de nutrientes para favorecer el crecimiento del microorganismo. Para el desarrollo del proceso, primero se realizaron pruebas toxicológicas cualitativas para estudiar el efecto inhibitorio de la atrazina sobre el crecimiento del hongo. Posteriormente, se llevó a cabo la adaptación del hongo a crecer en un ambiente contaminado con el pesticida. Además, se realizó un diseño de experimentos del tipo 2^k completamente al azar para determinar las condiciones a las cuales el proceso podía resultar más eficiente, controlando la humedad, cantidad de residuos de nopal y temperatura del medio. Por último, se determinó la cinética de degradación a los valores de los parámetros controlados a los que la degradación de atrazina fue mayor. Con los resultados obtenidos, se implementó un modelo matemático no estructurado, que describiera el proceso.

Con los resultados obtenidos en este trabajo se encontró que las condiciones a las que se obtiene la mayor degradación de atrazina son 28°C, 80% de humedad y 10% de residuos de nopal. Además, se calculó el valor de los parámetros del modelo que describe la cinética de biodegradación de atrazina. Se encontró que el valor de la velocidad máxima de crecimiento de la biomasa debido a la degradación del plaguicida, $\mu_{m\acute{a}x}$, es de

$0.0514 \text{ mg}_{atz}/\text{día} \cdot \text{mg}_{biom}$; el valor calculado del coeficiente de rendimiento de moles de biomasa por mol de atrazina, Y , fue de $0.0037 \text{ mg}_{biom}/\text{mg}_{atz}$; mientras que el valor del coeficiente de decaimiento, K_d , es de $0.7788 \text{ }^1/\text{día}$. El valor calculado del coeficiente de saturación media K_s es de $4.44 \text{ mg}/\text{Kg}$. El modelo resultó adecuado para describir la cinética de biodegradación de atrazina.

Palabras clave: Atrazina, *Aspergillus niger*, biodegradación, suelo agrícola, diseño factorial.

1. Introducción

La contaminación ambiental provocada por procesos industriales es uno de los mayores problemas del mundo actual, ya que la mayoría de los compuestos liberados son xenobióticos. Los productos agroquímicos, entre ellos los plaguicidas, juegan un papel importante en la agricultura moderna, ya que aseguran una mayor producción. Sin embargo, su uso indiscriminado representa un serio peligro para el medio ambiente y la salud humana ya que éstos se encuentran entre los contaminantes cuya toxicidad ha sido comprobada [1].

La atrazina es uno de los herbicidas mayormente utilizados en la industria agrícola. Esta se aplica normalmente en cultivos de maíz, caña de azúcar, sorgo, etc., para evitar el crecimiento de malas hierbas, así como limitar la formación de nuevos ejemplares. La atrazina actúa inhibiendo el proceso de la fotosíntesis en las diferentes plantas (tanto pre como post emergentes) de hoja ancha. La fotosíntesis es el proceso en el cual las plantas utilizan la luz solar como energía para transformar el dióxido de carbono y el agua en carbohidratos. Durante la inhibición de la fotosíntesis, las plantas son incapaces de producir los nutrientes necesarios para sobrevivir [2].

La presencia de plaguicidas en el ambiente ha conducido a tomar acciones para reducir su uso y sus efectos adversos. Tal es el caso de la atrazina. Este herbicida se introdujo, a nivel mundial en la década de los 50 del siglo pasado, y desde entonces, ha sido utilizado frecuentemente, sólo o en combinación con otros herbicidas, en cantidades que van desde las 70,000 a las 90,000 toneladas anuales [3]. En México, el uso de atrazina comenzó en 1975

[SAGARPA]. En 1995, su consumo fue de 2102 toneladas, es decir, el 12.8% del total de este tipo de productos utilizados en este país. La importación de agroquímicos que contienen atrazina como ingrediente activo ha aumentado, de 189.35 toneladas en 2003 a 287.8 toneladas en 2012, provenientes principalmente de países como E.U.A., China, India, Israel e Italia [4].

Existe poca información acerca de los efectos de la atrazina en la salud del ser humano y otros seres vivos. Algunos estudios han sugerido que la exposición directa en animales tales como: cerdos, ratas y anfibios, provoca daños a nivel del sistema nervioso central, sistema endócrino e inmune, y causa alteraciones genéticas como el hermafroditismo en el caso específico de las ranas [5]. Es por estas razones que, a partir de la década de los 90's del siglo pasado, algunos países, principalmente europeos han prohibido su uso comercial. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la presencia de atrazina y sus derivados (metabolitos) ha persistido en suelos agrícolas hasta 10 años después de su prohibición [6].

En este contexto, México, además de otros países de América latina y El Caribe, han permitido el uso industrial de atrazina sin restricción alguna, por lo menos hasta 2013 [2].

Debido al peligro potencial que existe con la exposición del ser humano a la atrazina y dado que el principal contacto se da a través del agua para consumo humano, la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Agencia para la Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA), los países miembros de la Unión Europea, además de otros países, han establecido límites máximos permisibles para este herbicida en los cuerpos de agua utilizados en la actividad agrícola. La OMS, estableció en 2008, que el límite máximo de atrazina en agua

para consumo humano debe ser de 2 µg/L y de 100 µg/L de sus metabolitos. La US EPA estableció 3 µg/L como límite máximo permisible de atrazina en aguas de consumo humano, mientras que, en México, la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA-1994, no indica límite alguno para la exposición de este plaguicida. Existe un proyecto de modificación a esta Norma donde, tentativamente, el límite permitido para su existencia en agua para consumo humano sea de 2 µg/L [6].

La migración de la atrazina en el agua y el suelo es un proceso complejo. Diversos autores han encontrado que los principales procesos que controlan el destino final de este herbicida son, entre otros, su sorción en los diferentes componentes del suelo, su degradación, tanto química como biológica y fotolítica, así como el movimiento del agua superficial y subterránea [4].

Debido a los efectos tóxicos de la atrazina en los seres vivos y a su persistencia en el ambiente, se han desarrollado técnicas de remediación química, tales como los procesos de oxidación (ozonación, fotocátalisis, entre otros) y de biorremediación, (degradación a través de hongos, bacterias o plantas), han sido estudiadas para erradicar o reducir la presencia de atrazina en los suelos, aguas superficiales y subterráneas.

En los últimos 20 años, la Biotecnología ha realizado importantes avances en diferentes campos de aplicación, uno de ellos, es el uso de métodos biológicos para la degradación de contaminantes [1]. A pesar de que la atrazina puede transformarse a través de procesos químicos a sus derivados hidroxilados, la mineralización es un proceso que sólo llevan a cabo los microorganismos presentes en el suelo. Además, el tiempo de vida media de los

productos de la transformación química pueden exceder el tiempo de vida media del compuesto original [7].

La mineralización de la atrazina a través de la degradación biológica ocurre debido a la actividad metabólica de los microorganismos. Durante este proceso, los microorganismos utilizan atrazina como fuente de energía. Sin embargo, la presencia de otras fuentes de carbono o nitrógeno fácilmente disponibles pueden inhibirlo [6]. En el caso de microorganismos fotosintéticos, la presencia de carbono y de nitrógeno mineral en el suelo, limitan la biodegradación de la atrazina, ya que éstos utilizan preferentemente esas fuentes [8].

La degradación biológica de la atrazina puede llevarse a cabo a través de la acción bacteriana y de algunas familias de hongos. Este se considera el principal proceso por el que se degrada dicho plaguicida [9]. Su velocidad de degradación dependerá de las propiedades del suelo tales como el contenido de arcillas y de materia orgánica, así como el pH [10]. Otros estudios han demostrado que la aplicación de fertilizantes nitrogenados inhibe la mineralización de la atrazina [11].

Actualmente se han identificado un gran número de bacterias capaces de degradar atrazina, las cuales pertenecen principalmente a los géneros: *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Arthobacter*, y *pseudomonas*, entre otras [12]. Sin embargo, algunos estudios demuestran que, la actividad enzimática de estos microorganismos se lleva a cabo bajo condiciones ambientales limitadas y puede requerir la presencia de un metabolito particular de la atrazina. En el caso de las *pseudomonas*, se ha reportado que el proceso de degradación requiere de la

presencia del producto mono N – desalquilado de la atrazina antes de que comience el proceso. Estas *pseudomonas* pueden producir la deshalogenación de la atrazina, pero no su mineralización [7].

La degradación biológica de la atrazina no solo se ha limitado al metabolismo bacteriano, existen reportes de que algunos hongos también han sido capaces de metabolizar este herbicida. La degradación fúngica de la atrazina se ha estudiado principalmente con zigomicetos y ascomicetos, entre los cuales destacan: *Aspergillus fumigates*, *Aspergillus niger*, *Fusarium moniliforme*, *Penicillium decumbens*, *Rhizopus stolonifer*, *Trichoderma viride*, etc. [1].

En general, los hongos tienen ventaja sobre otros microorganismos como las bacterias, principalmente debido a la baja especificidad de sus enzimas catabólicas, las grandes áreas superficiales de adsorción de los compuestos que degradan y su gran capacidad de supervivencia a ambientes adversos. Estas características hacen que su uso sea adecuado para la biorremediación de contaminantes [12]. Algunos intermediarios formados en la degradación fúngica de la atrazina son la hidroxiatrazina, el ácido cianúrico y la urea, mientras que los principales productos finales son el amoníaco y el bióxido de carbono. Se sabe que la toxicidad de estos últimos es mucho menor a la del herbicida [12].

1.1.Objetivos.

1.1.1. Objetivo general.

Desarrollar un proceso que incremente la velocidad natural de biodegradación de atrazina por medio de la actividad enzimática de una cepa adaptada de *A niger*, en un suelo contaminado.

1.1.2. Objetivos específicos.

- Adaptar a *A. niger* a crecer en un medio sólido contaminado con atrazina, utilizando un cosustrato.
- Evaluar el efecto de la humedad, la temperatura y la concentración de cosustrato, durante la degradación de la atrazina en una muestra de suelo contaminado.
- Determinar la cinética de degradación de atrazina y de crecimiento de *A. niger* en una muestra de suelo contaminado, en presencia de cosustrato.
- Aplicar un modelo determinístico, simplificado que describa el proceso de biodegradación de atrazina en un suelo contaminado.

1.2. Hipótesis.

Un proceso factible para degradar atrazina biológicamente puede desarrollarse mediante el control de variables que favorezcan la actividad enzimática de *A. niger*. La adaptación natural del microorganismo para degradar atrazina presente en un suelo agrícola se podría lograr mediante el uso de un cosustrato y la adaptación continua de la cepa.

2. Antecedentes.

2.1. Características fisicoquímicas de la atrazina.

La atrazina pertenece al grupo de los herbicidas triazínicos organoclorados, es un polvo blanco e inodoro cuya fórmula química es $C_8H_{14}ClN_5$. Su nombre químico es 6-cloro-N-etil-N'-(1-metiletil)-1,3,5-triazina-2,4-diamina, y su número CAS es: 1912-24-9 [3]. Se sabe que el tiempo de vida media de este herbicida es de entre 5824 y 10×10^5 días [2] La fórmula estructural de la atrazina se muestra en la figura 1.

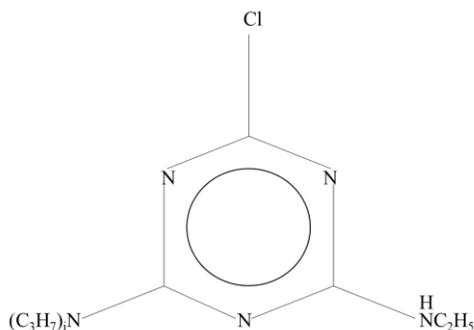


Figura 1. Fórmula estructural de la atrazina.

La atrazina es un compuesto xenobiótico, es decir, ha sido sintetizado por el hombre, soluble en agua, con baja volatilidad y poco reactivo. Esta molécula presenta un alto potencial de lixiviación y moderada movilidad en suelos. Actualmente, según la US EPA, la atrazina se clasifica como medianamente tóxica para el ser humano y altamente tóxica para el medio ambiente[6].

Para uso agrícola, la atrazina tiene diversas presentaciones comerciales tale como gránulos dispersables, soluciones concentradas o polvos humectables acompañados de surfactantes para elevar la solubilidad del ingrediente activo, cuya concentración va desde los 450 hasta los 960 gramos de ingrediente activo por Kilogramo de mezcla [14].

En la tabla 1, se muestran las principales propiedades físico – químicas de la atrazina entre las que sobresalen su punto de fusión, solubilidad en agua y el tiempo de vida media, ya que son parámetros que determinan su persistencia en los suelos de cultivo tratados con el pesticida.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de la atrazina [2].

<i>Parámetro</i>	<i>Valor característico</i>
Peso molecular	215.68 g/mol
Punto de fusión	173 – 177°C
Presión de vapor	3.8×10^5 Pa
Solubilidad en agua a 25°C	35 mg/L
Tiempo de vida media (por biodegradación)	10×10^5 – 5×10^5 días
Constante de la ley de Henry	3.04×10^{-9} atm m ³ /mol
Logaritmo negativo de la constante de disociación (pKa)	1.62 a 20°C; 1.70 a 21°C
Logaritmo del coeficiente de partición en carbono orgánico (log K _{oc})	2.0 L/Kg
Logaritmo del coeficiente de partición octanol/agua (Log K _{ow})	2.7 L/Kg

2.2. Métodos de degradación de la atrazina.

2.2.1. Métodos químicos.

Durante décadas se han desarrollado diversos métodos para llevar a cabo la remoción de atrazina en aguas, así como en suelos. Entre ellos se encuentran los métodos físicos como la adsorción utilizando adsorbentes de carbono y la nanofiltración [15]. Sin embargo, aunque estos procesos resuelven el problema de la persistencia de este contaminante en el sitio impactado, su degradación no se lleva a cabo, en cambio, los métodos químicos, como la hidroxilación, disminuyen la toxicidad de la atrazina formando hidroxiatrazina. Otro ejemplo de degradación química de la atrazina son las reacciones fotocatalíticas. Este tipo de reacciones se llevan a cabo a través de la absorción óptica de la atrazina en un sólido que jugará el papel de un catalizador bajo una radiación de luz. Entre los catalizadores más utilizados en este proceso, se encuentran los materiales metal – orgánicos estructurados, llamados también MOF's por sus siglas en inglés, que son sólidos porosos de estructura cristalina formados por una red extendida de iones metálicos coordinados a moléculas orgánicas que funcionan como ligandos [16].

Los procesos oxidantes avanzados (AOP's, por sus siglas en inglés) han despertado gran interés para la degradación de la atrazina. Estos procesos se basan en la formación de radicales altamente activos, dependen de la formación del radical hidroxilo OH^{\bullet} , el cual es capaz de oxidar contaminantes orgánicos. Este radical se obtiene generalmente utilizando catalizadores de metales de transición o peróxidos como el PMS (peroximonosulfato). Se

considera que este tipo de procesos tiene gran potencial debido a su alta eficiencia y alta velocidad de reacción [17].

Otros métodos químicos utilizados comúnmente para la hidroxilación de la atrazina son la oxidación electroquímica [18], los procesos reductores avanzados [19], la degradación inducida por microondas [20], etc. Generalmente, los mecanismos de reacción de degradación química de la atrazina involucran los procesos de desalquilación, oxidación de los grupos alquilo, descloración e hidroxilación simultáneamente [21].

2.2.2. Métodos biológicos.

Como ya se ha mencionado, la degradación completa o mineralización de la atrazina en suelos, se lleva a cabo principalmente por la actividad microbiana. Los principales mecanismos de biodegradación de la atrazina son: la descloración, la n – desalquilación y la escisión del anillo aromático. En los sistemas biológicos, la atrazina es utilizada preferentemente como fuente de nitrógeno debido al estado totalmente oxidado de los carbonos del anillo aromático, aunque las cadenas laterales de los n- alquilo pueden también utilizarse como fuente de carbono [22].

La mineralización de la atrazina se lleva a cabo, generalmente en dos etapas. En la primera se produce el ácido cianúrico a través de la remoción de las cadenas laterales de n – alquilo debido a los procesos hidrolíticos y oxidantes hidrolíticos de enzimas poco específicas. El ácido cianúrico, posteriormente, es hidrolizado produciendo el reactivo de Biruet, alofanato,

amonio y bióxido de carbono por acción de un conjunto de enzimas con un rango limitado de sustratos [23].

La hidroxiatrazina es el mayor intermediario existente tanto en suelos como en los sistemas acuíferos debido a la degradación química. Este compuesto se sorbe con mayor facilidad en el suelo y su tiempo de vida media es mayor que el de la atrazina. La hidroxiatrazina es también es el metabolito primario durante la biodegradación bacteriana.

Los primeros microorganismos degradadores de atrazina aislados degradaron parcialmente el contaminante mediante la desalquilación o desaminación de la molécula sin romper el anillo aromático. En 1984, Benki y Kahn [24] aislaron una cepa de pseudomonas que requería la presencia del producto n – desalquilado de la atrazina antes de que la deshalogenación del anillo pudiera llevarse a cabo. Estas pseudomonas lograron la deshalogenación de la atrazina, pero no pudieron mineralizar la molécula completa.

Además de las pseudomonas, se han empleado cepas de algunos hongos para la biorremediación de compuestos xenobióticos, entre ellos pesticidas como la atrazina. Se sabe que estos microorganismos tienen ventajas sobre otros debido a las redes de micelio extendidas, la naturaleza extracelular de las enzimas degradadoras y su baja especificidad, la utilización de compuestos orgánicos exclusivamente como sustrato de crecimiento, las grandes áreas superficiales de adsorción, el estado genético constante, la población masiva y la gran capacidad de supervivencia de los hongos portadores de esporas en el medio natural [25].

2.2.3. Biodegradación de atrazina a través de *Aspergillus niger*.

Los hongos filamentosos son organismos pluricelulares compuestos por células eucariotas, formados por una serie de ramas tubulares llamadas hifas, el conjunto de las cuales forman el micelio. En contraste con la relativa simplicidad de su cuerpo vegetal, sus estructuras reproductivas incluyen varios tipos de esporas unicelulares producidas solas o en cuerpos fructíferos visibles y complejos. Se caracterizan por presentar crecimiento rápido, tener reservorios naturales en el suelo, plantas, animales y vegetales muertos. Estos microorganismos crecen a temperaturas entre 25 - 30°C y sus esporas o conidios son transportados por el aire, son normalmente inhalados y presentan gran resistencia en el medio ambiente.

Los hongos filamentosos pueden reproducirse por la simple fragmentación de las hifas, es decir, a través de la reproducción asexual o mediante la formación de estructuras especializadas como células conidiógenas o esporangios, por medio de la reproducción sexual [26]. La reproducción sexual sucede entre dos gametos de sexos contrarios, ahí, se da la plasmogamia que es la invasión de una célula al citoplasma de la otra. Posteriormente, se facilita la fusión de ambos núcleos en una segunda fase llamada cariogamia, generando un cigoto que, a través de la fase de meiosis, formará un esporangio, que tendrá esporas sexuales haploides, también llamadas meiosporas. Las esporas sexuales pueden mantenerse latentes por largos periodos de tiempo, y cuando las condiciones son óptimas recuperan la viabilidad, “germinan”, generan hifas, micelio y un nuevo individuo [27]. Por otra parte, en el proceso de reproducción asexual se forma una yema en la célula que a través de la mitosis generará un nuevo individuo. El objetivo común de este tipo de reproducción asexual de los hongos

es generar un crecimiento del micelio fúngico o colonizar un sitio o sustrato específico, para el cual ya se cuenta con los genes necesarios para sobrevivir. Además de los dos mecanismos comunes, en la reproducción de los hongos, también se puede presentar esporulación de tipo asexual, que representa la formación de esporas por mitosis llamadas mitosporas y muchos hongos filamentosos pueden fragmentarse para que dichos fragmentos formen individuos completos [28].

Entre los hongos filamentosos, algunos de mayor interés en la industria biotecnológica son los del género *Aspergillus* pertenecientes al filo Ascomycota, de la clase *Eurotiomycetes*. Estos microorganismos obtienen los nutrientes necesarios por absorción, cuyo metabolismo se desarrolla a través de un proceso quimiorganoheterotrófico, es decir, adquieren los nutrientes necesarios para su desarrollo a partir de sustancias químicas complejas presentes en la naturaleza. Este tipo de hongos sobreviven excretando enzimas que degradan una gran variedad de sustratos orgánicos hasta convertirlos en sustancias más simples que finalmente pueden ser empleadas como nutrientes. Al igual que la mayoría de los microorganismos, el metabolismo de *A. niger*, comprende una serie de enzimas interrelacionadas que controlan las vías catabólicas y anabólicas que suministran la energía necesaria que demandan las células [29].

A. niger es uno de los hongos filamentosos que ha cobrado mayor relevancia en aplicaciones biotecnológicas, con una impresionante diversidad de productos de alto rendimiento [30-31]. Este microorganismo es utilizado en la producción de enzimas extracelulares como glucoamilasas, pectinasas, celulasas y hemicelulasas [32]. En los últimos años, se han identificado algunos genes exclusivos en *A. niger* implicados en la biosíntesis de metabolitos

secundarios complejos e involucrados en la degradación de compuestos aromáticos, lo cual ha hecho evidente su importancia para la producción de nuevos productos y su alto potencial para la degradación de contaminantes tales como la atrazina [33].

La red metabólica publicada para *A. niger*, está constituida por 1190 reacciones y 1045 metabolitos, distribuidos en tres compartimentos: extracelular, citoplasmático y mitocondrial [34]. Resulta casi imposible conocer en detalle el funcionamiento regulatorio de las diversas enzimas, sin embargo, se sabe que el mayor potencial para la biorremediación a través de hongos filamentosos como *A. niger*, está asociado a las llamadas enzimas de maceración, tales como las pectinasas, celulasas y hemicelulasas que catalizan la mineralización de una serie de compuestos recalcitrantes, como la atrazina. Estas enzimas son ampliamente encontradas en hongos del género *Trichoderma* y *Aspergillus* [35]. En la figura 2 se muestra de manera general las posibles rutas metabólicas de la degradación de la atrazina por actividad enzimática de *A. niger*.

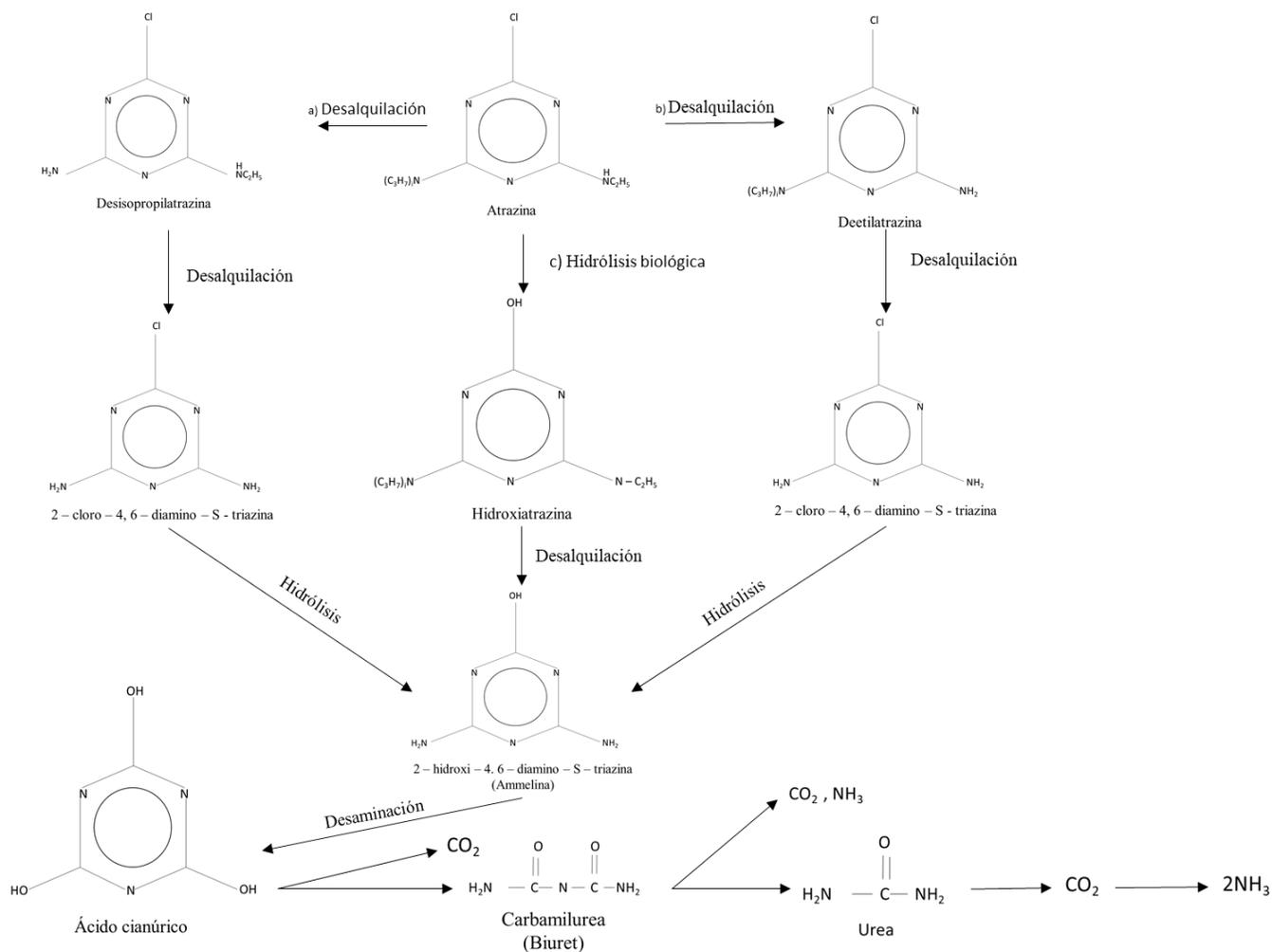


Figura 2. Rutas metabólicas de la biodegradación de atrazina por actividad enzimática de *A. niger* [10].

2.2.4. Utilización de residuos de nopal como cosustrato.

Como se ha mencionado anteriormente, la habilidad de los hongos filamentosos para degradar la atrazina puede ser atribuida a su sistema de degradación de pectina. Sin embargo, la introducción de estos microorganismos como potenciales biorremediadores de contaminantes, requiere su adaptación a los componentes bióticos y abióticos presentes en el medio [36]. En este sentido, es necesario comprender la relación entre la biodegradación de plaguicidas y los cambios en las características físicoquímicas del ambiente, sobre todo, si estas variaciones afectan las propiedades del contaminante o a la fisiología del hongo en el proceso. Por ejemplo, la baja biodisponibilidad o accesibilidad al contaminante y preferencia de los hongos por fuentes de nutrientes diferentes al herbicida pueden causar una limitada biodegradación [37].

En los últimos años, se ha explorado la aplicación de algunas alternativas que buscan mejorar los procesos de biorremediación basados en hongos, tales como la utilización de enzimas libres, en lugar de la microbiota y transformaciones genéticas de hongos [38]. Estos procesos pueden llegar a ser costosos debido a su complejidad, sin embargo, existen alternativas como la utilización de una fuente de nutrientes fácilmente disponible como cosustrato, con el objetivo de favorecer el crecimiento y la adaptación del microorganismo al medio contaminado. En el caso particular de *A niger*, se propone el uso de los residuos de nopal cuya composición representa una fuente rica en lignina, pectina y celulosa, componentes que pueden favorecer la producción de las enzimas capaces de degradar la atrazina una vez que el microorganismo se ha adaptado al medio contaminado.

Las plantas de la familia Cactaceae crecen principalmente en zonas áridas y semiáridas de México. Esta familia incluye más de 1500 especies, de las cuales al menos 850 crecen en nuestro país y se estima que cerca de 80% son endémicas. El nopal verdura (*Opuntia ficus indica*) se consume y produce en México, donde sus usos son diversos, como fruta, hortaliza o forraje, protección del suelo, planta medicinal, materia prima para la industria de cosméticos, etc. [39].

El nopal es una planta rica en fibra soluble e insoluble en agua. La fibra soluble se compone de mucílago, gomas, pectina, y hemicelulosa. La fibra insoluble se compone de celulosa, lignina y una gran fracción de hemicelulosa. Los carbohidratos que se encuentran en este tipo de vegetales son monosacáridos como la D-galactosa, L-arabinosa, D-xilosa, y L-ramnosa y polisacáridos como la celulosa, hemicelulosa, lignina y pectina. Además, el nopal contiene minerales como el fósforo, potasio, calcio, magnesio, manganeso y zinc. Esta composición pone de manifiesto la viabilidad de su uso como cosustrato en el proceso de biodegradación de la atrazina a través de hongos, ya que esta fuente de nutrientes promueve la producción de las enzimas degradadoras del herbicida. En la tabla 2 se muestra la composición química del nopal.

Tabla 2. Composición química del nopal (*Opuntia sp.*) con base a 100 g de materia fresca [40].

Componente	(g/100 g)
Agua	88 – 95
Carbohidratos	3 – 7
Proteínas	1 – 2
Cenizas	0.5 – 1.7
Lípidos	0.2
Minerales	(g/100 g)
Fósforo	16
Potasio	257
Calcio	93
Magnesio	52
Hierro	1.6
Manganeso	0.5
Cobre	0.1
Zinc	0.3

2.3. Diseño estadístico de experimentos factorial 2^k completamente al azar.

Un diseño de experimentos del tipo factorial, es aquel en el que se investigan las posibles combinaciones de los niveles de los factores o parámetros modificados en un experimento completo. En este caso, se supone la existencia de repeticiones de los experimentos en cada una de las combinaciones de los niveles correspondientes a cada factor [41].

En este diseño, cada factor se estudia a solo dos niveles y sus experimentos contemplan todas las combinaciones de cada nivel de un factor con todos los niveles de los otros factores.

Dado que sólo existen dos niveles para cada factor, es necesario suponer que la respuesta es aproximadamente lineal sobre el rango de los niveles seleccionados para el factor. Así, este tipo de diseño experimental es la forma más económica de estudiar el efecto combinado de k factores.

Para conocer el efecto de un factor es suficiente con hacerlo variar entre dos valores. Los más adecuados son los extremos de su dominio experimental: entre el nivel -1 y el $+1$. Y además esta variación se debe realizar para cada posible combinación de los valores de los demás factores. Esto permitirá descubrir si el efecto depende de qué valor tomen los otros factores [41].

2.3.1. Diseño de experimentos 2^3 completamente al azar.

En los diseños factoriales 2^3 se tienen tres factores de interés A, B y C a dos niveles cada uno. Todas estas combinaciones están contempladas en el diseño factorial completo, donde se eligen tres parámetros a modificar en niveles alto y bajo para lo cual resultan en total ocho experimentos [42].

En este caso, el efecto principal del parámetro A puede estimarse promediando el valor de la variable respuesta correspondiente a las primeras cuatro combinaciones de tratamiento para las cuales los niveles representados incluyen el nivel alto del factor “a” y restando de esta cantidad el promedio de las siguientes cuatro combinaciones. Para lo cual resulta las ecuaciones 1 y 2 [42].

$$A = \bar{Y}_{A+} - \bar{Y}_{A-} = \frac{a+ab+ac+abc}{4n} - \frac{1+b+c+bc}{4n} \quad \text{ec. (1)}$$

$$A = \frac{1}{4n} (a + ab + ac + abc - (1) - b - c - bc) \quad \text{ec. (2)}$$

De igual forma, el efecto principal del parámetro B puede estimarse promediando el valor de la variable respuesta de las cuatro combinaciones correspondientes a los valores altos del parámetro “b”, menos el promedio de los valores correspondientes a las combinaciones restantes, dando como resultado la ecuación 3.

$$B = \bar{Y}_{B+} - \bar{Y}_{B-} = \frac{1}{4n} (b + ab + bc + abc - (1) - a - c - ac) \quad \text{ec. (3)}$$

El efecto C es la diferencia de los promedios de las combinaciones de los cuatro factores que incluyen a todos los valores altos del parámetro “c” y los cuatro valores restantes. Esto queda representado por la ecuación 4 [41].

$$C = \bar{Y}_{C+} - \bar{Y}_{C-} = \frac{1}{4n} (c + ac + bc + abc - (1) - a - b - ab) \quad \text{ec. (4)}$$

Los efectos de interacción se pueden determinar a partir de las ecuaciones 5 a 8.

$$B = \frac{\text{Efecto A para } B_{+} - \text{Efecto A para } B_{-}}{2} = \frac{abc - bc + ab - b - ac + c - a + (1)}{4n} \quad \text{ec. (5)}$$

$$AC = \frac{\text{Efecto A para } C_{+} - \text{Efecto A para } C_{-}}{2} = \frac{(1) - a + b - ab + c - ac + bc - abc}{4n} \quad \text{ec. (6)}$$

$$BC = \frac{\text{Efecto B para } c_+ - \text{Efecto B para } c_-}{2} = \frac{(1)+a-b-ab-c-ac+bc+abc}{4n} \quad \text{ec. (7)}$$

$$ABC = \frac{abc-bc-ac+c-ab+b+a-(1)}{4n} \quad \text{ec. (8)}$$

El cálculo de los contrastes y de los efectos se puede realizar a partir de la tabla 3.

Tabla 3. Signos para el diseño de experimentos 2^3 y notación de YATES.

Experimento	YATES	A	B	C	AB	AC	BC	ABC
1	(1)	-	-	-	+	+	+	-
2	a	+	-	-	-	-	+	+
3	b	-	+	-	-	+	-	+
4	ab	+	+	-	+	-	-	-
5	c	-	-	+	+	+	+	-
6	ac	+	-	+	-	-	+	+
7	bc	-	+	+	-	+	-	+
8	abc	+	+	+	+	-	-	-

A partir de la tabla anterior se pueden obtener los signos para los contrastes de interacción, multiplicando las columnas adecuadas de los efectos principales. Por ejemplo:

La columna con los signos de interacción AC se puede obtener multiplicando la columna A con la columna C renglón por renglón y el contraste AC resulta de multiplicar la columna de YATES por la columna de signos AC.

La suma de cuadrados y efectos para la construcción de la tabla ANOVA (Análisis de varianza) se puede obtener a partir de las ecuaciones 9 y 10 respectivamente.

$$SC = \frac{\text{Contraste}^2}{8} \quad \text{ec. (9)}$$

$$\text{Efecto} = \frac{\text{Contraste}}{4n} \quad \text{ec. (10)}$$

2.3.2. Análisis de la varianza (ANOVA).

El análisis de la varianza (ANOVA: **A**nalysis of **v**ariance) es un método para comparar dos o más medias que permite contrastar la hipótesis nula de que las medias de K poblaciones (K > 2) son iguales, frente a la hipótesis alternativa de que por lo menos una de las poblaciones difiere de las demás en cuanto a su valor esperado. Este contraste es fundamental en el análisis de resultados experimentales, en los que interesa comparar los resultados de K “tratamientos” o “factores” con respecto a la variable dependiente o de interés [41].

El ANOVA se basa en la descomposición de la variación total de los datos con respecto a la media global (SCT), que bajo el supuesto de que la hipótesis nula es cierta, es una estimación de σ^2 obtenida a partir de toda la información muestral, en dos partes:

La variación dentro de las muestras (SCD) o Intra-grupos, que cuantifica la dispersión de los valores de cada muestra con respecto a sus correspondientes medias y la variación entre muestras (SCE) o Inter-grupos que cuantifica la dispersión de las medias de las muestras con

respecto a la media global [41]. El intervalo de confianza para la media se calcula por defecto al 95% de confianza.

En el caso del diseño de experimentos 2^3 , la tabla de análisis de varianza puede representarse como se muestra en la tabla 4 [42].

Tabla 4. Análisis de varianza ANOVA para el diseño de experimentos 2^3 completamente al azar.

F. V.	S. C.	G. L.	M. C.	F	P
Factor A	SCA	a - 1	$MCA = \frac{SCA}{a - 1}$	$FA = \frac{MCA}{MCE}$	Probabilidad
Factor B	SCB	b - 1	$MCB = \frac{SCB}{b - 1}$	$FB = \frac{MCB}{MCE}$	Probabilidad
Factor C	SCC	c-1	$MCC = \frac{SCC}{c - 1}$	$FC = \frac{MCC}{MCE}$	Probabilidad
Interacción AB	SCAB	(a - 1) (b - 1)	$MCAB = \frac{SCAB}{(a - 1)(b - 1)}$	$FC = \frac{MCAB}{MCE}$	
Interacción BC	SCBC	(b-1)(c-1)	$MCBC = \frac{SCBC}{(b - 1)(c - 1)}$	$FC = \frac{MBC}{MCE}$	
Interacción AC	SCAC	(a-1)(c-1)	$MCAC = \frac{SCAC}{(a - 1)(c - 1)}$	$FC = \frac{MAC}{MCE}$	
Interacción ABC	SCABC	(a-1)(b-1)(c-1)	$MCABC = \frac{SCABC}{(a - 1)(b - 1)(c - 1)}$	$FC = \frac{MABC}{MCE}$	
Residual	SCE	abc (n-1)	$MCE = \frac{SCE}{(abcn - 1)}$		
Total	SCT	abcn - 1			

Donde S. C. es la suma de cuadrados de cada factor; G.L., son los grados de libertad para cada uno de ellos, M. C., es la media de cuadrados y F el cociente entre la media de los cuadrados de A y B y el residual.

2.4. Modelos cinéticos para la determinación de la velocidad de reacciones biológicas.

La teoría de las reacciones químicas consta de dos aspectos fundamentales, la termodinámica química y la cinética química. La termodinámica se concentra en el estudio del equilibrio químico, es decir, cuán lejos puede llegar una reacción no importando qué tan rápido se lleve a cabo. Por otro lado, la cinética química describe el comportamiento de una reacción en el tiempo, ya sea que ésta se lleve a cabo en un medio homogéneo o heterogéneo. A partir de esta descripción puede determinarse el tiempo necesario para que el sistema alcance el equilibrio y la manera en que los reactivos interactúan y se transforman en productos [43].

La ley de velocidad es una expresión matemática que relaciona los parámetros que influyen sobre la velocidad de reacción tales como la temperatura, concentración inicial y la energía de activación. De esta manera, se define la velocidad de reacción de un soluto A con la ecuación 11[43].

$$v_A = -\frac{dn_A}{dt} \quad \text{ec. (11)}$$

Donde v_A es la velocidad de desaparición del reactivo A; n_A es el número de moles del soluto A e el tiempo t y t , es el tiempo. La velocidad de reacción específica se define entonces a través de la ecuación 12.

$$V_A = \frac{v_A}{V} \quad \text{ec. (12)}$$

Donde V_A es la velocidad específica de reacción del soluto A y V es el volumen del sistema.

De esta manera se obtiene la ecuación 13.

$$V_A = -\frac{1}{V} \frac{dn_A}{dt} \quad \text{ec. (13)}$$

Si el fenómeno se lleva a cabo a volumen constante puede escribirse la ecuación 14.

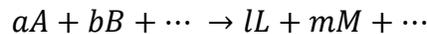
$$V_A = -\frac{d\left(\frac{n_A}{V}\right)}{dt} \quad \text{ec. (14)}$$

Donde $\frac{n_A}{V}$ es la concentración del soluto A en la solución, por lo que se obtiene la ecuación

15.

$$V_A = -\frac{d[A]}{dt} \quad \text{ec. (15)}$$

Donde ahora $[A]$ es la concentración del soluto A en la solución. Es así como la velocidad de reacción puede expresarse por medio de funciones de los parámetros del sistema y los mecanismos de reacción.



De forma general, la velocidad de reacción se puede expresar utilizando la ecuación 16.

$$v = kC_A^\alpha C_B^\beta \dots C_L^\lambda C_M^\mu \quad \text{ec. (16)}$$

Entonces, la velocidad de reacción puede expresarse con la ecuación 17.

$$-\frac{d[A]}{dt} = k[A]^n \quad \text{ec. (17)}$$

Donde k es la constante de velocidad de reacción y n es el orden global de la reacción.

Uno de los aspectos de mayor interés en el estudio de los sistemas biológicos, son las reacciones catalíticas que se llevan a cabo. Por definición, un catalizador es una sustancia que afecta la velocidad de reacción sin alterar sus propiedades de equilibrio ni consumirse durante el proceso [44]. Las enzimas, complejos enzimáticos, organelos celulares y células pueden comportarse como catalizadores biológicos. Éstos pueden ser de origen animal, vegetal o microbiano.

De forma análoga a las reacciones químicas, las reacciones biológicas pueden estudiarse a través termodinámica y la cinética de reacciones. Una reacción biológica catalizada puede ser caracterizada a través de variables como la velocidad de reacción y la obtención del producto a partir de un sustrato [45].

En general, las reacciones catalíticas se clasifican en dos grandes grupos. Las reacciones homogéneas y heterogéneas. Se considera que una reacción es homogénea si la temperatura y las concentraciones de todas las especies son uniformes, por otra parte, si en el sistema existen gradientes de temperatura o concentración, éste es heterogéneo. La mayoría de las fermentaciones y reacciones enzimáticas llevadas a cabo en sistemas con procesos de mezclado, se consideran reacciones homogéneas.

El análisis de los sistemas heterogéneos requiere la aplicación de los principios de transferencia de masa en conjunción con la teoría de reacciones [45].

2.4.1. Cinética enzimática: Modelo de Michaelis – Menten.

La cinética de la mayoría de las reacciones enzimáticas puede representarse de forma adecuada a través de la ecuación de Michaelis -Menten.

Este modelo considera que las reacciones catalizadas enzimáticamente ocurren en dos etapas; la primera ocurre con la formación de un complejo enzima – sustrato y posteriormente, en una segunda etapa, ocurre la formación del producto. Este proceso puede describirse a través de la ecuación 18.



La velocidad de formación del complejo enzima – sustrato v_1 puede describirse a través de la ecuación 19, la velocidad de recuperación de la enzima y formación de producto se pueden representar con las ecuaciones 20 y 21 respectivamente.

$$v_1 = k_1[E][S] \quad ec. (19)$$

$$v_2 = k_2[ES] \quad ec. (20)$$

$$v_3 = k_3[ES] \quad ec. (21)$$

Donde k_1 , k_2 y k_3 son constantes microscópicas de velocidad. Además, $[E]$ es la concentración de la enzima libre y $[ES]$ es la concentración del complejo enzima – sustrato.

Haciendo un balance de masa para la cantidad de enzima presente, se obtiene la ecuación 22.

$$[E_T] = [E] + [ES] \quad \text{ec. (22)}$$

Donde $[E_T]$ es la concentración total de enzima. Entonces, la velocidad de formación del complejo enzima – sustrato se representa a través de la ecuación 25.

$$[E] = [E_T] - [ES] \quad \text{ec. (23)}$$

$$v_1 = k_1\{([E_T] - [ES])[s]\} \quad \text{ec. (24)}$$

$$v_1 = k_1[E_T][s] - k_1[ES][s] \quad \text{ec. (25)}$$

El modelo de Michaelis – Menten considera que cada molécula de enzima reacciona con una molécula de sustrato a la vez. Por otro lado, se considera también la hipótesis del estado estacionario, lo cual implica que la velocidad de formación y disociación del complejo enzima – sustrato es mucho mayor que la velocidad de formación del producto, por lo tanto, la concentración del complejo se considera constante. También se asume que las velocidades de formación y disociación del complejo son iguales y que la velocidad de formación de los productos es constante. A partir de estas consideraciones se obtienen las ecuaciones 26 y 27 [46].

$$v_1 = v_2 + v_3 \quad \text{ec. (26)}$$

$$v = v_3 = k_3[ES] \quad \text{ec. (27)}$$

Tomando en cuenta lo anterior, se puede escribir la ecuación 28.

$$k_1[E_T][S] - k_1[ES][S] = k_2[ES] + k_3[ES] \quad \text{ec. (28)}$$

Despejando [ES] y agrupando algunos términos, se obtiene la ecuación 29.

$$[ES] = \frac{[E_T][S]}{K_m + [S]} \quad \text{ec. (29)}$$

Agrupando las constantes cinéticas, se obtiene la ecuación 30.

$$K_m = \frac{(k_2 + k_3)}{k_1} \quad \text{ec. (30)}$$

Por lo tanto, en el estado estacionario, la ecuación 31 representa la velocidad de reacción para cualquier proceso enzimático.

$$v = v_3 = k_3[ES] = \frac{k_3[E_T][S]}{K_m + [S]} \quad \text{ec. (31)}$$

Donde K_m es la constante de Michaelis – Menten, parámetro que resulta muy importante ya que éste proporciona una idea de la afinidad de la enzima por el sustrato, se considera que, a menor K_m , existe mayor afinidad. Además, los valores de K_m de muchas enzimas son próximos a los de la concentración fisiológica de sus sustratos, de forma que pequeñas variaciones en la [S] pueden suponer grandes cambios en la velocidad de toda una ruta metabólica [47].

Para este modelo, resulta interesante analizar dos casos extremos. Por un lado, si la concentración del sustrato es muy pequeña, es decir $[s] \ll K_m$, las constantes cinéticas del modelo se pueden agrupar como lo muestra la ecuación 32.

$$\frac{k_3[E_T]}{K_m} = k_{obs} \quad \text{ec. (32)}$$

En este caso, se observa, una cinética de primer orden que puede expresarse con la ecuación 33.

$$v = K_{obs}[s] \quad \text{ec. (33)}$$

Por otro lado, si la concentración de sustrato es elevada, $[s] \gg K_m$ se obtiene la ecuación 34.

$$k_3[E_T] = cte. \quad \text{ec. (34)}$$

La reacción es de orden cero respecto al sustrato. Cuando toda la enzima disponible se encuentra unida al sustrato se describe a través de la ecuación 35.

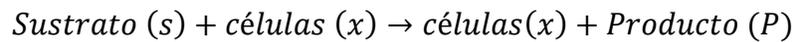
$$v_{max} = k_3[E_T] \quad \text{ec. (35)}$$

La ecuación 36 representa la forma más conocida de la ecuación de Michaelis – Menten.

$$v = \frac{v_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad \text{ec. (36)}$$

2.4.2. Cinética de crecimiento celular: Modelo de Monod.

A pesar de que el crecimiento de las células es un fenómeno muy complejo, a menudo se puede obtener una descripción global adecuada a través de ecuaciones relativamente sencillas. Entre ellas la más utilizada es la ecuación de Monod. Esta ecuación describe el crecimiento celular en función de la disponibilidad de un sustrato limitante y se puede expresar de la siguiente manera:



Este modelo resulta conveniente especialmente cuando se desea describir cinéticas de degradación y se plantea realizando las siguientes consideraciones: Se describen dos fases de crecimiento celular: la fase exponencial y la fase de desaceleración. Además, se asume que el crecimiento celular está limitado solamente por la concentración de un sustrato limitante y que la velocidad de crecimiento celular y la concentración de sustrato están relacionadas a través de la cinética de Michaelis – Menten como lo muestra la ecuación 37.

$$v(t) = \mu_{m\acute{a}x} \frac{S(t)}{K_S + S(t)} \quad \text{ec. (37)}$$

Donde K_S es la constante de saturación de Monod; $v(t)$, es la velocidad de crecimiento específica de las células; $\mu_{m\acute{a}x}$, es el máximo valor que puede alcanzar la velocidad de crecimiento cuando la cantidad de sustrato es mucho mayor que la constante de Monod y las concentraciones del resto de nutrientes no han cambiado de forma considerable; $S(t)$, es la

cantidad de sustrato en el tiempo t . La velocidad de crecimiento para la población celular “x” está dada por la ecuación 38.

$$x'(t) = v(t)x(t) \quad \text{ec. (38)}$$

Donde $x'(t)$, es la velocidad de crecimiento de la población celular; $x(t)$, es la población celular en el tiempo t . Considerando que una fracción constante del sustrato consumido es transformado en biomasa, se obtiene la ecuación 39.

$$S(t) - S_0 = \frac{x_0 - x(t)}{Y} \quad \text{ec. (39)}$$

Donde x_0 es la concentración inicial de células; Y es el valor del coeficiente de rendimiento. Este parámetro se considera constante; S_0 es la concentración inicial de sustrato [48].

El modelo de Monod tiene algunas limitaciones ya que, por un lado, no describe la fase de latencia donde las células o algunos microorganismos transitarán por una fase de adaptación o crecimiento lento, ni la fase estacionaria donde no se observa crecimiento de las células, lo cual es importante en este estudio, ya que la fase de latencia se puede observar en el proceso de degradación de atrazina. Para resolver esta problemática se han desarrollado algunos modelos de crecimiento capaces de describir estas fases.

2.4.3. Modelo logístico basado en el modelo de Monod.

Como ya se ha mencionado anteriormente, los modelos clásicos de crecimiento celular no describen los periodos de latencia, por lo que no pueden ser usados para describir la cinética de biodegradación de pesticidas en experimentos por lotes debido a que, en ellos, los recursos del medio no son ilimitados. Además, la naturaleza autónoma de este tipo de modelos significa que la velocidad específica $\mu(x)$, depende solamente del número actual de células y no depende, por ejemplo, de su estado fisiológico interno. El problema planteado anteriormente puede resolverse a través del modelado logístico [49].

El modelo logístico fue desarrollado por Pierre Verhulst (1838) quien sugiere que la tasa de crecimiento de una población se encuentra limitada debido a diferentes factores como la misma densidad de población, lo que da como resultado un estado de equilibrio. La ecuación 40 expresa la forma diferencial del modelo logístico [50]:

$$\frac{dN}{dt} = rN = r_0N \left(1 - \frac{N}{K}\right) \quad \text{ec. (40)}$$

Donde N es la cantidad de población, r_0 es la velocidad de crecimiento de la población considerando una tasa exponencial y K es el límite superior de crecimiento, también llamado, capacidad de carga.

El modelo matemático basado en la ecuación de Monod puede expresarse de la siguiente manera con la ecuación 41.

$$r_0 = \mu(t) = \mu_{\text{máx}} \frac{S(t)}{S(t)+K_s} \quad \text{ec. (41)}$$

Además, considerando la ecuación 42, el modelo que describe la degradación del pesticida y el crecimiento celular puede ser descrito a través de las ecuaciones 43 y 44 respectivamente.

$$N = X(t) \quad \text{ec. (42)}$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y} \mu_{\text{máx}} \frac{S(t)}{S(t)+K_s} X \quad \text{ec. (43)}$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\text{máx}} \frac{S(t)}{S(t)+K_s} X - K_d X \quad \text{ec. (44)}$$

Donde S es la concentración de sustrato expresada en mg/L ; X es la concentración de biomasa en mg/L , $\mu_{\text{máx}}$ es la velocidad máxima de crecimiento de biomasa a partir del consumo de sustrato en $\text{mg}/\text{día} \cdot \text{mg}_{\text{Atz.}}$, K_s es el coeficiente de saturación media expresada en mg/Kg y K_d es el coeficiente de decaimiento de la biomasa en $1/\text{día}$.

El modelo que describen las ecuaciones 43 y 44 fue desarrollado y utilizado por Carboneras B. et. al. para el estudio de la cinética de biodegradación de atrazina. En su trabajo, se llevó a cabo la degradación de atrazina en un reactor en estado líquido discontinuo por lotes completamente agitado en condiciones aeróbicas, a una temperatura de 20°C . El modelo propuesto describió el proceso de degradación adecuadamente. El mismo modelo fue

utilizado por Cheyng K. et. al. para describir la degradación de atrazina en minicolumnas de suelo irrigadas con agua contaminada con atrazina. El proceso fue modelado con éxito considerando el crecimiento de la biomasa debido a la presencia del herbicida [52].

Debasmita N. et. al. Aplicaron diferentes modelos, entre ellos el de Monod para describir la cinética de biodegradación de atrazina en reactores por lotes en condiciones aerobias utilizando un consorcio de microorganismos provenientes de las aguas residuales de la industria farmacéutica. El modelo de Monod describió adecuadamente la degradación de la atrazine pero el crecimiento de la biomasa no fue reportado [53].

3. Procedimiento experimental.

El procedimiento experimental se llevó a cabo en varias etapas. Primero se evaluó la toxicidad de la atrazina para *A. niger* cuando crece en un medio sólido, seguido de esto se indujo una adaptación del hongo a crecer en un suelo contaminado, posteriormente se evaluó el efecto de la concentración de residuos de nopal (cosustrato), la temperatura y la humedad del suelo durante la degradación de la atrazina. Por último, se aplicó un modelo matemático que simulara el proceso.

3.1. Resiembra y preservación de una cepa original.

Se cuenta con una cepa pura de *A. niger* en el Laboratorio de Análisis de Procesos de la UAM-A. Para la resiembra del microorganismo se utilizó la técnica de “resiembra tubo a tubo” [11]. Para ello, primero se preparó el medio de cultivo agregando a un matraz Erlenmeyer, 1000 mL de agua destilada que se llevó a calentamiento en una parrilla con agitación magnética. Se disolvieron todos los componentes descritos en la tabla 5, manteniendo una temperatura de 50 °C, posteriormente, el medio se enriqueció con 1 mL de solución de oligoelementos cuya composición se describe en la tabla 6.

Tabla 5. Composición del medio de cultivo para resiembra de *A. niger*.

Componente	Concentración (g/L)
KH_2PO_4	2.47
NH_4NO_3	3
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.38
NaCl	0.32
FeSO_4	0.124
CaCl_2	0.48
Glucosa	25
Agar papa dextrosa (PDA)	39

Tabla 6. Composición de la solución de oligoelementos para el medio de cultivo.

Componente	Concentración (g/L)
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.2
H_3BO_3	2.2
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.5
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.16
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.16

Una vez preparado el medio de cultivo se agregaron 10 mL del mismo en tubos de ensayo con tapón de rosca para resiembra de 20 mL, posteriormente se sometieron a un proceso de esterilización en un autoclave (marca Tomy tech, modelo: SX-500) a 121°C con calor húmedo durante 20 minutos para luego llevarlos a solidificación en una incubadora estéril a

25°C, colocándolos de forma inclinada con el objetivo de dejar una superficie suficiente para el crecimiento del microorganismo.

Para la resiembra. Se tomó el tubo que contenía la cepa pura del hongo y el que se preparó con el medio de cultivo sin inocular. Se utilizó un asa bacteriológica estéril. Cerca de la flama del mechero, se introdujo el asa fría en el tubo que contenía la cepa pura, se tomó suavemente una asada de las esporas y se depositó en el tubo que contenía el medio sin inocular, descargando suavemente el asa en el fondo del tubo y trazando un zigzag en toda la superficie procurando no romper el agar. Los tubos fueron cubiertos con aluminio y se llevaron a la incubadora manteniendo la temperatura a 28°C durante 24 a 48 horas [54]. En este lapso se observó el crecimiento y esporulación del hongo en el tubo.

3.2.Pruebas toxicológicas.

Para llevar a cabo las pruebas toxicológicas, primero se realizaron algunas pruebas preliminares con el fin de conocer los límites de contaminación del medio a los cuales el microorganismo puede crecer sin tener daño celular. Para ello, primero se preparó un medio de cultivo para resiembra (tabla 5). Se midió un volumen suficiente para cubrir la superficie de una caja Petri. Volúmenes iguales de este medio fueron contaminados con diferentes concentraciones de atrazina (20, 100, 500 y 1000 ppm) [2 - 10]. Las cajas Petri contaminadas con atrazina se sembraron mediante la técnica de punto. Esta técnica se llevó a cabo bajo las mismas condiciones estériles que la resiembra, pero en este caso, se tomó una muestra de esporas con el asa bacteriológica. Las placas Petri inoculadas se incubaron a 28°C por siete

días. El efecto toxico de la atrazina se evaluó cualitativamente al comparar el crecimiento de *A. niger* en presencia y ausencia de atrazina.

Después de las pruebas preliminares, se realizaron nuevas pruebas de toxicidad con esporas de las resiembras en las que el hongo tuvo esporulación escasa al crecer en los medios contaminados con 500 y 1000 ppm de atrazina. Esto se realizó con la finalidad de observar si después de una nueva siembra, esta cepa fue capaz de resistir ambientes con altas concentraciones de atrazina. Para ello se realizaron resiembras en caja Petri que con medios de cultivo contaminados con atrazina en 500 y 1000 ppm, además se realizó un experimento de control con un medio no contaminado. Las resiembras se realizaron con la técnica de punto en cinco puntos más o menos equidistantes. Cada uno de los experimentos se realizó por triplicado. El crecimiento del microorganismo se monitoreó a través de la medición del diámetro del halo de las colonias cada 24 horas durante siete días.

3.3.Adaptación.

Una vez que se comprobó, a partir de las pruebas toxicológicas, que el hongo es resistente al medio contaminado, se inició el proceso de adaptación de la cepa tomando una muestra del microorganismo que había tenido un buen crecimiento en las pruebas toxicológicas. Para ello se realizó la extracción del hongo del medio de cultivo con una solución estéril de cloruro de sodio (NaCl) al 0.1 % en peso. La solución obtenida se preservó en refrigeración a 4 °C.

3.3.1. Pruebas de crecimiento de *A. niger* en medios líquidos contaminados.

Las pruebas de crecimiento de *A. niger* en diferentes medios líquidos se llevaron a cabo con el objetivo de observar si éstos eran adecuados para la degradación de atrazina, además de estudiar si el microorganismo era capaz de degradar atrazina sin un cosustrato adicional.

Paralelamente, se realizaron experimentos con medios de cultivo líquidos suplementados con celulosa, residuos de nopal y mezcla de ambos residuos, con la finalidad de estudiar el efecto de los cosustratos sobre la degradación de atrazina.

Los experimentos se realizaron siguiendo el procedimiento de preparación, esterilización e inoculación descritos anteriormente. En la tabla 7 se describen las condiciones de cada uno de ellos.

Tabla 7. Pruebas de crecimiento de *A. niger* en medios contaminados.

Experimento	Sistema
M₁	Solución de atrazina 30 y 500 ppm
M₂	a) Solución de atrazina 500 ppm b) Solución de oligoelementos
M₃	a) Solución de atrazina 500 ppm b) Solución de oligoelementos c) 1 g de celulosa
M₄	a) Solución de atrazina 500 ppm b) 1 g de residuos de nopal
M₅	a) Solución de atrazina 500 ppm b) 0.5 g de residuos de nopal. c) 0.5 g de celulosa.

Durante tres días se observó cualitativamente el crecimiento del microorganismo en cada uno de los experimentos.

3.3.2. Pruebas de crecimiento de *A. niger* en suelo contaminado.

Se realizaron pruebas de crecimiento de *A. niger* en muestras de suelo contaminado con 500 ppm de atrazina para determinar si el suelo contenía fuentes de nutrientes que propiciarán el crecimiento del microorganismo dado que la atrazina por sí sola no es una fuente de carbono fácilmente asimilable para *A. niger*. Para ello se prepararon tres muestras de suelo contaminado con 500 ppm de atrazina. Luego, a una de las muestras (C_1) se le agregó únicamente solución de oligoelementos, a otra de ellas (C_2), se le agregó 1% de residuos de nopal para probar su uso como cosustrato y a la última (C_3) se le agregó glucosa y solución de oligoelementos. Las muestras de suelo fueron inoculadas con solución de esporas del microorganismo y llevadas a incubación a 28°C. Cada uno de los experimentos se encuentra descrito en el diagrama de bloques de la figura 3.

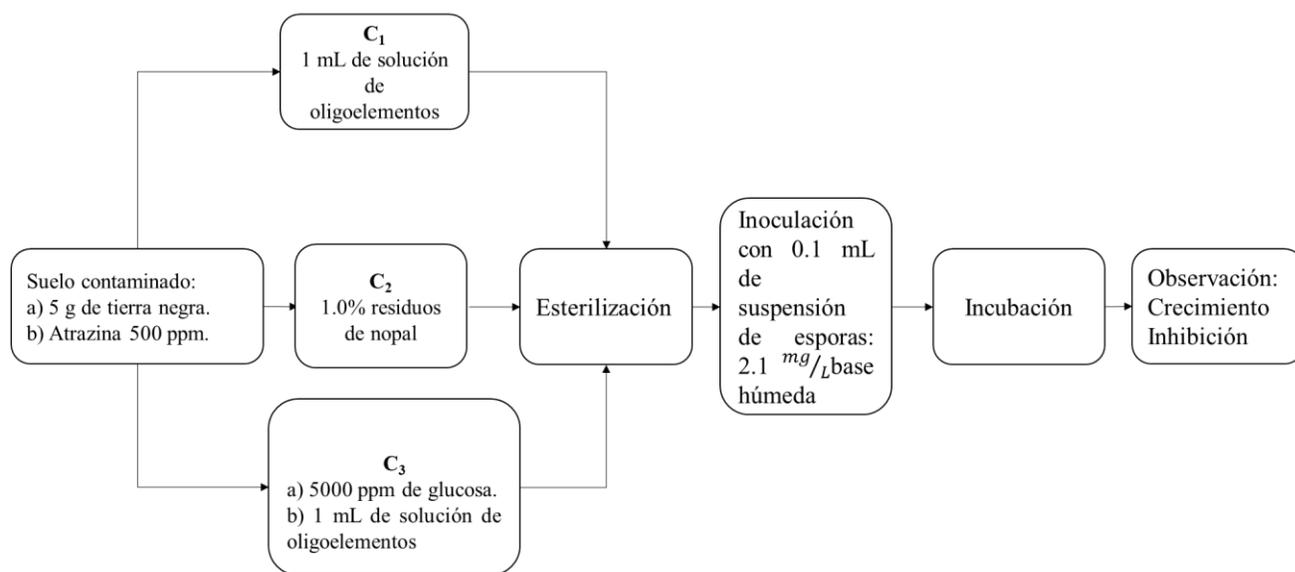


Figura 3. Diagrama de bloques de los experimentos de crecimiento de *A. niger* en suelos contaminados con atrazina.

De forma similar a las pruebas de crecimiento en medios contaminados, se observó cualitativamente durante tres días el crecimiento e inhibición del microorganismo en cada muestra de suelo.

3.4. Proceso de biodegradación de atrazina.

3.4.1. Diseño factorial 2^3 completamente al azar.

3.4.1.1. Diseño experimental.

Previo a la determinación de la cinética de degradación de atrazina, se trabajó con un diseño de experimentos factorial 2^3 completamente al azar, donde las variables a controlar fueron la temperatura, la concentración de cosustrato (residuos de nopal) y la humedad, resultando un total de 8 experimentos, cada uno con su réplica (16 experimentos en total). En la tabla 8 se muestran los tratamientos del diseño experimental.

Tabla 8. Combinaciones del diseño de experimentos 2^3 .

Experimento	T [°C]	% W _{residuos}	% Humedad
E1	28	5	70
E2	28	5	80
E3	28	10	70
E4	28	10	80
E5	40	5	70

E6	40	5	80
E7	40	10	70
E8	40	10	80

En la figura 4 se muestra el diagrama que ilustra las combinaciones de los experimentos descritos en la tabla para el análisis estadístico del diseño de experimentos.

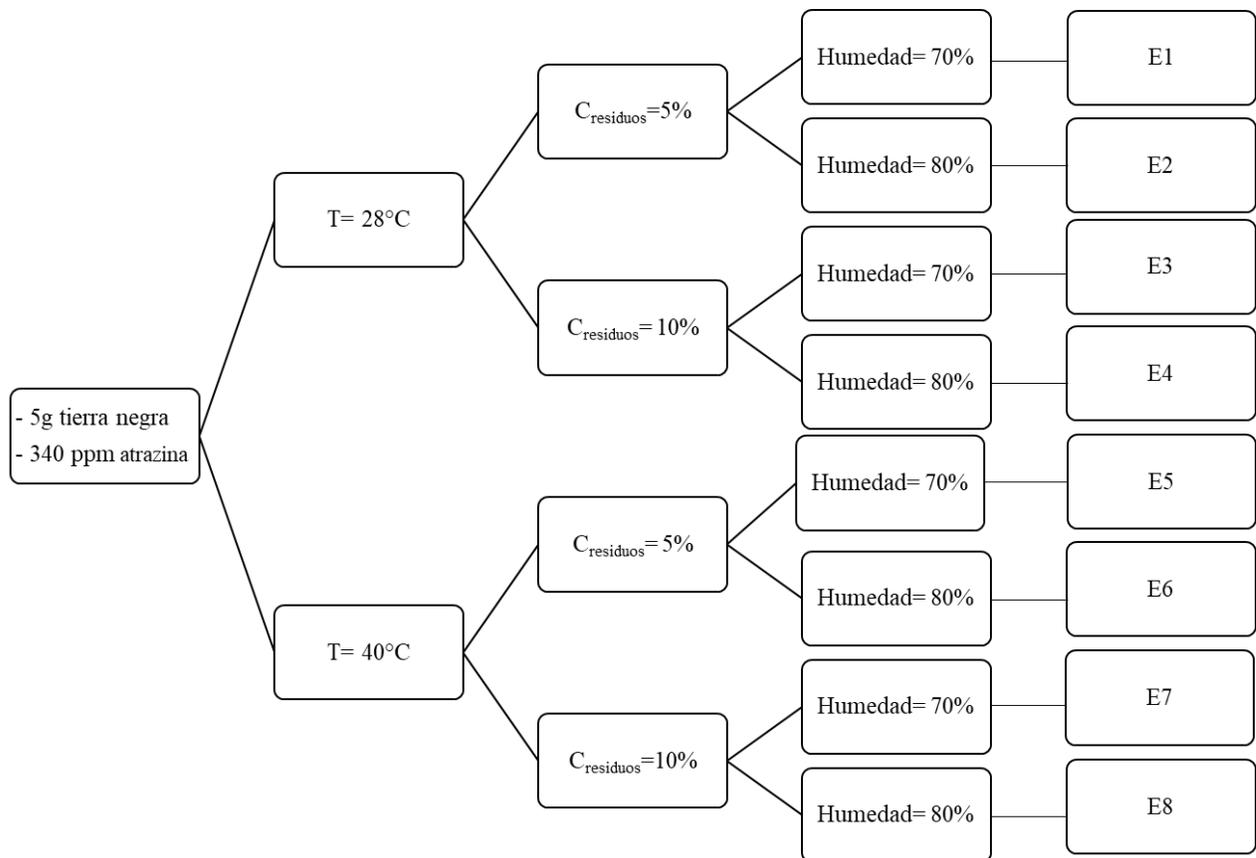


Figura 4. Diagrama de las combinaciones de parámetros del diseño estadístico de experimentos.

Para llevar a cabo los experimentos en esta etapa, se utilizaron cajas Petri que funcionaron como pequeños biorreactores. En cada biorreactor se colocó una muestra de suelo previamente tamizada con una malla del número 50, seca y llevada a peso constante. Se

agregó la concentración correspondiente de residuos de nopal en sus dos niveles, y se contaminaron con 340 ppm de atrazina. Este valor se determinó de acuerdo con la concentración del contaminante encontrada en algunos suelos de cultivo y con el límite de contaminación a la cual el microorganismo puede crecer sin sufrir daño celular. La masa total del medio sólido fue de 5 g. Los medios de cultivo se esterilizaron a 121 °C y 15 psi, durante 20 minutos. Posteriormente, se agregó a cada uno de los biorreactores, la cantidad de agua suficiente para obtener el 70% y 80% de humedad relativa en el medio (en este caso, 3.5 y 4 mL, respectivamente). Se inoculó cada biorreactor con la suspensión de las conidiosporas adaptadas a degradar atrazina obtenida de acuerdo con la descripción en la sección 4.3. Las muestras se llevaron a incubación a 28°C y 40°C respectivamente. La incubación de los experimentos tuvo una duración de siete días.

Para realizar el análisis y cuantificación de las muestras, fue necesario extraer la biomasa, los carbohidratos reductores y el amoníaco presentes en el sistema y tener cada una de estas especies disponibles en solución acuosa. Para ello se realizó, primero, la extracción de los carbohidratos reductores y el amoníaco de acuerdo con la NOM – 021 – SEMARNAT – 2000 que consiste en agregar a la muestra un volumen aproximadamente 10 veces mayor al volumen de ésta, en este caso se agregaron 46 y 46.6 mL de agua destilada respectivamente para lograr un volumen total de 50 mL de la fase acuosa y llevar a agitación constante durante 30 minutos [55]. La suspensión obtenida, se llevó a filtración para separar el sólido del sobrenadante, la solución resultante fue tomada como objeto de análisis. Posteriormente, para lograr la cuantificación de la biomasa, se realizó una hidrólisis de la muestra sólida seca, en un volumen de 20 mL de solución de ácido fosfórico 0.75 M, a 80°C con agitación magnética durante 30 minutos. Con este tratamiento se logró la ruptura de la membrana celular del

microorganismo para así poder determinar la concentración de proteína celular y de manera indirecta cuantificar la cantidad de biomasa presente usando el reactivo de Bradford [56]. Los carbohidratos reductores se cuantificaron empleando la técnica del reactivo DNS [57-58]. El amoniaco se cuantificó utilizando el método de Nessler [59]. Estos métodos analíticos se describen en la sección 4.5.

Una vez obtenidos los resultados experimentales se realizó el análisis estadístico (ANOVA) y se comprobaron las pruebas de hipótesis correspondientes.

3.4.1.2. Análisis de la varianza (ANOVA). Pruebas de Hipótesis.

Se analizó el efecto de la temperatura, la humedad y la cantidad de residuos de nopal en la degradación de atrazina en un suelo contaminado. Con el objetivo de probar que tan significativos son estos efectos, se realizaron las pruebas de hipótesis correspondientes a cada uno de los parámetros controlados, sus pares de interacciones y la interacción entre los tres factores. Esto se logra al cuantificar la significancia de cada factor. En este caso, se rechaza la hipótesis nula si el valor de la significancia es menor a $\alpha = 0.01$, es decir, con un nivel de certeza del 99%. Rechazar la hipótesis nula implica que al menos una de variable influye significativamente en el proceso.

Efecto de la temperatura del proceso.

H^T_0 : No existe efecto de la temperatura en la cantidad de atrazina degradada en el proceso.

H^T_i : El cambio de la temperatura del proceso provoca el cambio en la cantidad de atrazina degradada.

Efecto de la cantidad de residuos de nopal en el medio.

H^R_0 : La cantidad de residuos de nopal no influye en la cantidad de atrazina degradada en el proceso.

H^R_i : La cantidad de atrazina degradada será diferente si la cantidad de residuos de nopal cambia.

Efecto de la humedad en el medio.

H^H_0 : Si la cantidad de humedad en el medio cambia, la cantidad de atrazina degradada en el proceso será la misma.

H^H_i : Al modificar la humedad en el medio, la cantidad de atrazina degradada será diferente.

Efecto de la interacción entre la temperatura y la cantidad de residuos de nopal en el medio.

H^{TR}_0 : La interacción entre la temperatura y la cantidad de residuos de nopal en el medio no tiene influencia sobre la cantidad de atrazina degradada en el proceso.

H^{TR}_i : La interacción entre la temperatura y la cantidad de residuos de nopal en el medio provocará un cambio en la cantidad de atrazina degradada.

Efecto de la interacción entre la temperatura y la humedad en el medio.

H^{TH}_0 : El efecto de la interacción entre la temperatura y la humedad del sistema no es significativo para la cantidad de atrazina degradada en el proceso.

H^{TH}_i : La interacción entre la temperatura y la humedad del sistema tienen un efecto significativo en la cantidad de atrazina degradada en el proceso.

Efecto de la interacción entre la humedad y la cantidad de residuos de nopal en el medio.

H^{HR}_0 : La interacción entre la humedad y la cantidad de residuos de nopal en el medio, no modifica la cantidad de atrazina degradada.

H^{HR}_i : La interacción entre la humedad y la cantidad de residuos de nopal en el medio, provoca un cambio en la cantidad de atrazina degradada.

Efecto de la interacción entre la temperatura, humedad y cantidad de residuos de nopal en el medio.

H^{THR}_0 : La interacción entre la temperatura, humedad y cantidad de residuos de nopal en el medio no modifica la cantidad de atrazina degradada en el proceso.

H^{THR}_i : La interacción entre la temperatura, humedad y cantidad de residuos de nopal en el medio provoca un cambio en la cantidad de atrazina degradada.

3.4.1.3. Modelo lineal general.

A través del análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados experimentales se obtienen los valores de las medias cuadráticas y el valor del estadístico F para cada experimento, cuya variable dependiente es el porcentaje de degradación de atrazina.

Modelo lineal general:

$$Y_{ijkl} = \mu + \tau_j + \beta_k + \gamma_l + (\tau\beta)_{jk} + (\beta\gamma)_{kl} + (\tau\gamma)_{jl} + (\tau\beta\gamma)_{jkl} + \epsilon_{ijkl}$$

Donde Y_{ijkl} es el porcentaje de atrazina degradada observado a los siete días del experimento en la i -ésima repetición a la cual se le aplicó el j -ésimo nivel de temperatura, el k -ésimo nivel de residuos de nopal y el l -ésimo nivel de humedad. μ es la media general; τ_j es el efecto del j -ésimo nivel de temperatura; β_k es el k -ésimo nivel de residuos de nopal; γ_l es el l -ésimo nivel de humedad; $(\tau\beta)_{jk}$ es el efecto de interacción entre el j -ésimo nivel de temperatura y el k -ésimo nivel de residuos de nopal; $(\beta\gamma)_{kl}$ es el efecto de interacción entre el k -ésimo nivel de residuos de nopal y el l -ésimo nivel de humedad; $(\tau\gamma)_{jl}$ es el efecto de interacción entre el j -ésimo nivel de temperatura y el l -ésimo nivel de humedad; $(\tau\beta\gamma)_{jkl}$ es el efecto de interacción entre el j -ésimo nivel de temperatura, el k -ésimo nivel de residuos de nopal y el l -ésimo nivel de humedad; ϵ_{ijkl} es el error asociado a la observación Y_{ijkl} .

El análisis estadístico del diseño de experimentos se realizó utilizando el software SPSS Statistics.

3.4.2. Cinética de degradación de atrazina.

A partir del diseño factorial 2^3 completamente al azar se encontraron las condiciones de operación ideales para llevar a cabo la degradación de atrazina con *A. niger* en suelo. Las cinéticas de degradación se llevaron a cabo a una temperatura de incubación de 28°C, 80% de humedad y con 10% de residuos de nopal como cosustrato.

Las cinéticas de degradación se realizaron en cajas Petri, simulando pequeños biorreactores; en total se utilizaron siete cajas Petri. En cada mini-reactor se adicionó 4.5 g de tierra negra y 0.5 g de residuos de nopal, ambos secos y tamizados con una malla del número 50. Posteriormente, se agregó 1.7 mg de atrazina para alcanzar una concentración final de 340 ppm. Las cajas Petri se esterilizaron con calor húmedo. Una vez pasado el proceso de esterilización, en ambiente también estéril, se adicionaron 4 mL de agua destilada estéril a cada una de las cajas Petri y se inocularon con 0.1 mL de suspensión con concentración de 0.16 g/L en base húmeda, de esporas de la cepa de *A niger* resistente al suelo contaminado con el herbicida. Posteriormente, las cajas fueron selladas con Parafilm y llevadas a incubación a 28°C. Cada una de las cajas representó una muestra del experimento a diferentes tiempos, es decir, una muestra por día durante siete días. El experimento se realizó por duplicado. Por último, se calculó la velocidad de degradación del contaminante en el suelo a través de los balances de materia adecuados.

Una vez, obtenidos los resultados experimentales, se utilizó el modelo logístico basado en el modelo de Monod para verificar si éste describe el proceso de degradación de la atrazina en el medio sólido utilizando las espigas de nopal como cosustrato.

3.5. Métodos de Analíticos.

3.5.1. Cuantificación de biomasa.

La cuantificación de la biomasa se realizó a través de un método indirecto que consiste en la medición de la cantidad de proteína celular de *A. niger*, cuya extracción se realizó por hidrólisis ácida colocando la muestra de suelo con solución de ácido fosfórico 0.75 M a 80°C en agitación durante 30 minutos. Las proteínas obtenidas se hicieron reaccionar con el reactivo de Bradford obteniendo una solución colorida a la que se le midió su cambio de absorbancia. Esta propiedad se relacionó directamente con la concentración del analito por medio de la ley de Beer-Lambert, a través de la curva de calibración correspondiente [56].

3.5.1.1. Curva de calibración para la cuantificación de biomasa.

Para la obtención de la curva de calibración de proteína celular, primero se preparó una solución estándar de caseína marca Sigma – Aldrich con pureza del 90%, a una concentración de 100 ppm, utilizando como disolvente una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 M. Posteriormente, se hicieron diluciones con agua ultra pura tipo 1, para obtener soluciones con concentraciones de 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 y 10 mg/L. Paralelamente, se preparó un blanco, sin solución de caseína. Luego, se dispensaron 2.4 mL de cada solución en tubos de ensayo, se agregaron 0.6 mL del reactivo de Bradford, se agitaron los tubos vigorosamente y se dejaron reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente [56]. El

cambio de absorbancia en las muestras se midió en un espectrofotómetro de UV/Vis marca PerkinElmer Lambda 35 a una longitud de onda de 595 nm.

3.5.2. Cuantificación de carbohidratos reductores.

Para la cuantificación de los carbohidratos reductores presentes en el sistema se utilizó el método del ácido dinitrosalicílico (DNS), el cual se basa en la reducción del ácido 3, 5 – dinitrosalicílico de color amarillo por reacción con la glucosa, al ácido 3 – amino – 5 – nitrosalicílico cuya presencia puede detectarse a través de la medición de absorbancia en la del espectro visible a la longitud de onda de 540 nm. La reacción que ocurre entre el DNS y los azúcares reductores se describe en el mecanismo de reacción de la figura 5 [53-54].

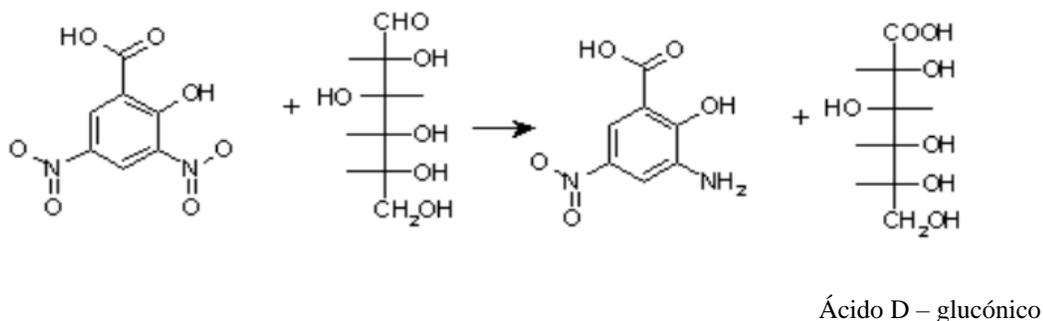


Figura 5. Reacción de reducción del ácido 3, 5 dinitrosalicílico a ácido 3 – amino – 5 – nitrosalicílico.

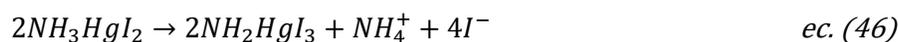
3.5.2.1. Curva de calibración para la cuantificación de carbohidratos reductores.

Para la obtención de la curva de calibración de carbohidratos reductores, primero se preparó el reactivo DNS de la siguiente manera. Se prepararon 100 mL de una solución de hidróxido de sodio (NaOH) con concentración de 1% w/v utilizando agua ultra pura tipo 1 proveniente de un equipo de la marca Merck Direct – Q 3 UV. Una vez preparada la solución, se dispensaron 80 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 100 mL, se adicionó 1 g de ácido 2,3 – dinitrosalicílico, se agitó hasta disolver. Después se adicionaron y disolvieron 20 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado. Luego se agregó y disolvió 0.1 g de sulfito de sodio y 0.2 g de fenol. Posteriormente se aforó a 100 mL con la solución de hidróxido de sodio restante. La solución obtenida se filtró y se guardó en un frasco ámbar en la oscuridad y a temperatura ambiente [58].

Para la curva patrón de carbohidratos reductores, se utilizó un estándar de D – (+) – glucosa de la marca Sigma – Aldrich con 99.5% de pureza. Se preparó una solución de 1000 ppm del estándar utilizando agua ultra pura tipo 1. Se realizaron diluciones para obtener soluciones con concentraciones de 600, 500, 400, 300, 200, 150, 50 y 0 ppm. Luego, se agregó una muestra de 0.5 mL de cada una de las soluciones en tubos de ensayo con rosca y posteriormente se agregó 0.5 mL del reactivo DNS a cada uno. Los tubos se agitaron para homogeneizar la mezcla en un baño de agua en ebullición por 5 minutos. Una vez transcurrido el tiempo indicado, las muestras se llevaron a un baño de hielo para detener la reacción y se aforó a 5 mL. Las muestras resultantes se analizaron midiendo la absorbancia de cada solución a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro de UV/Vis marca PerkinElmer Lambda 35.

3.5.3. Cuantificación de amoníaco.

La cuantificación del amoníaco presente en el sistema se realizó a través del método de Nessler. El reactivo de Nessler, en presencia de amoníaco, se descompone formando yoduro de dimercuriamonio obteniendo un tinte color amarillo en la muestra, éste, permite la determinación colorimétrica del ión amonio. La reacción de Nesslerización se describe en las ecuaciones 51 y 52 [59].



3.5.3.1. Curva de calibración para la cuantificación de amoníaco.

Para la construcción de la curva de calibración de amoníaco, primero se utilizó un estándar de solución de amoníaco con 30 % de pureza de la marca Sigma – Aldrich. Se preparó una solución de 10 ppm del estándar utilizando agua ultra pura tipo 1. Se realizaron diluciones para obtener soluciones con concentraciones de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 y 0 ppm. Luego, se adicionó 5 mL de cada una de las soluciones en tubos de ensayo con rosca, posteriormente se agregaron dos gotas del reactivo de Nessler y dos gotas del reactivo estabilizador de la reacción, ambos de la marca HANNAH para análisis de aguas. Los tubos se agitaron para homogeneizar la mezcla. Después de un minuto, las muestras resultantes se analizaron midiendo la absorbancia de cada solución a una longitud de onda de 420 nm en un espectrofotómetro de UV/Vis marca PerkinElmer Lambda 35.

3.5.4. Cuantificación de Atrazina.

La cuantificación de la atrazina se llevó a cabo de forma indirecta dada la complejidad del sistema. Para ello se realizaron experimentos con el objetivo de determinar la cantidad de biomasa y amoniaco que se produce durante el proceso debida al consumo de la atrazina dado que son los productos de mayor interés para el proceso.

Para determinar la cantidad de biomasa producida debido al consumo de la atrazina se realizaron experimentos de referencia. Primero se determinó la contribución de la atrazina al crecimiento de la biomasa y el aumento o disminución de nitrógeno amoniacal en las muestras. Para esto, se preparó un sistema similar al de los experimentos de degradación de la atrazina. Se pesaron muestras de cinco gramos de tierra negra y se contaminaron con 340 ppm de atrazina, luego se agregaron 3.5 y 4 mL de agua destilada respectivamente, para alcanzar la humedad deseada. Posteriormente, se inocularon con suspensión de esporas adaptadas a degradar la atrazina y se midió la concentración de biomasa, carbohidratos reductores y amoniaco en el sistema desde el inicio hasta el día siete, de forma similar a los experimentos de la cinética de degradación del contaminante.

Para calcular la contribución de los residuos de nopal al crecimiento de la biomasa y a la cantidad de nitrógeno amoniacal en el sistema, se pesaron muestras similares al experimento anterior pero ahora sin la presencia del contaminante agregando los dos niveles de concentración de residuos de nopal descritos en el diseño de experimentos. También se agregó agua en los dos niveles de humedad. Las muestras se llevaron a esterilización y se

inocularon con la misma suspensión de esporas. Se midió la cantidad de biomasa, carbohidratos reductores y amoniaco en el sistema durante siete días.

Además, se realizó un experimento testigo, a los dos niveles de humedad, cantidad de residuos de nopal y temperaturas, en muestras de tierra negra contaminada con atrazina. Estas muestras no fueron inoculadas.

Las pruebas anteriores fueron comparadas con los experimentos del análisis estadístico y de la cinética de degradación para identificar las fuentes de la biomasa y amoniaco.

Con los resultados obtenidos fue posible realizar el balance de materia en el sistema y determinar la cantidad de atrazina degradada por el microorganismo. En la figura 6 se muestran los experimentos de control utilizados para la cuantificación de la atrazina y el balance de materia en el proceso.

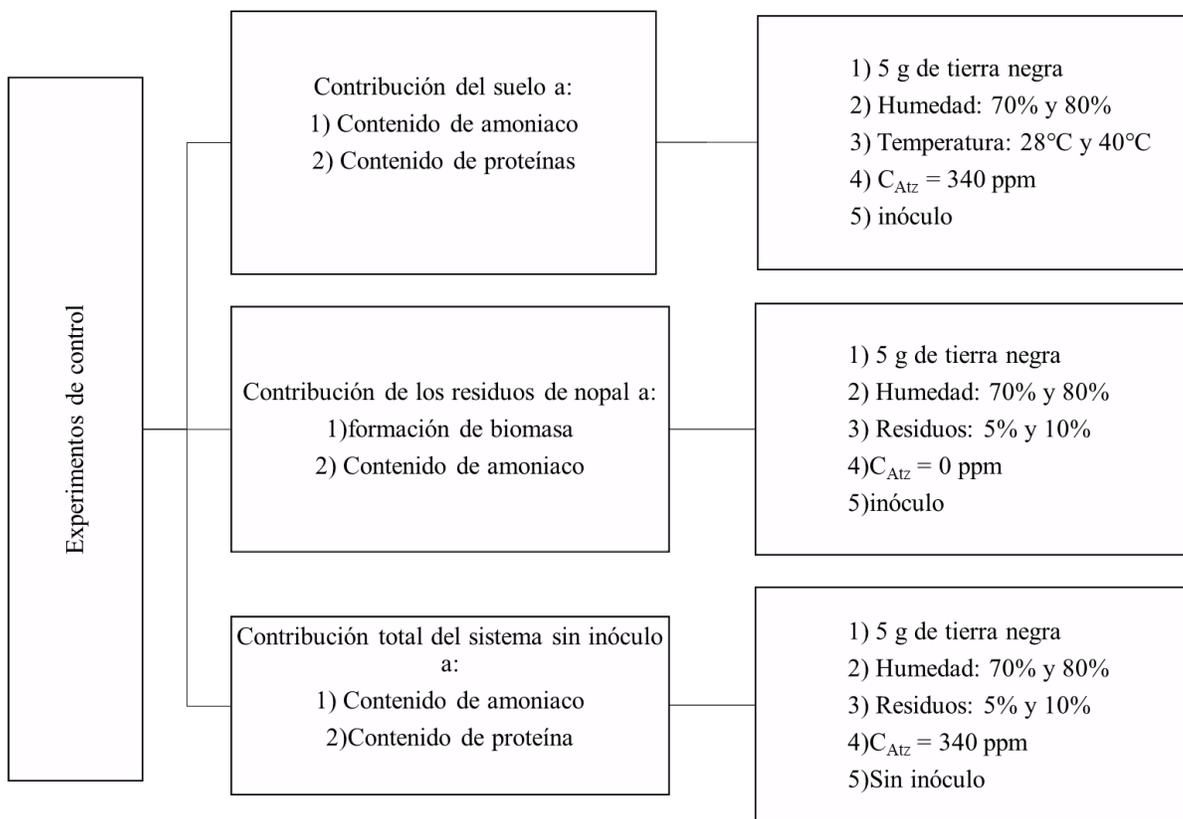
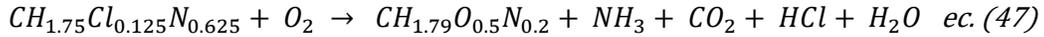


Figura 6. Experimentos de control del proceso de degradación de atrazina para el balance de materia.

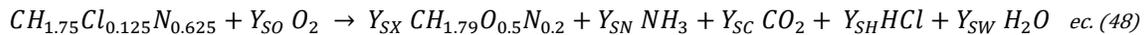
3.5.4.1. Cálculo de los coeficientes de rendimiento de la biorreacción por mol de carbono.

En la ecuación 54 se muestra la reacción balanceada en base a un átomo de carbono por mol para la biodegradación de atrazina con *A. niger* considerando que los productos de la reacción son la biomasa, amoniaco, bióxido de carbono y agua [60]. Además, se propone que el cloro que se encuentra unido al anillo aromático reacciona en el medio para producir ácido clorhídrico.



Donde $CH_{1.75}Cl_{0.125}N_{0.625}$ es la fórmula condensada de la atrazina expresada en átomo de carbono por mol y $CH_{1.79}O_{0.5}N_{0.2}$ es la fórmula general de los hongos filamentosos en átomo de carbono por mol [60].

Para el cálculo de la cantidad de atrazina presente en el sistema, primero, deben calcularse los coeficientes de rendimiento de cada una de las especies participantes en la biorreacción. En la ecuación 48, se muestran los coeficientes estequiométricos de la reacción con base en los coeficientes de rendimiento.



Donde Y_{SO} es el coeficiente de rendimiento de oxígeno por mol de sustrato, Y_{SX} es el coeficiente de rendimiento de biomasa por mol de sustrato, Y_{SN} es el coeficiente de rendimiento de amoníaco por mol de sustrato, Y_{SC} es el coeficiente de rendimiento de bióxido de carbono por mol de sustrato, Y_{SH} es el coeficiente de rendimiento de ácido clorhídrico por mol de sustrato y Y_{SW} es el coeficiente de rendimiento de agua producida por mol de sustrato. Cada uno de ellos expresado en átomo de carbono por mol.

A partir de la ecuación estequiométrica, fue posible determinar el valor de los coeficientes de rendimiento. Si se realiza un balance de materia por cada elemento químico, se obtienen las siguientes ecuaciones:

El balance para el carbono considerando que no existe formación de ningún producto además de la biomasa y que, por tanto, el carbono que se consume se transforma en biomasa y bióxido de carbono, puede expresarse con la ecuación 49.

$$C: 1 = Y_{SX} + Y_{SC} \quad ec. (49)$$

Para el hidrógeno, el balance de materia se expresa con la ecuación 50.

$$H: 1.75 = 1.79Y_{SX} + 3Y_{SN} + Y_{SH} + 2Y_{SW} \quad ec. (50)$$

El balance para el cloro se describe con la ecuación 51.

$$Cl: 0.125 = Y_{SH} \quad ec. (51)$$

Para el nitrógeno, el balance de materia se expresa con la ecuación 52.

$$N: 0.625 = 0.2Y_{SX} + Y_{SN} \quad ec. (52)$$

El balance de oxígeno se representa con la ecuación 53.

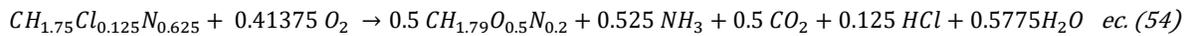
$$O: 2Y_{SO} = 0.5Y_{SX} + 2Y_{SC} + Y_{SW} \quad ec. (53)$$

Dado que la reacción tiene siete coeficientes de rendimiento y los balances elementales permiten conocer únicamente cinco, además, los resultados experimentales permiten conocer la cantidad de biomasa y amoníaco producidas, el sistema se encuentra sobre especificado. Para calcular el valor de los coeficientes se realizó un análisis del sistema. Por un lado, el único proceso involucrado en el consumo de cloro es la formación del ácido clorhídrico. Así, resolviendo el sistema de ecuaciones a través de un proceso iterativo que se realizó hasta encontrar los valores consistentes con un mol de atrazina, se pudieron conocer los coeficientes de rendimiento de cada especie, cuyo valor se muestra en la tabla 9.

Tabla 9. Valores de los coeficientes de rendimiento de la ecuación de biodegradación de atrazina calculados por mol de carbono.

Coeficiente de rendimiento	Valor calculado
Y_{SO}	0.41375
Y_{SX}	0.5
Y_{SN}	0.525
Y_{SC}	0.5
Y_{SH}	0.125
Y_{SW}	0.5775

A partir de los coeficientes calculados, la biorreacción por mol de carbono puede expresarse con la ecuación 54.



Una vez obtenida la ecuación estequiométrica, fue posible determinar la cantidad de atrazina consumida a través de un balance por componente.

3.5.4.2. Balance de atrazina.

El balance de la atrazina puede expresarse con la ecuación 55.

$$Atz_R = Atz_i - Atz_{cons.} \quad ec. (55)$$

Donde Atz_R , es la cantidad de atrazina residual del sistema a cada tiempo de muestreo; Atz_i , es la cantidad de atrazina al inicio del experimento y $Atz_{cons.}$, es la cantidad de atrazina consumida a cada tiempo de muestreo.

La atrazina inicial es conocida, ya que se midió la cantidad agregada al sistema. La atrazina consumida se puede determinar a través de la reacción estequiométrica ya que se conoce la cantidad de biomasa y amoníaco formados debido al consumo de ésta. Este balance se representa con la ecuación 56.

$$n_{Atz, cons.} = 0.5 n_{biom. form.} + 0.525 n_{NH_3, form.} \quad ec. (56)$$

Donde $n_{Atz, cons.}$, son los moles de atrazina consumida; $n_{biom. form.}$, son los moles de biomasa formada debido a la atrazina y $n_{NH_3, form.}$, son los moles de amoníaco formado.

La masa de atrazina consumida se expresa con la ecuación 57.

$$m_{Atz, cons.} = (n_{Atz, cons.})(PM_{Atz}) \quad ec. (57)$$

Donde $m_{Atz, cons.}$, es la masa de atrazina consumida y PM_{Atz} , es el peso molecular de la atrazina.

3.5.4.3. Balance de biomasa.

En el caso de la biomasa, fue necesario determinar primero, la cantidad de biomasa al inicio de experimento. Dado que esta se cuantifica a través de la proteína celular, la biomasa inicial se puede calcular con la ecuación 58, es decir, es igual a la proteína total del sistema menos la proteína del sistema sin inóculo.

$$biom_i = Proteína_{total} - Proteína_{s/inóculo} \quad ec. (58)$$

Donde $biom_i$, es la cantidad de biomasa inicial; $Proteína_{total}$ es la cantidad de proteína total en la muestra y $Proteína_{s/inóculo}$, es la cantidad de proteína en el suelo sin inóculo.

La cantidad de biomasa en tiempos posteriores al inicio es igual a la biomasa producida debido a los residuos de nopal más la producida por el consumo de atrazina. La ecuación 59 describe este balance.

$$biom_f = biom_{res.} + biom_{Atz} \quad ec. (59)$$

Donde $biom_f$, es la cantidad de biomasa total en cualquier tiempo posterior al inicio; $biom_{res.}$, es la cantidad de biomasa producida solo por los residuos y $biom_{Atz}$, es la cantidad de biomasa debido a la presencia de la atrazina en el sistema. Del balance anterior, es posible conocer la cantidad de biomasa producida por el consumo de atrazina utilizando la ecuación 60.

$$biomasa_{Atz.} = biomasa_{final} - biomasa_{residuos} \quad ec. (60)$$

La cantidad de proteína debida al microorganismo se puede determinar a través de las mediciones de absorbancia de las soluciones inoculadas menos la absorbancia de los experimentos testigo no inoculados. Esto puede expresarse con la ecuación 61.

$$biom_f = proteina_{final} - proteina_{ref}. \quad ec. (61)$$

3.5.4.4. Balance de amoniacó.

La cantidad de amoniacó en el sistema al inicio del experimento se debe sólo a la cantidad presente en el suelo más la proveniente de los residuos de nopal. Esto se sabe de experimentos realizados agregando el reactivo de Nessler a una solución con 500 ppm de atrazina cuyos resultados permitieron saber que la solución obtenida no cambia de color, por lo tanto, el método de cuantificación de amoniacó no es sensible al herbicida. Así se obtiene la ecuación 62.

$$NH_{3i} = NH_{3suelo} + NH_{3res} \quad ec. (62)$$

Donde NH_{3i} , es la cantidad de amoniacó inicial; NH_{3suelo} la cantidad de amoniacó presente en el suelo y NH_{3res} , es la cantidad de amoniacó presente en los residuos de nopal. Dado que el amoniacó es consumido por la actividad metabólica del microorganismo, pero además es formado como producto de la degradación de la atrazina, su cuantificación en el sistema al final del experimento se obtiene a través del balance que expresa la ecuación 63.

$$NH_{3f} = NH_{3i} - NH_{3cons} + NH_{3form} \quad ec. (63)$$

Donde NH_{3f} , es la cantidad de amoniacó total presente en cada tiempo de muestreo; NH_{3cons} , es la cantidad de amoniacó consumido por el microorganismo en cada

tiempo y $NH_{3_{form}}$, es la cantidad de amoniaco formado en cada tiempo. De observaciones experimentales se sabe que el amoniaco proveniente del suelo no es consumido por el microorganismo, entonces se puede determinar cuánto amoniaco proveniente de los residuos del nopal son consumidos, a través del experimento donde no existe atrazina en el sistema. Este balance se describe con la ecuación 64.

$$NH_{3_{cons}} = NH_{3_{res,i}} - NH_{3_{res,f}} \quad ec. (64)$$

Donde $NH_{3_{res,i}}$, es el amoniaco inicial presente en las muestras sin atrazina y $NH_{3_{res,f}}$ es el amoniaco presente en las muestras sin atrazina en cada tiempo de muestreo. Así, la cantidad de amoniaco producida en el proceso puede ser cuantificada.

4. Resultados y discusión.

4.1. Pruebas de toxicidad.

4.1.1. Pruebas preliminares de toxicidad.

En la figura 7 se muestra cada uno de los experimentos 5 horas después de la inoculación, donde R_1 , R_2 y R_3 son las réplicas de cada uno de ellos. En este tiempo no se observó crecimiento de micelio, esporulación o contaminación del medio.

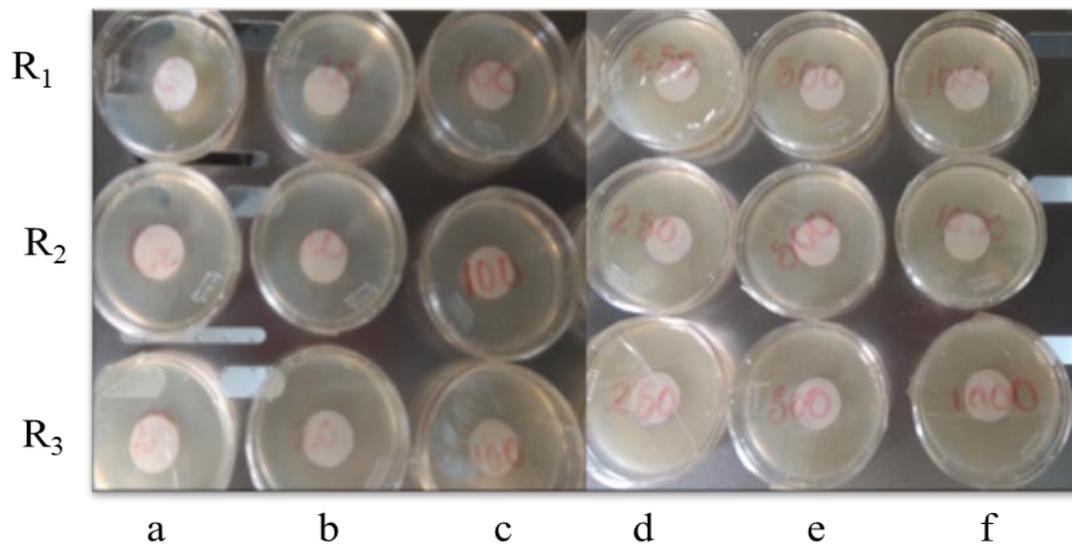


Figura 7. Resiembra de *A. niger* en el medio de cultivo contaminado con atrazina ($t=5$ h). (a) Control 0 ppm, (b) 20 ppm, (c) 100 ppm, (d) 250 ppm, (e) 500 ppm, (f) 1000 ppm.

En la figura 8 se muestra cada uno de los experimentos con sus réplicas 48 horas después de la inoculación, se puede observar que los experimentos a, b, c y d, presentan formación de micelio y esporulación similares. La atrazina no mostró toxicidad en estos niveles. Los experimentos e y f, muestran crecimiento de hifas, pero con esporulación escasa, sin embargo, el hongo es capaz de crecer en medios contaminados con altas concentraciones de atrazina.

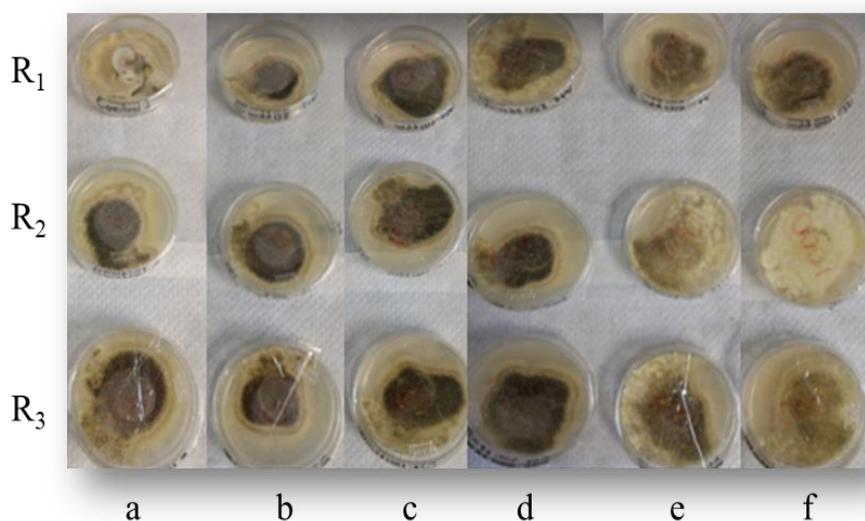


Figura 8. Resiembra de *Aspergillus niger* en el medio de cultivo contaminado ($t=48$ h). (a) Control, (b) 20 ppm, (c) 100 ppm, (d) 250 ppm, (e) 500 ppm, (f) 1000 ppm.

4.1.2. Pruebas de toxicidad.

En la figura 9 se muestra la gráfica de los promedios y desviación estándar del crecimiento del diámetro del halo de las colonias de *A. niger* inoculadas en el experimento de control, es decir en un medio sin contaminación y los medios de cultivo contaminados con 500 ppm y 1000 ppm de atrazina. En esta gráfica se puede observar que el hongo presenta una etapa de

crecimiento lenta durante alrededor de las primeras 24 horas después de la inoculación. Esta es similar en los tres experimentos, lo cual indica que, en los medios contaminados y sin contaminar, el microorganismo atraviesa por una etapa de adaptación al ambiente en el que crece. Posterior a ello, se presenta la etapa de crecimiento acelerado hasta los cuatro días aproximadamente. La duración de esta etapa coincide con la reportada en trabajos similares [60]. En ella se puede observar que, en los medios contaminados, el crecimiento es menor. Esto puede deberse a que la atrazina provoca cierta inhibición en el metabolismo primario del hongo por lo que el crecimiento de las células se ve disminuido. Este comportamiento puede afectar la velocidad máxima de crecimiento de la biomasa al modelar el fenómeno. Finalmente, se presenta la etapa de desaceleración entre los 4 y 5 días del experimento. Al final de esta etapa se observa una recuperación del crecimiento del hongo en los experimentos donde el medio está contaminado, alcanzando valores del diámetro del halo cercanos al experimento de control para posteriormente llegar a la fase estacionaria entre los 5 y 6 días, tiempo en que terminó la observación del experimento.

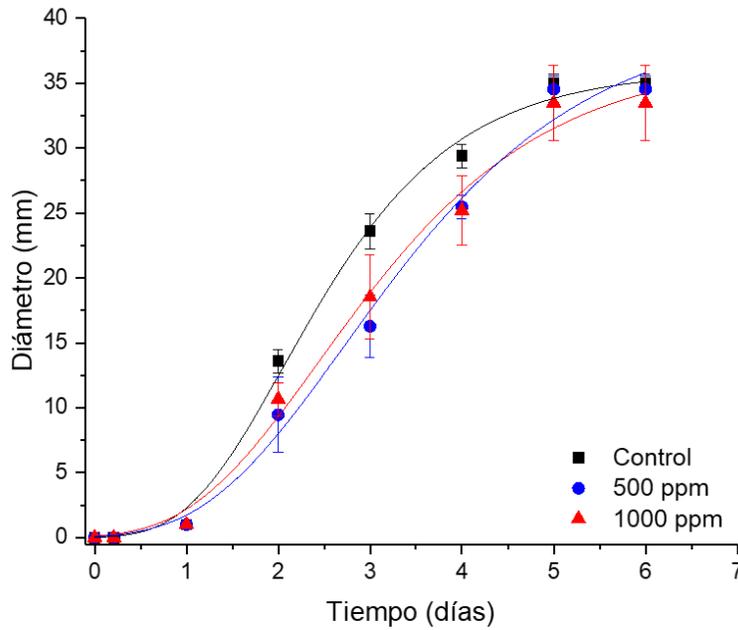


Figura 9. Gráfica de promedio y desviación estándar de crecimiento del diámetro del halo de *A. niger* en un medio de cultivo (PDA). Control (0 ppm de atrazina), (500ppm de atrazina) y (1000 ppm de atrazina).

Se aplicó el modelo de Gompertz a los datos experimentales obtenidos para determinar el crecimiento máximo de la biomasa, la velocidad máxima de crecimiento, así como la duración de la fase de adaptación. Este modelo puede representarse por la ecuación 65.

$$\frac{dX(t)}{dt} = KX(t) \ln\left(\frac{A}{X(t)}\right) \quad \text{ec. 65}$$

La expresión matemática para obtener tasa de crecimiento específica se muestra en la ecuación 66.

$$\mu_{\text{máx}} = \frac{BC}{e} \quad \text{ec. 66}$$

A través de la ecuación 67 es posible obtener la duración de la fase de latencia λ .

$$\lambda = \frac{M - 1}{B}$$

Donde M, B y C corresponden a recuentos microbianos cuando el tiempo crece indefinidamente [61]. Los valores obtenidos se presentan en la tabla 10.

Tabla 10. Valores de los parámetros del modelo de Gompertz para crecimiento de *A. niger* en un medio de cultivo (PDA).

Concentración de atrazina	Crecimiento máximo $X_{m\acute{a}x}$ (mm)	Velocidad máxima de crecimiento $\mu_{m\acute{a}x}$ (días ⁻¹)	Duración de la fase lag λ (días)	Coefficiente de regresión no lineal R^2
0 ppm (control)	35.9628±1.1578	12.5836±1.1769	1.0099±0.1296	0.9963
500 ppm	40.0887±3.3652	9.7986±1.1275	1.2119±0.2015	0.9923
1000 ppm	37.0317±2.4182	9.7503±1.0875	1.0508±0.1879	0.9932

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede afirmar que la fase de adaptación del microorganismo no se ve afectada por el herbicida, siendo de alrededor de 1 día en cada caso. Trabajos similares realizados en distintos medios de cultivo (PDA enriquecido con glucosa y metabolitos como el ácido cítrico y ácido oxálico como segunda fuente de carbono) reportan tiempos de la fase de adaptación entre 20 y 30 horas [60]. Por otro lado, la inhibición debida a la contaminación del medio con atrazina se encuentra en la fase de crecimiento exponencial. Esto afecta a la velocidad máxima de crecimiento y, por lo tanto, a la producción máxima de biomasa. Sin embargo, el hongo supera la inhibición y puede crecer adecuadamente en medios altamente contaminados. Estos resultados resultan relevantes ya que los niveles más altos de contaminación de atrazina en suelos agrícolas se encuentran alrededor de las 100 ppm [8]. Las tablas e imágenes del crecimiento del diámetro del halo en estos experimentos se pueden consultar en el apéndice B.

4.1.3. Pruebas de crecimiento de *A. niger* en medios líquidos contaminados.

En la figura 20 se observa el crecimiento de *A.niger* en los diferentes medios contaminados con atrazina. En los experimentos M_1 (donde el medio consistía en una solución de 30 ppm de atrazina en agua destilada), M_2 (con solución de 500 ppm de atrazina en agua destilada adicionada con oligoelementos) y M_3 (donde se agregó 1 g de celulosa a la solución de 500 ppm de atrazina enriquecida con oligoelementos), se observó que el microorganismo no crece, lo cual es de esperarse debido a la carencia de macronutrientes en el medio. Sin embargo, en los experimentos M_4 (al que se agregó 1 g de residuos de nopal) y M_5 (al que se adicionaron 0.5 g de celulosa y 0.5 g de residuos de nopal), se aprecia el crecimiento de micelio nutritivo y esporulación del hongo gracias debido a la presencia de los residuos de nopal, lo cual indica que dichos residuos representan una buena fuente de nutrientes para el microorganismo. Resulta relevante que el hongo crezca en un medio líquido con la presencia de los residuos de nopal, esto puede deberse a que el mucílago que esta planta produce tiene un alto contenido de lignina, pectina, hemicelulosa y celulosa, sustancias que pueden promover la producción de las enzimas capaces de degradar la atrazina [27]. En la tabla 11 se presentan las observaciones realizadas en cada uno de los experimentos.

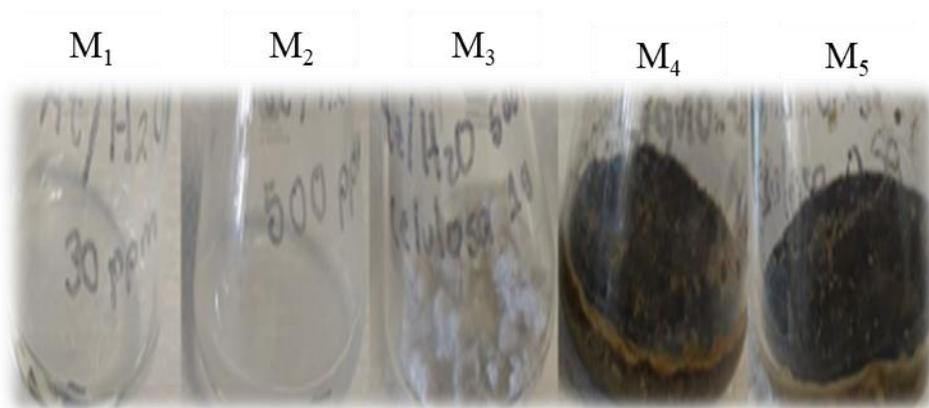


Figura 10. Crecimiento de *A. niger* en medios contaminados ($t= 7$ días).

Tabla 11. Observaciones de las pruebas de crecimiento de *Aspergillus niger* en medios contaminados con atrazina.

tiempo (días)	M ₁		M ₂		M ₃		M ₄		M ₅	
	30 ppm	500 ppm								
0	No obs.	No obs.								
1	No obs.	No obs.	No obs.	No obs.	No obs.	No obs.	Micelio	Micelio	Micelio	Micelio
2	No obs.	No obs.	No obs.	No obs.	No obs.	No obs.	Esporas	Esporas	Esporas	Esporas
3	No obs.	No obs.	No obs.	No obs.	No obs.	No obs.	Esporas	Esporas	Esporas	Esporas

Los resultados de estos experimentos fueron positivos ya que, los medios enriquecidos con los residuos de nopal, fueron los únicos donde se obtuvo crecimiento y esporulación de *A. niger*, lo cual nos lleva a considerar que estos pueden actuar como un buen cosustrato ya que se sabe que el potencial de este microorganismo para la degradación de la atrazina, está

asociado a las pectinasas, celulasas y hemicelulasas, cuya producción es promovida por las altas concentraciones de pectina, lignina y celulosa del nopal.

Como producto de las observaciones en los experimentos de adaptación de *A. niger* a crecer en medios contaminados con atrazina, resulta de vital importancia la utilización de los residuos de nopal como cosustrato para promover el crecimiento del microorganismo y por consecuencia la degradación del contaminante.

4.1.4. Pruebas de crecimiento de *Aspergillus niger* en suelo contaminado.

En la tabla 12 se muestran las observaciones realizadas en las pruebas de crecimiento del microorganismo utilizando tierra negra como soporte. En el caso del experimento C_1 (en el cual el suelo fue enriquecido únicamente con solución de oligoelementos), no se observó crecimiento de micelio ni esporulación del hongo, lo cual indica que el suelo por sí solo no contiene fuentes de nutrientes (macronutrientes) fácilmente disponibles para su crecimiento. En el experimento C_2 (adicionado con 1% de residuos de nopal), se observó el crecimiento de micelio y esporulación de *A. niger*, sin necesidad de adicionar la solución de oligoelementos, lo cual indica que el uso de estos residuos como cosustrato es altamente ventajoso para el proceso. Por otro lado, en el experimento C_3 (en el cual se probó la utilización de la sacarosa como sustrato y oligoelementos), tampoco se observó crecimiento del microorganismo, lo cual indica que, en presencia de un contaminante como la atrazina, la sacarosa no es un buen cosustrato. Las imágenes que ilustran el desarrollo de estos experimentos pueden ser consultadas en la figura *b4* del apéndice B.

Tabla 12. Resultados de las pruebas de crecimiento de *Aspergillus niger* en suelo contaminados con atrazina.

tiempo (días)	Experimento		
	C ₁	C ₂	C ₃
0	No obs.	No obs.	No obs.
1	No obs.	Micelio	No obs.
2	No obs.	Esporas	No obs.
3	No obs.	Esporas	No obs.

4.2. Diseño estadístico de experimentos 2³ completamente al azar.

En la tabla 13 se muestran los resultados del diseño de experimentos 2³. En ella se pueden observar los valores promedio de la cantidad de biomasa al inicio del experimento, su crecimiento después de siete días y el porcentaje de atrazina degradada en el proceso. En el apéndice C se muestran detalladamente los resultados del balance de materia a través del cual se calculó la concentración de atrazina al final del experimento.

Tabla 13. Resultados experimentales de formación de biomasa y consumo de atrazina después de siete días. Diseño de experimentos 2^3 completamente al azar.

T [°C]	C _{res.} [%W]	H [%GM]	C _{A.n.} [ppm]		C _{atz.} [ppm]		Degradación [%]
			t= 0	t= 7 días	t= 0	t= 7 días	
28	5	70	28.4	42.0	370	271.4	26.2
28	5	80	8.6	51.5	370	159.1	55.6
28	10	70	10.4	49.6	340	313.1	7.9
28	10	80	14.1	65.2	350	103.5	70.0
40	5	70	6.7	46.7	370	286.2	20.0
40	5	80	1.3	49.2	360	283.9	26.8
40	10	70	3.9	48.0	360	138.4	63.6
40	10	80	15.4	39.4	360	91.8	75.0

(C_{res.} es la concentración de residuos de nopal y H es la humedad del sistema.)

En la tabla 14 se muestran los resultados obtenidos a partir del modelo lineal general con una certeza del 99%. A partir de estos resultados, se observa que, dado que el valor de la significancia de los tres parámetros y de sus combinaciones es menor que el parámetro $\alpha=0.01$ propuesto, se puede afirmar que los tres factores y sus respectivas combinaciones juegan un papel significativo en la degradación de atrazina, es decir, que al modificar sólo uno de ellos, se espera que los resultados del proceso también se modifiquen.

Tabla 14. Resultados del modelo lineal ($\alpha = 0.01$, 99% confianza). Análisis de varianza del modelo lineal general. Pruebas de los efectos inter – sujetos.

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	9301.638 ^a	7	1328.805	982.038	.000
Intersección	29764.186	1	29764.186	21996.879	.000
Temperatura	165.676	1	165.676	122.441	.000
Residuos	1934.768	1	1934.768	1429.868	.000
Humedad	3014.779	1	3014.779	2228.037	.000
Tem * Res	2293.692	1	2293.692	1695.126	.000
Res * Hum	346.891	1	346.891	256.366	.000
Tem * Hum	1348.248	1	1348.248	996.407	.000
Tem * Res * Hum	197.585	1	197.585	146.023	.000
Error	10.825	8	1.353		
Total	39076.648	16			
Total corregida	9312.463	15			

a. R cuadrado = .999 (R cuadrado corregida = .998)

Posterior al ANOVA, se realizó un análisis Post-Hoc a cada uno de los factores principales y todas sus posibles interacciones. Una vez que se ha determinado que existen diferencias entre las medias, las pruebas de rango Post – Hoc permiten determinar cuál o cuáles de estas medias difieren, con lo cual pueden identificarse subconjuntos homogéneos de medias que no se diferencian entre sí, es decir, si un experimento es estadísticamente igual a otro.

En la tabla 15 se muestra el efecto de la temperatura y la cantidad de residuos sobre la degradación de atrazina. En este caso, los resultados de las pruebas post hoc mostrados, indican que, no hay diferencia estadística entre los experimentos a estas condiciones debido a que existe sólo un conjunto homogéneo. Por lo tanto, hacer un cambio simultáneo en estos dos factores no tendrá un efecto significativo en el proceso. Por otro lado, se observa que el

mayor porcentaje de degradación de atrazina se obtiene en los niveles altos de temperatura y concentración de residuos de nopal.

Tabla 15. Pruebas post hoc y subconjuntos homogéneos para la combinación Temperatura-porcentaje de residuos.

Temperatura-Residuos	N	Medias para subconjuntos homogéneos; $\alpha = 0.01$
		1
40°C, 5% W	4	23.37900
28°C, 10%	4	38.93625
28°C, 5% W	4	40.88950
40°C, 10%	4	69.31825
Significancia		.033

En la tabla 16 se muestra el efecto de la cantidad de residuos y la humedad de los cultivos sobre la degradación de atrazina. En este caso, La interacción de estos dos factores no provoca un efecto significativo en la degradación de la atrazina. Por otro lado, se observa que el mayor porcentaje de degradación de atrazina se obtiene cuando la humedad y la cantidad de residuos de nopal se encuentran en su nivel alto.

Tabla 16. Pruebas post hoc y subconjuntos homogéneos para la combinación porcentaje de residuos – humedad.

Residuos-Humedad	N	Medias para subconjuntos homogéneos; $\alpha = 0.01$
		1
5% W, 70%	4	23.06375
10% W, 70%	4	35.74425
5% W, 80%	4	41.20475
10% W, 80%	4	72.51025
Significancia		.011

En la tabla 17 se muestra el efecto de la temperatura y la humedad de los cultivos sobre la degradación de atrazina. Como en los casos anteriores, tampoco es significativa para el proceso de degradación de atrazina la interacción de la humedad y la temperatura. Sin embargo, se puede observar que el mayor porcentaje de degradación se obtiene en el nivel alto de humedad, aunque la temperatura se encuentre en su nivel bajo.

Tabla 17. Pruebas post hoc y subconjuntos homogéneos para la combinación Temperatura – humedad.

Temperatura-Humedad	N	Media para subconjuntos homogéneos; $\alpha = 0.01$
		1
28°C, 70%	4	17.00650
40°C, 70%	4	41.80150
40°C, 80%	4	50.89575
28°C, 80%	4	62.81925
Significancia		.031

En la tabla 18 se muestran las medias de los subconjuntos homogéneos para el porcentaje de degradación de atrazina con la combinación de los tres factores, ordenadas de forma ascendente. En ella se observa que existen seis subconjuntos homogéneos diferentes, lo cual indica que existen seis experimentos estadísticamente diferentes. A partir de estos resultados

se puede afirmar que la temperatura no es un factor que influya de forma significativa al proceso ya que los mayores porcentajes de degradación se obtienen en los dos niveles de este parámetro. La cantidad de residuos en el sistema tienen un efecto importante en el proceso, pero, tomando en cuenta las pruebas anteriores, se puede afirmar con un 99% de certeza que el parámetro que más influye en la degradación de atrazina es la humedad ya que la modificación de este parámetro provoca el cambio más significativo en la degradación del contaminante.

Tabla 18. Pruebas post hoc y subconjuntos homogéneos para la combinación Temperatura - porcentaje de residuos - humedad.

Temperatura- Residuos- Humedad	N	Media para subconjuntos homogéneos; $\alpha = 0.01$					
		1	2	3	4	5	6
28, 10, 70	2	7.86					
40, 5, 70	2		19.97				
28, 5, 70	2			26.15			
40, 5, 80	2			26.78			
28, 5, 80	2				55.62		
40, 1, 70	2					63.63	
28, 10, 80	2						70.01
40, 10, 80	2						75.01
Significancia (X10 ³)		1.000	1.000	.999	1.000	1.000	.033

En la figura 11 se muestra la gráfica de porcentaje de degradación de atrazina e intervalos de confianza después de siete días en cada uno de los experimentos, en ella se puede observar que, al analizar la influencia de la interacción de la temperatura, la cantidad de residuos de nopal y la humedad, los únicos intervalos que se cruzan son los de los experimentos 4 y 8, con lo que se sabe que ambos experimentos son estadísticamente iguales. Con ello puede

afirmarse, con un 99% de certeza que, bajo cualquiera de las dos condiciones, es decir, a las temperaturas de 28 y 40°C, con 10% de residuos de nopal y 80% de humedad, se obtiene entre un 70 y 75% de degradación de atrazina en el proceso. Las tablas de los valores de los intervalos de confianza graficados se presentan en el apéndice C.

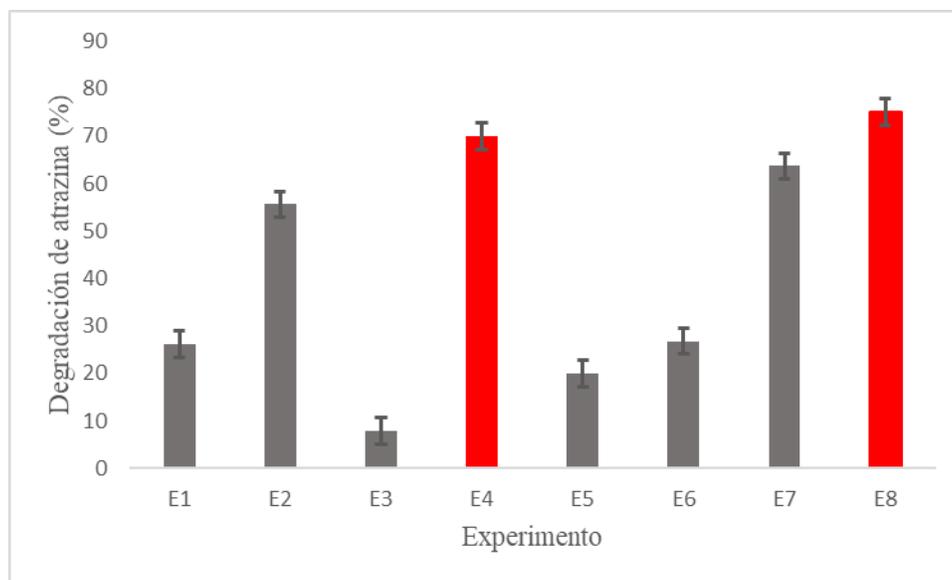


Figura 11. Gráfica de porcentaje de degradación de atrazina e intervalos de confianza después de siete días.

Como resultado del análisis del diseño de experimento y de la conveniencia operativa del sistema, se determinó que las condiciones a las que se debe llevar el proceso son 28°C, 10% de residuos de nopal y 80% de humedad relativa. Se prefirió la temperatura baja debido a que, al realizar los experimentos en el valor alto, se observó que la evaporación de agua en el sistema dificulta la cuantificación de la biomasa y el amoníaco. Además, la temperatura baja tiene un valor más cercano a las condiciones ambientales promedio.

4.3. Cinética de degradación de atrazina en suelo agrícola.

En la tabla 19 se muestran los resultados experimentales de la cinética de degradación de atrazina, en ella se describe el crecimiento de la biomasa, la cantidad de nitrógeno amoniacal consumido, el amoniaco formado y la disminución de la cantidad de atrazina presente en el sistema a lo largo del tiempo. Se observa que, coincidentemente con los resultados obtenidos en el diseño estadístico de experimentos, la cantidad final de degradación de atrazina fue del 73.2%, valor que se encuentra dentro del intervalo de confianza de degradación en los experimentos que tuvieron mejores resultados. Por otro lado, la cantidad de biomasa producida en el proceso no es tan grande debido a que en éste también se produce amoniaco y bióxido de carbono como productos de la biodegradación. Los balances de materia que se utilizaron para el cálculo de la cantidad de atrazina presente en el medio se detallan en el apéndice D.

Tabla 19. Resultados de la cinética de degradación de atrazina por actividad enzimática de *Aspergillus niger*.

t (días)	C _{biom} (ppm)	C _{Atz} (ppm)	C _{NH3} consumido (ppm)	C _{NH3} formado (ppm)
0	12.9	340.0	0.0	0.0
1	15.4	202.6	3.4	1.4
2	17.0	148.3	22.9	2.2
3	25.9	138.6	42.0	1.9
4	42.5	126.6	60.6	1.5
5	52.4	102.8	70.0	1.3
6	63.3	100.4	79.3	1.0
7	64.1	91.0	83.1	1.1

En la figura 12 se muestra la gráfica de crecimiento de la biomasa y degradación de la atrazina. En ella se puede observar que, al igual que en los experimentos cualitativos que se llevaron a cabo para determinar la toxicidad del contaminante con el microorganismo, la cinética de crecimiento de éste tiene una forma sigmoidea, lo cual indica que *A. niger* atraviesa por las tres fases de crecimiento durante el proceso; la fase de latencia, la fase exponencial y la fase estacionaria. Este comportamiento es determinante en la formulación del modelo matemático ya que los modelos de crecimiento celular que no describan estas fases resultan inadecuados para el proceso. Por otro lado, el comportamiento de la degradación de la atrazina podría modelarse con una cinética de primer orden ya que la forma de la gráfica resultante coincide con algunas ya reportadas anteriormente [63].

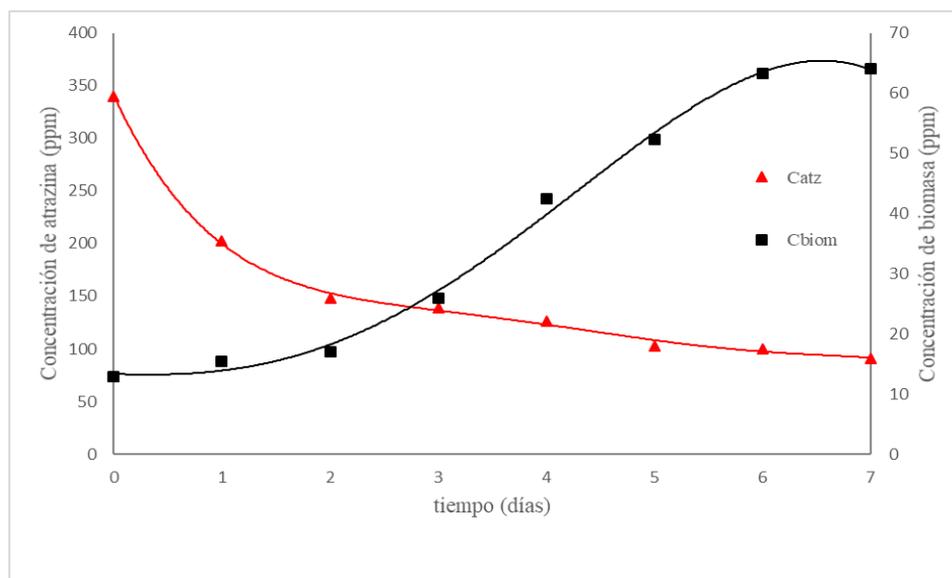


Figura 12. Cinética de degradación de atrazina por actividad enzimática de *Aspergillus niger*. Crecimiento de biomasa y concentración de atrazina contra el tiempo.

4.4. Simulación de la cinética de degradación de atrazina aplicando un modelo logístico basado en el de Monod.

Utilizando el modelo logístico descrito por las ecuaciones 43 y 44 descritas en la sección 1.4.3, se determinó el valor de los parámetros $\mu_{m\acute{a}x}$, Y , K_s y K_d aplicando la herramienta *lsqcurvefit* de Matlab basada en el método de optimización local de intervalos de confianza.

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y}\mu_{m\acute{a}x}\frac{S}{S+K_s}X$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{m\acute{a}x}\frac{S}{S+K_s}X - K_dX$$

El método de intervalos de confianza tiene una región alrededor de un punto de búsqueda en el tiempo actual donde el modelo cuadrático:

$$q_k(p) = f(x_k) + \nabla f(x_k)^T p + \frac{1}{2}p^T B_k p \quad \text{ec. (67)}$$

Para la que la minimización local sea confiable y se eligen los pasos para permanecer dentro de esa región. El tamaño de la región es modificado durante la búsqueda basado en qué tan bien se ajusta el modelo con la evaluación actual de la función.

Típicamente la región de confianza se considera como una elipse tal que $\|D p\| \leq \Delta D$ es una matriz diagonal comúnmente tomada del Hessiano aproximado y Δ es el radio de la región de confianza que es actualizado para cada paso.

Si el tamaño de paso basado en el modelo cuadrático se encuentra dentro del intervalo de confianza, asumiendo que el valor de la función se reduce, este tamaño será elegido. Igual que en el caso de los modelos de minimización lineal, el control del tamaño de paso no interfiere con la convergencia del algoritmo cerca de un mínimo donde el modelo cuadrático

es adecuado. Cuando el tamaño de paso basado en el modelo cuadrático se encuentra fuera de la región de confianza, se elige un paso justo en el límite de la región de confianza de tal manera que el tamaño de paso es un minimizador aproximado del modelo cuadrático sobre el límite de la región de confianza. Una vez que el tamaño de paso p_k es elegido, la función es evaluada en el nuevo punto y el valor actual de la función se contrasta con el valor predicho por el modelo cuadrático. Lo que en realidad se calcula es el radio entre la reducción actual y la predicha.

$$\rho_k = \frac{f(x_k) - f(x_k + p_k)}{q_k(0) - q_k(p_k)} \quad \text{ec. (68)}$$

Si el valor del radio es cercano a 1, se considera que el modelo cuadrático es un buen predictor y la región de confianza puede crecer. Por otro lado, si el radio es muy pequeño, la región de confianza debe disminuir. Si el radio se encuentra por debajo del límite determinado, el tamaño de paso debe ser recalculado [64].

En la tabla 20 se muestran los valores de los parámetros estimados comparados con parámetros reportados en la literatura. Cabe mencionar que para estos últimos se utilizó un consorcio de microorganismos como inóculo, además, a diferencia del presente trabajo, estos experimentos fueron llevados a cabo en fase líquida. Estos valores se utilizaron como referencia ya que no se encontraron resultados en estado sólido reportados [51]. El código que se utilizó para la estimación de los parámetros del modelo puede consultarse en el apéndice D.

Tabla 20. Valores de los parámetros cinéticos de biodegradación de atrazina comparados con los reportados en la literatura [51].

Párametro	Valor estimado	Valor reportado [59]
$\mu_{máx}$ [$mg/día \cdot mg_{biom.}$]	0.0514	0.011
Y [mg/mg]	0.0037	0.53
K_s [mg/Kg]	4.44	7.0
K_d [$1/d$]	0.7788	0.005

En la figura 13 se muestra la cinética de degradación de atrazina obtenida con el modelo empleado. Se puede observar que la aproximación de los valores calculados y los valores reales es adecuada. Resulta importante resaltar que la velocidad máxima de crecimiento de biomasa a partir de la biodegradación del pesticida es alrededor de 5 veces mayor en estas condiciones que en las condiciones reportadas en la literatura [51]. El coeficiente de rendimiento es dos órdenes de magnitud menor al reportado mientras que el coeficiente de decaimiento es mayor en la misma proporción. Los valores calculados de estos dos parámetros difícilmente tendrán un sentido físico ya que un coeficiente de rendimiento tan pequeño implicaría que la producción de biomasa a partir de la atrazina es casi nula, además, el valor calculado a partir de la aproximación del modelo no coincide con el calculado a partir del balance de materia. Por otro lado, el valor del coeficiente de decaimiento manifiesta gran cantidad de muerte del microorganismo, lo que afectaría el crecimiento de la biomasa. Esto no coincide con las mediciones experimentales. El coeficiente de saturación media es 1.5 veces mayor que el reportado.

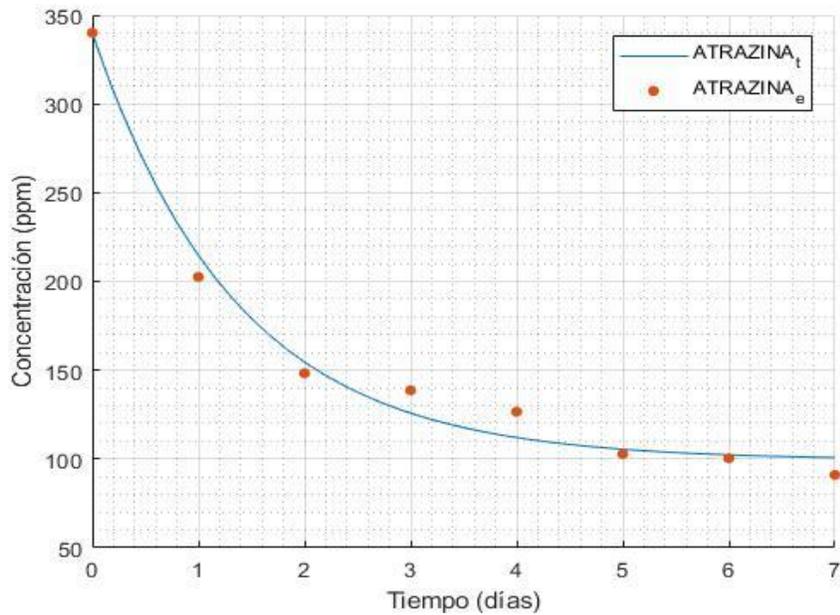


Figura 13. Simulación de la cinética de biodegradación de atrazina comparada con los datos experimentales (donde ATRAZINA_t es la cinética simulada con el modelo y ATRAZINA_e es la gráfica de datos experimentales).

Con los resultados obtenidos, se sabe que el modelo propuesto para la descripción del proceso de degradación de atrazina con *A. niger*, utilizando espinas de nopal como cosustrato, es deficiente, esto se debe a diferentes factores. Por un lado, el modelo no considera la existencia de un sustrato diferente a la atrazina en el sistema y, por lo tanto, no describe el crecimiento de la biomasa debido a éste. Además, el modelo fue propuesto, en principio para describir un sistema líquido y, aunque se reportan buenos resultados en medios sólidos muy específicos, la complejidad del sistema en este trabajo influye en los resultados obtenidos poniendo de manifiesto la necesidad de desarrollar un modelo que incluya estos y algunos otros factores que describan con mayor eficiencia el proceso.

5. Conclusiones.

En este trabajo se desarrolló un proceso mediante el cual es posible acelerar la velocidad natural de degradación de atrazina por *A. niger* en un suelo contaminado con 340 ppm de este pesticida. A partir de los experimentos realizados se sabe que este hongo es capaz de crecer en medios contaminados con hasta 1000 ppm de atrazina.

Aunque *A niger* tiene la capacidad de crecer en ambientes con altas concentraciones de atrazina, no es capaz de utilizarla como única fuente de nutrientes, por ello, resulta necesaria la utilización de un cosustrato. Los residuos de nopal resultan adecuados para este objetivo debido a su contenido de lignina y pectina que favorecen la producción de enzimas capaces de degradar la atrazina.

Las mejores condiciones para llevar a cabo el proceso son 28°C, 10% de residuos de nopal y 80% de humedad. En estas condiciones, se puede obtener alrededor de un 75% de degradación de atrazina en el suelo, esto se puede afirmar con un 99% de certeza.

La aproximación de la cinética de biodegradación de la atrazina calculada a través del modelo logístico basado en el de Monod, es adecuada, sin embargo, el crecimiento de la biomasa no pudo ser modelado. Esto puede deberse a que el modelo fue propuesto para describir el estado líquido principalmente y no contempla la existencia de un cosustrato como es el caso de los residuos de nopal.

6. Trabajo futuro.

Algunos aspectos importantes en el estudio del proceso de biodegradación de atrazina por la actividad enzimática de *Aspergillus niger* utilizando residuos de nopal como cosustrato serían los siguientes:

- Abundar en el estudio de la ruta metabólica que sigue el microorganismo en el consumo de la atrazina como sustrato, ya que esto mejoraría la comprensión del fenómeno en un Sistema tan complejo.
- Evaluar el efecto de algunos parámetros como el pH, la concentración de contaminante y las propiedades del suelo en el proceso ya que son parámetros que podrían influir en el consumo del contaminante.
- Continuar el desarrollo de un modelo matemático estructurado que describa el fenómeno en estado sólido, tomando en cuenta otros fenómenos como la cooperatividad del cosustrato, que puedan influir en la degradación del contaminante.
- Profundizar en el análisis de los residuos de nopal utilizados como cosustrato ya que sus propiedades pueden ser determinantes para el crecimiento del microorganismo.

7. Referencias.

1. Marinho G., Barbosa B. C. A., Rodrigues K., Aquino M., Pereira L., (2017), Potential of the filamentous fungus *Aspergillus niger* AN 400 to degrade atrazine in wastewater, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Elsevier, 9, 162 – 167.
2. Hansen A. M., Treviño-Quintanilla L., Márquez H., Villa M., González L., Guillén R., Hernández A., (2013), Atrazina: un herbicida polémico, *Revista internacional de contaminación ambiental (número especial sobre plaguicidas)*, 65 – 84.
3. Fan X., Song F., (2013), Bioremediation of atrazine: recent advances and promises, *J soils sediments*, 14, 1727 – 1737.
4. SIAVI, (2012), Secretaría de Economía México. [en línea]. <http://www.siavi.economia.gob.mx/>. (último acceso junio 2017).
5. Bohn T., Cocco E., Gourdol L., Guignard E., Hoofman L., (2011), Determination of atrazine and degradation products in Luxembourgish drinking water: origin and fate of potential endocrine disrupting pesticides, *Food Addit Contam*, 28, 1041 – 1054.
6. Chan KH., Chu W., (2003), Modeling of the reaction kinetics of Fenton's process on the removal of atrazine, *Chemosphere*, 51, 305 – 3011.
7. Nasser A., Assad & Ronald F., (1993), Accelerated biodegradation of atrazine by a microbial consortium is possible in culture and soil, Kluwer Academic Publisher. *Biodegradation*, 5, 29 – 35.
8. ANEAS, (2007), Agua para uso y consumo humano. Límites máximos permisibles de la calidad del agua, control y vigilancia de los sistemas de abastecimiento (Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-XXXX). Asociación Nacional de empresas de agua y

saneamiento [en línea]. <http://www.aneas.com.mx/contenido/nom.pdf> (último acceso junio de 2017).

9. Hang S., Roberto S., (2002), Adsorción de atrazina y su relación con las características sedimentológicas y el desarrollo del perfil de dos suelos de la provincia de Córdoba. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 31, 73 – 87.
10. Ben – Hur M., Letey I., Farmer W., William C., Nelson S., (2003) Soluble and Solid organic matter effects on atrazine adsorption inoculated soils. *Soil. Sci. Soc. Am.*, 67, 1140 – 1146.
11. Guillén-Garcés R., Hansen A., Afferden van M. (2007). Mineralization of atrazine in agricultural soil: Inhibition by nitrogen. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 844 – 850.
12. Sylvia D., Fuhrmann J., Hartel P., Zuberer D., (2004) Principles and applications of soil Microbiology, Prentis Hall, 2a. ed. ,73 – 83.
13. Maqbool Z., Hussain S., Imran M., Mahmood F., Shahzad T., Ahmed Z., Azeem F., Muzammil S., (2016), Perspectives of using fungi as bioresource for bioremediation of pesticides in the environment: a critical review, *Environ Sci Pollut Res*, 23, 16904–16925.
14. Singh A., Cameotra S., (2014). Influence of microbial and synthetic surfactant on the biodegradation of atrazine. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 2088-2097.
15. Yi M., Guangmin9g Z., Cuimei H., Xigobing W., Zhihui A., Jianping Z., Shenglian L., Lizhi Z., (2019), Dechloration – Hydroxilation of atrazine: A detoxification strategy in seconds, *Environ. Sci. Technol.*, 53, 3208 – 3216.
16. Yichen H., Jiali P., Xiuge Z., Yan Y., Bo L., Gang Y., (2019), Efficient degradation of atrazine by CoMgAl layered double oxides catalyzed peroxymonosulfate: Optimization, degradation pathways and mechanism, *Chemical Engineering Journal*, 570, 354 – 363.

17. Javed A., Xuexiang H., Noor S., Murtaza S., Hasan M., Dionysios D., (2017) Degradation kinetics and mechanism of desethyl-atrazine and desisopropyl-atrazine in water with OH and SO₄⁻ based-AOPs, *Chemical Engineering Journal*, 325, 485, 494.
18. Ventura A., Jacquet G., Bermond A., Camel V., (2002), Electrochemical generation of the Fenton's reagent: application to atrazine degradation. *Water Res.*, 36 (14), 3517– 3522.
19. Tian Y., Shen W., Jia F., Ai Z., Zhang L., (2017), Sulfite promoted photochemical cleavage of s-triazine ring: the case study of atrazine. *Chem. Eng. J.*, 330, 1075– 1081.
20. Hu E., Cheng H., Hu Y., (2012) Microwave-induced degradation of atrazine sorbed in mineral micropores. *Environ. Sci. Technol.*, 46 (9), 5067– 5076.
21. Kolekar P. D., Phugare S. S., Jadhav J. P., (2014) Biodegradation of atrazine by rhodococcus sp. BCH₂ to n-isopropylammelide with subsequent assessment of toxicity of biodegraded metabolites. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 21 (3), 2334– 2345.
22. Mandelbaum R., Wackett L., Allan D., (1995), Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. That mineralizes the s – triazine herbicide atrazina, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 1451 – 1457.
23. Govantes F., Porrúa O., García – González V., Santero V., (2009), Atrazine biodegradation in the lab and in the field: enzymatic activities and gene regulation, *Microbial Biotechnology*, 2(2), 178 – 185.
24. Benki, R., Khan, S., (1986), Degradation of atrazine by pseudomonas, N – dealkylation and dehalogenation of atrazine and its metabolies, *Journal of Agriculture and food Chemistry*, Washington v. 34, 4, 746.

25. Masaphy S., Levanon D., Henis Y., (1996), Degradation of atrazine by the lignocellulolytic fungus *Pleurotus pulmonarius* during solid – state fermentation, *Bioresource Technology*, v. 56, 207 – 214.
26. Ojeda -López M., Chen W., Eagle C., Gutiérrez G., Jia L., Swilaiman S.,3Z. Huang Z., Park S., Yu J., Cánovas D., Dyer S., (2018), Evolution of asexual and sexual reproduction in the aspergilli, *Studies in Mycology*, 91, 37 – 59.
27. Krijghsheld P., Bleichrodt R., van Veluw G., Wang F., Muller W., Dijksterhuis J., Wösten H., (2013) Development in *Aspergillus*. *Studies of Mycology*, 74, 1-29.
28. Hagiwara D., Sakai K., Suzuki S., Umemura M., Nogawa T, Kato N., et al. (2017) Temperature during conidiation affects stress tolerance, pigmentation, and trypacidin accumulation in the conidia of the airborne pathogen *Aspergillus fumigatus*. *PLoS ONE* 12(5): e0177050. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177050>
29. Rordam M., Lynge M., Nielsen J., (2008). Metabolic model integration of the bibliome, genome, metabolome and reactome of *Aspergillus niger*. *Mol Syst Biol*. 4: 113.
30. Sun J., Lu X., Rinas U., Ping Zeng A. (2007). Metabolic peculiarities of *Aspergillus niger* disclosed by comparative metabolic genomics. *Genome Biology*. 8:R 182.
31. Schuster E., Dunn-Coleman N., Frisvad J. C., van Dijck P. (2002). On the safety of *Aspergillus niger*-a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 59: 426-435.
32. Andersen M. R. (2008). Systems biology studies of *Aspergilli* from sequence to science. Tesis Doctoral, Universidad Técnica de Dinamarca, Dinamarca.
33. Gago-Ferrero, P. (2012) Science of the Total Environment Evaluation of fungal- and photodegradation as potential treatments for the removal of sunscreens BP3 and BP1. *Science of the Total Environment*, v. 427–428, 355–363.

34. Deshmukh R., Khardenavis A., Purohit H. (2016) Diverse Metabolic Capacities of Fungi for Bioremediation. *Indian Journal of Microbiology*, v. 56, 3, 247–264.
35. Maqbool Z., (2016), Perspectives of using fungi as bioresource for bioremediation of pesticides in the environment: a critical review. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 23, 16904–16925.
36. Sutherland T., (2004), Enzymatic Bioremediation: From Enzyme Discovery to Applications, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 31, 817–821.
37. Guillén-Garcés R., Hansen A., y Afferden van M., (2007), Mineralization of atrazine in agricultural soil: Inhibition by nitrogen. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 844 – 850.
38. Wang L., Samac D., Shapir N., Wackett L., Vance C., Olszewski N., Sadowsky M., (2005), Biodegradation of atrazine in transgenic plants expressing a modified bacterial atrazine chlorohydrolase (*atzA*) gene, *Plant Biotechnology Journal*, 3, 475–486.
39. Bravo H., (1978), *Las cactáceas de México*, Universidad Nacional Autónoma de México, 1, 35 – 38.
40. 11. Guillén-Garcés R., Hansen A., Afferden van M. (2007). Mineralization of atrazine in agricultural soil: Inhibition by nitrogen. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 844 – 850.
41. Díaz – A. (2009), *Diseño estadístico de experimentos*, Editorial Universidad de Antioquía, Colombia, 165-169.
42. Maxwell S., Delaney H., (2004), *Designing Experiments and Analyzing Data*, 2a Ed., Editorial
43. Izquierdo J., Cunill F., Tejero J., Iborra M., Fité C., (2004), *Cinética de las reacciones Químicas*, Universidad de Barcelona, 8 -31.
44. Blanco J., Linarte R., (1976), *Catálisis, fundamentos y aplicaciones industriales*, Trillas, 1ª ed. 15 -18.

45. Doran P., (1995), *Bioprocess Engineering Principles*, Elsevier Science & Technology Books, ISBN: 0122208552, (257 – 297).
46. Michaelis L., Menten M., (1913), *Die Kinetik der Invertinwirkung*, Eingegangen am,
47. Mathews CH., Van Holde K., Appling D., Anthony – Cahill E., (2012), *Biochemistry*, Pearson Education, 1368 pp.
48. Corman A., Pave A., (1983), On parameter estimation of Monod's Bacterials growth model from batch culture data, *J. Gen Appl. Microbiol.*, 9, 91 – 101.
49. Baranyi J., (2010) Modelling and parameter estimation of bacterial growth with distributed lag time, PhD thesis, 10 – 26.
50. Marinho G., Barbosa B., Rodrigues K., Aquino M., Pereira L., (2017), Potential of the filamentous fungus *Aspergillus niger* AN 400 to degrade atrazine in wasterwaters, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, ELSEVIER, 9,161 – 167.
51. Carboneras B., Villaseñor J., Fernández – Morales F., (2017), Modelling aerobic of atrazine and 2,4 – dichlorophenoxy acetic acid by mixed cultures, *Bioresource Technology*, 243, 1044 – 1050.
52. Cheyns K., Mertens J., Diels J., Smolders D., Springael D., (2010), Monod Kinetics rather than a first – order degradation Model explains atrazine fate in soil mini – columns: implication for pesticide fate modelling, *Environmental Pollution*, 158, 1405 – 1411.
53. Debasmita N., Rajasimman M., (2013), Optimization and kinetics studies on biodegradation of atrazine using mixed microorganisms, *Alexandria Engineering Journal*, 52, 499 – 505.
54. Barceló I., Solís H., (2010), *Cinética y catálisis de las reacciones químicas en fase homogénea*, Universidad Autónoma Metropolitana, 1a. ed. 13 – 24.

55. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, (2002) NORMA OFICIAL MEXICANA NOM – 021- SEMARNAT – 2000, 13 – 19.
56. Bradford M., (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein – dye binding, *Analyt. Biochem*, 72, 248 – 254.
57. Miller G., (1959), Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Analytical Chemistry*, Quartermaster Research and Engineering Center, Natick, Mass, 31, 3, 426 – 428.
58. Southgate, D.A.T., (1991), *Determination of Food Carbohydrates Second Edition*; Elsevier Applied Science, Nueva York.
59. Hach Company., (1997)., “Manual del Hach DR/2000 Spectrophotometer”, U.S.A., 3-27, 423, 465 y 619.
60. Reyes I., (2013), Estudio del metabolismo de *Aspergillus niger* crecido en superficie de agar, Tesis de Doctorado en ciencias de Ingeniería química, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México, 34 – 43.
61. Fakruddin M., Mohammad M., Shanewaj B., (2011), Predictive microbiology: Modeling microbial responses in food, *Ceylon Journal of Science*, 40,2 , 121-131.
62. Erickson, L., Minkevich I., Eroshin V., (1978), Application of máss and energy balance regularities in fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 20, 1595 – 1621.
63. Bonsjak M., Kolic U., Petri I., Cihlar D., Hrsak D., (2010), Integrated Approach to Mathematical Modelling of Atrazine Degradation in Different Reaction Systems, *Food Technol. Biotechnol.* 48 (3) 392–403.
64. Berghen, F., (2004). *Levenberg-Marquardt Algorithms Vs Trust Region Algorithms*. Belgium: Université Libre de Bruxelles. [Online]. Disponible en: <http://www.applied-mathematics.net/LMvsTR/LMvsTR.pdf>.

Apéndice A

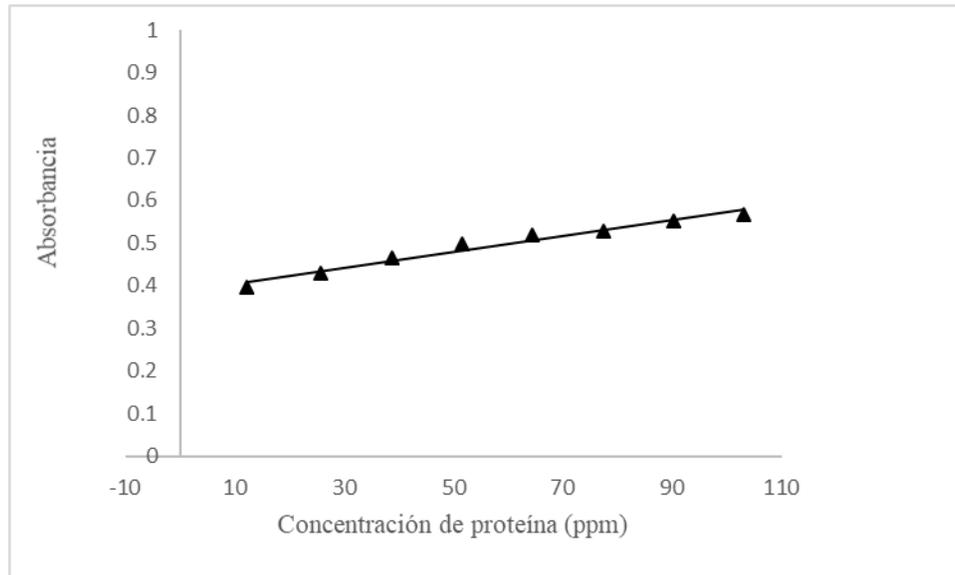


Figura a1. Gráfica de concentración de proteína contra absorbancia.

De la gráfica mostrada en la figura a1, a partir de la regresión lineal de los datos, se obtuvo la ecuación *a1* que representa la recta que relaciona la absorbancia con la concentración de proteína en el sistema, donde *Abs*, es la absorbancia de la solución estándar; *x*, es la concentración del estándar de proteína; $m= 0.0017$ es la pendiente de la recta y $b=0.3948$ es la ordenada al origen. El coeficiente de determinación múltiple R^2 resultó de 0.9653.

$$Abs = 0.0017x + 0.3948 \quad ec. (a1)$$

Se sabe que la cantidad de proteína celular del microorganismo es proporcional a la cantidad de biomasa. Despejando la concentración de proteína de la ecuación *a1*, se obtiene la ecuación *a2*. De esta manera se hace posible la cuantificación de la biomasa en el sistema [56].

$$C_{biom.} = \frac{Abs-0.3948}{0.0017} \quad ec. (a2)$$

Donde $C_{biom.}$ es la concentración de biomasa. Y Abs es la absorbancia de la solución.

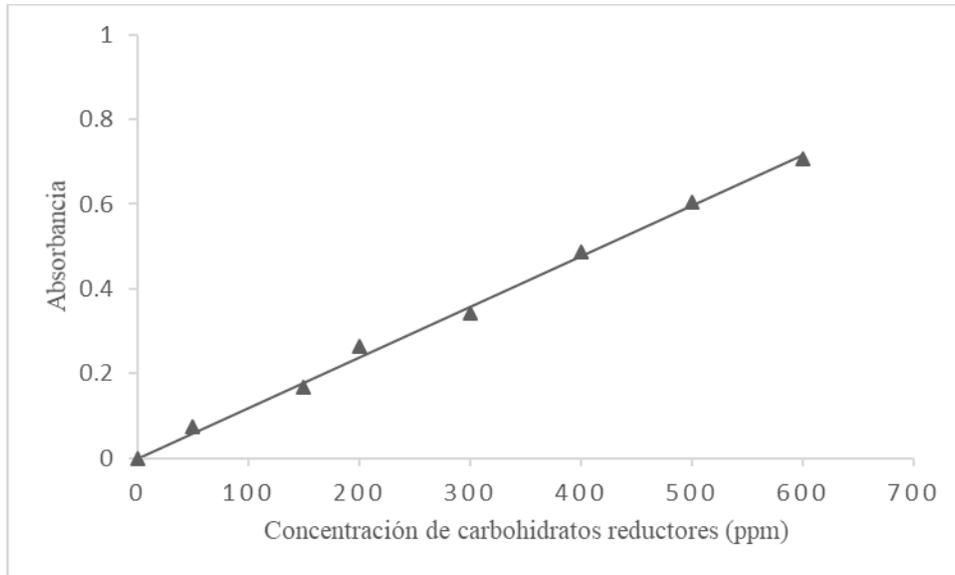


Figura a2. Curva de calibración para la cuantificación de carbohidratos reductores.

De forma análoga a la construcción de la curva de calibración de biomasa, la ecuación $a3$ representa la recta que relaciona los datos de absorbancia y concentración del estándar de carbohidratos. Donde ahora x , es la concentración de carbohidratos reductores, $m=0.0012$ y $b=0$.

$$Abs = 0.0012x \quad ec. (a3)$$

El cálculo de la concentración de carbohidratos reductores puede expresarse a través de la ecuación $a4$.

$$C_{CR} = \frac{Abs}{0.0012} \quad ec. (a4)$$

Donde C_{CR} es la concentración de carbohidratos reductores. El coeficiente de determinación múltiple R^2 es de 0.9965.

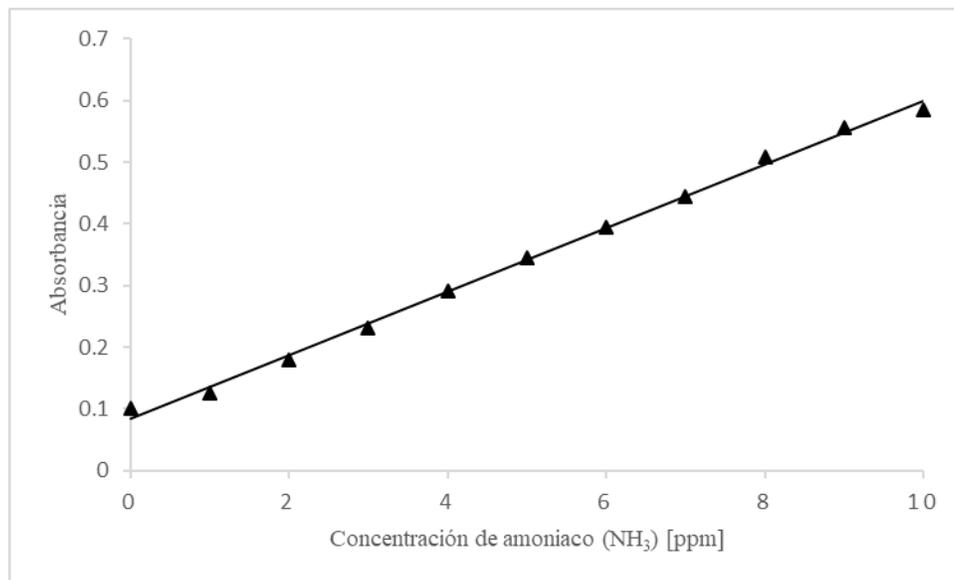


Figura a3. Curva de calibración para cuantificación de amoníaco.

La ecuación de ajuste para la cuantificación de amoníaco se expresa a través de la ecuación *a5* con un coeficiente de determinación múltiple R^2 es de 0.997.

$$C_{NH_3} = \frac{Abs-0.0849}{0.0541} \quad ec. (a5)$$

Apéndice B

Tabla b1. Crecimiento del diámetro del halo de *Aspergillus niger* en un medio de cultivo. Control.

tiempo (días)	Diámetro (mm)				
	a	b	c	d	e
0	0	0	0	0	0
0.21	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1
2	11	12	11	11	12
3	18	19	18	18	18
4	27	24	24	26	26
5	35	34	34	36	35
6	35	34	34	36	35

Tabla b2. Crecimiento del diámetro del halo de *Aspergillus niger* en un medio de cultivo contaminado con 500 ppm de atrazina. Réplica 1.

tiempo (días)	Diámetro (mm)				
	a	b	c	d	e
0	0	0	0	0	0
0.21	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1
2	13	13	13	14	15
3	22	23	23	25	25
4	28	29	30	30	30
5	34	35	35	36	35
6	34	35	35	36	35

Tabla b3. Crecimiento del diámetro del halo de *Aspergillus niger* en un medio de cultivo contaminado con 500 ppm de atrazina. Réplica 2.

tiempo (días)	Diámetro (mm)				
	a	b	c	d	e
0	0	0	0	0	0
0.21	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1
2	6	6	6	5	5
3	16	13	14	12	12
4	26	25	26	26	25

5	34	34	32	35	35
6	34	34	32	35	35

Tabla b4. Crecimiento del diámetro del halo de *Aspergillus niger* en un medio de cultivo contaminado con 500 ppm de atrazina. Réplica 3.

tiempo (días)	Diámetro (mm)				
	a	b	c	d	e
0	0	0	0	0	0
0.21	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1
2	12	12	11	11	11
3	18	18	18	16	16
4	26	26	25	26	24
5	34	35	35	36	34
6	34	35	35	36	34

Tabla b5. Crecimiento del diámetro del halo de *Aspergillus niger* en un medio de cultivo contaminado con 1000 ppm de atrazina. Réplica 1.

tiempo (días)	Diámetro (mm)				
	a	b	c	d	e
0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
24	1	1	1	1	1
48	15	13	13	14	15
72	24	22	24	26	25
96	28	29	31	30	31
120	35	36	35	35	36
144	35	36	35	35	36

Tabla b6. Crecimiento del diámetro del halo de *Aspergillus niger* en un medio de cultivo contaminado con 1000 ppm de atrazina. Réplica 2.

tiempo (días)	Diámetro (mm)				
	a	b	c	d	e
0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
24	1	1	1	1	1
48	6	7	6	5	5
72	18	10	16	12	12
96	26	17	22	19	18

120	35	28	30	28	30
144	35	28	30	28	30

Tabla b7. Crecimiento del diámetro del halo de *Aspergillus niger* en un medio de cultivo contaminado con 1000 ppm de atrazina. Réplica 3.

tiempo (días)	Diámetro (mm)				
	a	b	c	d	e
0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
24	1	1	1	1	1
48	13	13	12	12	11
72	19	19	18	17	16
96	26	28	24	26	23
120	34	35	35	36	34
144	34	35	35	36	34

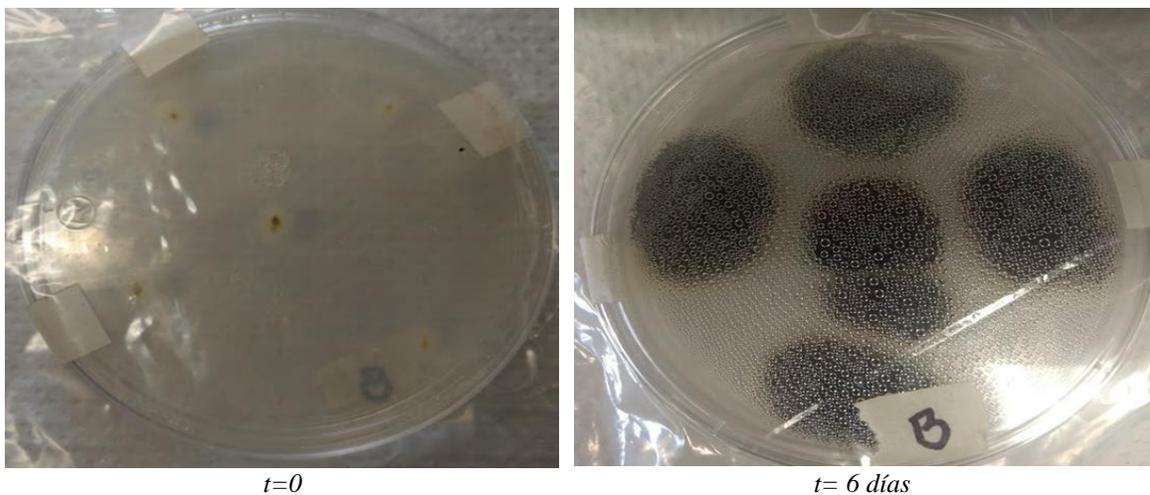


Figura b1. Crecimiento de *Aspergillus niger* en un medio de cultivo (PDA) al inicio y en el día 6. Control.

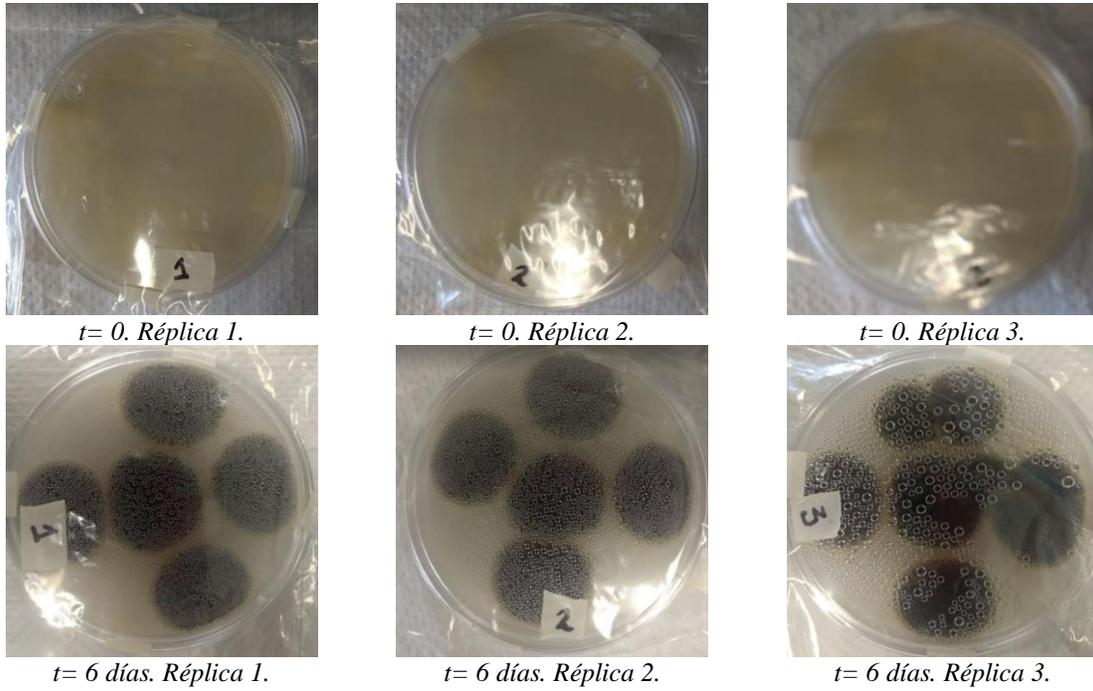


Figura b2. Crecimiento de *Aspergillus niger* en un medio de cultivo (PDA) contaminado con 500 ppm de atrazina al inicio y después de seis días. Réplica 1., 2 y 3.

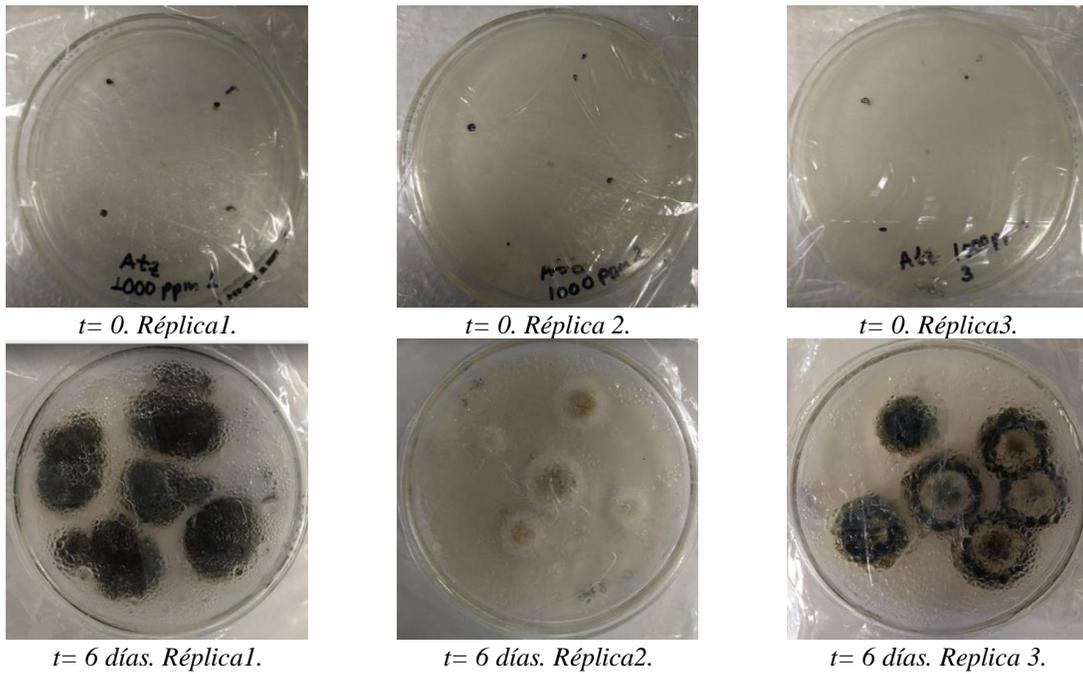


Figura b3. Crecimiento de *Aspergillus niger* en un medio de cultivo (PDA) contaminado con 1000 ppm de atrazina al inicio y después de seis días. Réplica 1., 2 y 3.

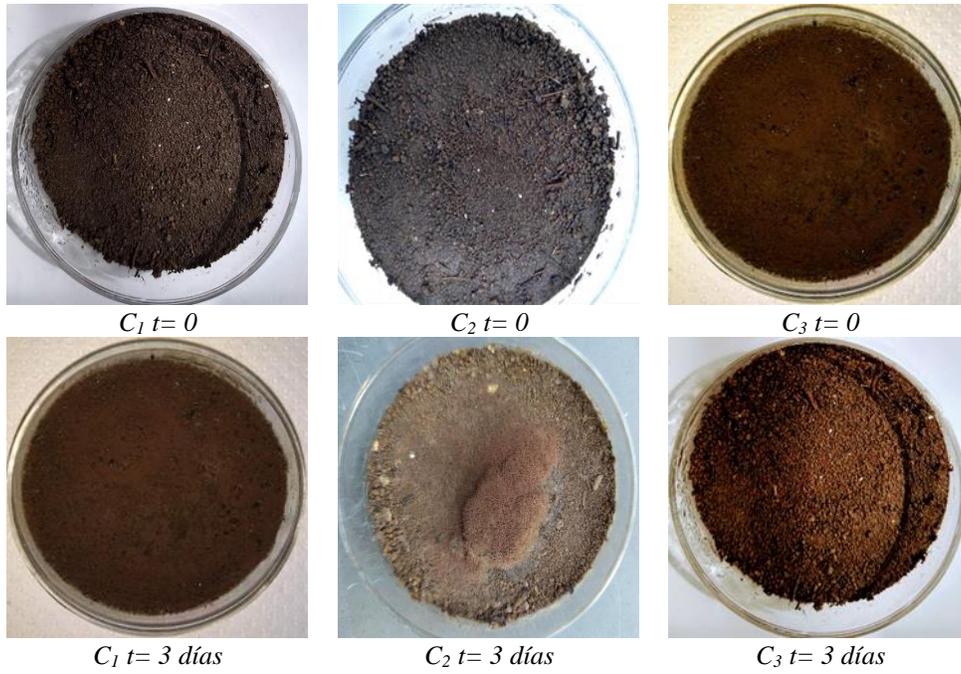


Figura b4. Crecimiento de *Aspergillus niger* en suelos contaminados con 500 ppm de atrazina.

Apéndice C

Tabla c1. Balance de materia para la biomasa. Diseño de experimentos 2³ completamente al azar. Réplica 1.

Experimento	C_{bio} [ppm]				W_{io} [mg]				n_{bio} [mmol]			
	total		Res.	Atz.	total		Res.	Atz.	total		Res.	Atz.
	t=0	t=7 días	t=7 días	t=7 días	t=0	t=7 días	t=7 días	t=7 días	t=0	t=7 días	t=7 días	t=7 días
E1	7.0	10.3	8.6	1.6	0.145	0.207	0.174	0.033	0.004	0.006	0.005	0.0010
E2	2.1	11.7	9.4	2.2	0.043	0.235	0.189	0.045	0.001	0.007	0.006	0.0014
E3	2.5	12.2	11.7	0.5	0.052	0.246	0.236	0.010	0.002	0.008	0.007	0.0003
E4	3.5	15.8	12.9	2.9	0.071	0.318	0.259	0.059	0.002	0.010	0.008	0.0018
E5	1.8	11.4	10.0	1.3	0.037	0.228	0.201	0.028	0.001	0.007	0.006	0.0008
E6	0.3	12.3	10.5	1.7	0.007	0.248	0.212	0.036	0.000	0.008	0.007	0.0011
E7	1.0	12.2	10.6	1.6	0.021	0.245	0.213	0.032	0.001	0.008	0.007	0.0009
E8	3.8	10.3	9.3	1.0	0.077	0.208	0.187	0.021	0.002	0.006	0.006	0.0006

Tabla c2. Balance de materia para el amoniaco. Diseño de experimentos 2³ completamente al azar. Réplica 1.

Experimento	C _{NH3} [ppm]							W _{NH3} [mg]							n _{NH3} [mmol]
	t=0			t=7 días				t=0			t= 7 días				t=7 días
	total	suelo	Resi	total	Res.	Cons.	Form.	total	suelo	Res.	total	residuos	consumido	formado	formado
E1	172.0	11.1	161.2	38.7	28.0	133.2	0.0	8.6	0.5	8.06	1.94	1.40	6.66	0	0
E2	110.9	7.8	103.2	44.3	31.7	71.4	1.2	5.5	0.3	5.16	2.22	1.59	3.57	0.06	0.0009
E3	248.1	11.1	229.4	103.1	199.0	30.4	0.0	12.4	0.5	11.47	5.15	9.95	1.52	0.00	0
E4	214.6	7.8	208.8	142.7	124.9	83.8	1.2	10.7	0.3	10.44	7.14	6.25	4.19	0.06	0.0009
E5	120.5	38.6	81.4	29.5	11.5	69.8	0.0	6.0	1.9	4.07	1.48	0.58	3.49	0.00	0
E6	107.0	23.6	84.6	29.4	83.3	1.3	0.0	5.5	1.2	4.23	1.47	4.16	0.07	0.00	0
E7	195.3	38.6	120.1	120.1	18.4	101.7	2.3	9.7	1.2	6.01	6.01	0.92	5.09	0.12	0.0019
E8	235.0	23.6	145.5	150.9	49.2	96.3	3.1	11.7	1.2	7.28	7.55	2.46	4.82	0.16	0.0025

Tabla c3. Balance de materia para atrazina. Diseño de experimentos 2³ completamente al azar. Réplica 1.

Experimento	Inicial		Consumida		Final
	t=0		t=7 días		W [mg]
	W [mg]	n [mmol]	n [mmol]	W [mg]	
E1	1.8	0.008365	0.002054	0.442	1.357
E2	1.9	0.00883	0.004658	1.004	0.895
E3	1.7	0.0079	0.000624	0.134	1.565
E4	1.7	0.0079	0.005483	1.182	0.517
E5	1.9	0.00883	0.001711	0.369	1.530
E6	1.7	0.0079	0.002227	0.480	1.219
E7	1.9	0.00883	0.005601	1.207	0.692
E8	1.7	0.0079	0.006217	1.340	0.359

Tabla c4. Estimación de las medias marginales e intervalos de confianza de porcentaje de degradación de atrazina. Influencia de la temperatura. Variable dependiente: Degradación (%).

Temperatura (°C)	Media	Error típ.	Intervalo de confianza 99%	
			Límite inferior	Límite superior
28	39.913	.411	38.533	41.293
40	46.349	.411	44.969	47.729

Tabla c5. Estimación de las medias marginales e intervalos de confianza de porcentaje de degradación de atrazina. Influencia de la humedad. Variable dependiente: Degradación (%).

Humedad (%GM)	Media	Error típ.	Intervalo de confianza 99%	
			Límite inferior	Límite superior
70	29.404	.411	28.024	30.784
80	56.858	.411	55.478	58.237

Tabla c6. Estimación de las medias marginales e intervalos de confianza de porcentaje de degradación de atrazina. Influencia de la cantidad de residuos de nopal. Variable dependiente: Degradación (%).

Residuos (% W)	Media	Error típ.	Intervalo de confianza 99%	
			Límite inferior	Límite superior
5	32.134	.411	30.754	33.514
10	54.127	.411	52.747	55.507

Tabla c7. Estimación de las medias marginales e intervalos de confianza de porcentaje de degradación de atrazina. Efecto de la interacción entre cantidad de residuos y Temperatura.

Residuos (%W)	Temperatura (°C)	Media	Error típ.	Intervalo de confianza 99%	
				Límite inferior	Límite superior
5	28°C	40.890	.582	38.938	42.841
	40°C	23.379	.582	21.427	25.331
10	28°C	38.936	.582	36.985	40.888
	40°C	69.318	.582	67.367	71.270

Tabla c8. Estimación de las medias marginales e intervalos de confianza de porcentaje de degradación de atrazina. Efecto de la interacción entre Humedad y cantidad de residuos.

Humedad (%GM)	Residuos (%W)	Media	Error típ.	Intervalo de confianza 99%	
				Límite inferior	Límite superior
70%	5 (%W)	23.064	.582	21.112	25.015
	10 (%W)	35.744	.582	33.793	37.696
80%	5 (%W)	41.205	.582	39.253	43.156
	10 (%W)	72.510	.582	70.559	74.462

Apéndice D

Tabla d1. Balance de materia para la biomasa. Cinética de biodegradación de atrazina.

tiempo (días)	C _{biom.} [ppm]	W _{biom} [mg]			n _{biom} [mmol]		
	Total	TOTAL	RESIDUOS	ATRAZINA	TOTAL	RESIDUOS	ATRAZINA
0	12.9	0.064	0	0	0.002	0	0
1	15.4	0.077	0.061	0.015	0.002	0.00191	0.00048
2	16.9	0.084	0.067	0.016	0.003	0.00210	0.00052
3	25.9	0.129	0.101	0.027	0.004	0.00315	0.00086
4	42.5	0.212	0.170	0.042	0.006	0.00527	0.00130
5	52.4	0.261	0.206	0.055	0.008	0.00639	0.001713
6	63.3	0.316	0.253	0.063	0.009	0.00784	0.00196
7	64.1	0.320	0.256	0.064	0.010	0.00794	0.00198

Tabla d2. Balance de materia para el amoníaco. Cinética de biodegradación de atrazina.

tiempo (días)	C _{NH3/total} [ppm]	C _{NH3/consumido} [ppm]	C _{NH3/Formado} [ppm]	W _{NH3/formado} [mg]	n _{NH3/formado} [mmol]
0	21.58898	0	0	0	0
1	21.38799	3.426955	1.417084	0.070854	0.001169
2	19.51491	22.90162	2.160973	0.108049	0.001783
3	17.57813	41.98377	1.875345	0.093767	0.001547
4	15.68074	60.57373	1.491397	0.07457	0.001231
5	14.71967	70.01219	1.319144	0.065957	0.001088
6	13.76155	79.30432	1.030087	0.051504	0.00085
7	13.39803	83.05558	1.146129	0.057306	0.000946

Tabla d3. Balance de materia para atrazina. Cinética de biodegradación de atrazina.

tiempo (días)	Atrazina consumida				Atrazina en el sistema.		
	biomasa	NH ₃	total		total		
	mmol	mmol	mmol	mg	[mg]	[mmol]	C [ppm]
0	0	0	0	0	1.7	0.0079	340
1	0.00048	0.00117	0.00318	0.687	1.012	0.00470	202.5
2	0.00052	0.00178	0.00444	0.958	0.741	0.00344	148.2
3	0.00086	0.00154	0.00466	1.006	0.693	0.00322	138.6
4	0.00130	0.00123	0.00494	1.067	0.632	0.00294	126.5
5	0.00171	0.00108	0.00549	1.185	0.514	0.00238	102.8
6	0.00196	0.00085	0.00555	1.198	0.501	0.00233	100.3
7	0.00198	0.00094	0.00577	1.244	0.455	0.00211	91.0

Código de Matlab para la estimación de los parámetros cinéticos de degradación de atrazina en estado sólido por actividad enzimática de *Aspergillus niger*.

```
clc
clear
format shortG, format compact

DATA_B

DATA = DATA1;

xdata = DATA(:,1);
ydata(1,:) = DATA(:,2);
ydata(2,:) = DATA(:,3);

lb = [0.001 0.001 1 0.0001]; ub = [0.7 0.2 4.44 1];
%
% Create a simple exponential decay model.
% defined as myfun + odefcn
%%
% Fit the model using the starting point |b0|

umax=0.071;
Y=0.2;
ks=4.35;
kd=0.005;

b0 =[umax Y ks kd];
[b1,resnorm,residual,exitflag,output] =
lsqcurvefit(@myfun,b0,xdata,ydata,lb,ub)

[x_p1,y_p1] = ode45(@(x,y) odefcn(x,y,b1), [xdata(1) xdata(end)],
ydata(:,1));

figure
hold on
plot(x_p1,y_p1)

plot(xdata,ydata,'MarkerSize',15,'Marker','.','LineStyle','none')

legend('ATRAZINA_t','BIOMASA_t','ATRAZINA_e','BIOMASA_e')

%title('Data and Fitted Curve')
xlabel('Tiempo (días)')
ylabel('Concentración (ppm)')
grid on, grid minor

function F = myfun( b, xdata)

DATA_B
y=1;
```

```

X=DATA1(:,2)';
F = zeros(2,length(xdata));

for i = 1 : length(xdata)

    if xdata(i) == xdata(1)
        F(:,1) = [340 12.8965282]';
    else
        %@(t,y) odefcn(t,y,A,B)

        [~,y_c] = ode23(@(x,y) odefcn(x,y,b),[xdata(1) xdata(i)],F(:,1));
        F(:,i) = y_c(end,:)';
    end
end
F(1,:) = y * F(1,:) + (1-y) * (X);

end

function dydx = odefcn(x,y,b)

dydx = zeros(2,1);
Xo=12.86;
So=340;
umax=b(1);
Y=b(2);
ks=b(3);
kd=b(4);
S=y(1);
X=y(2);
dydx(1,1) = -(1 / Y) * umax * (S / (S + ks)) * X ; %Antrazina (S)

dydx(2,1) = umax * (S / (S + ks)) * X - (kd * X) ; %Biomasa (X)

end

```

Apéndice E

Tabla e1. Cuantificación de carbohidratos reductores. Diseño de experimentos 2^3 completamente al azar.

C_{CR}

t=0	t=7 días	Consumidos	
[ppm]	[ppm]	[mg/mL]	[ppm]
182.5	67.4	0.115	115.1
141.1	79.4	0.0617	61.7
317.8	83.3	0.234	234.5
306.5	110.2	0.196	196.3
157.1	54.8	0.102	102.3
145.3	55.0	0.0902	90.3
335.5	108.3	0.227	227.1
362.3	53.1	0.309	309.2