UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE BIOLOGÍA

COMPETENCIAS DECOLORATIVAS DE CINCO AISLADOS FÚNGICOS OBTENIDOS DE AGUA RESIDUAL TEXTIL

TESIS

que como requisito parcial para obtener el título profesional de

BIÓLOGA

presenta

DIANA ÁVILA TREJO

U.M.S.N.H
FACULTAD DE BIOLOGÍA

Nombre del Director: M. en C. Rosenda Aguilar Aguilar
Nombre del Co-Director: M. en C. Idolina Molina León

Morelia, Michoacán **Junio de 2021**

DEDICATORIA

Esta tesis quiero dedicársela como agradecimiento a mi familia que durante este largo camino jamas han dejado de estar a mi lado, brindándome su apoyo y su amor incondicional.

En especial a mi tierna hija Quetzali, mi corazón que me impulsa a superarme todos los días.

A mi amor Juan, mi mano derecha, mi complice, mi equipo, gracias por darme tu apoyo y tu tiempo siempre.

Y a mis padres que son mi mayor ejemplo de vida y perseverancia, gracias por su amor infinito.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento

A Dios, por guiarme para realizar este proyecto tan importante en mi camino.

A mis padres Luz y Benja, ya que gracias a su apoyo incondicional hoy se ve concluida una meta más.

A mi hermano Anibal, gracias por el apoyo brindado a lo largo de toda mi vida de estudiante.

A la M. en C. Rosenda Aguilar Aguilar mi directora de tesis y profesora en la carrera, quien me ofreció todas las posibilidades para realizar este proyecto, además de su conocimiento, consejos, apoyo y confianza en todas las etapas de este largo trayecto, muchísimas gracias por todo el tiempo y disposición que me ha brindado.

A la M. en C. Idolina Molina León, por ser mi sinodal y mi profesora en la carrera y también por el tiempo que me brindó durante mi formación académica, en especial en este último trabajo.

A la Biól. María Salud Rosas Murillo y la Q.F.B. Rita Sandra Mendoza Olivares, por ser mis sinodales, gracias por su tiempo y comentarios para la mejora del trabajo.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, y la facultad de Biología, a los profesores y amigos de la misma institución.

A mi buena amiga Judith Guadarrama Cárdenas, porque gracias a la amistad, el trabajo, el apoyo y el esfuerzo logramos un triunfo más.

A la empresa textil T-ANNA, S.A. de C.V. del municipio Zinapécuaro, Michoacán por permitimos realizar el muestreo del agua residual.

A la empresa DyStar de México por la donación de colorantes.

Y sobre todo a Juan y a Quetzi, por su amor, comprensión y tiempo que me regalaron para poder terminar este proyecto tan bonito, por eso, este trabajo también les pertenece.

A todos, muchas gracias.

CONTENIDO

RESUMEN 1
ABSTRACT 2
1. INTRODUCCIÓN 3
1.1. La Industria textil en México 3
1.2. Los colorantes textiles 4
1.3. Problemáticas y propuestas de solución de los efluentes textiles 8
1.4. Procesos microbiológicos de aguas residuales 12
2. ANTECEDENTES 16
3. HIPÓTESIS 22
4. OBJETIVOS 23
Objetivo General 23
Objetivos Específicos 23
5. MATERIALES Y MÉTODOS 24
5.1. Diagrama Metodológico 24
5.2. Trabajo en campo 24
5.2.1. Muestreo y Análisis Fisicoquímicos del agua residual textil 24
5.3. Trabajo de laboratorio 28
5.3.1. Cuantificación de hongos por Unidades Formadoras de Colonias (UFC) 28
5.3.2. Aislamiento y selección de hongos 31
5.3.3. Mantenimiento y cultivo de Bjerkandera adusta y de los aislados fúngicos 31
5.3.4. Preparación de condiciones homogéneas en el crecimiento 32
5.3.5. Identificación macroscópica de decoloración del medio y coloración colonial 33
5.3.6. Descripción de la morfología microscópica y observación de procesos de biosorción o de adsorción 33
5.3.7. Cinéticas de crecimiento y pH óptimo 34
5.3.8. Cinéticas de decoloración 35
5.4. Identificación de Competencias Decolorativas 38
5.5. Análisis estadístico 39
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 40
6.1. Análisis Fisicoquímicos del agua residual textil in situ 40
6.2. Análisis Fisicoquímicos del agua residual textil en laboratorio 44
6.3. Cuantificación de hongos por Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) 49
6.4. Aislamiento y selección de hongos 51

6.5. Identificación macroscópica de decoloración del medio y coloración colonial 53
6.6. Descripción de la morfología microscópica y observación de procesos de biosorción o de adsorción 56
6.7. Cinéticas de crecimiento y pH óptimo 59
6.8. Cinéticas de crecimiento en presencia de colorantes 60
6.9. Cinéticas de decoloración en medio PDA (con nutrientes) 62
6.10. Cinéticas de decoloración en medio sin nutrientes 65
7. RESUMEN DE RESULTADOS Y PERSPECTIVAS 70
8. CONCLUSIÓN 72
9. LITERATURA CITADA 73
ANEXOS 83
Anexo 1. Preparación de medios de cultivo y colorantes utilizados. 83
Anexo 2. Curvas de calibración de los colorantes Procion en la concentración de 500 mg/L. 86
2.1. Curva de calibración de Procion Blue H-ERD a λ de 500 nm. 86
2.2. Curva de calibración de Procion Yellow H-E4R a λ de 600 nm. 86
Anexo 3. Indicadores de calidad del agua (CONAGUA, 2015). 87
3.1. Escala de clasificación de calidad de agua superficial con base en la Demanda Bioquímica de Oxígeno a cinco días (DBO_5) 87
3.2. Escala de clasificación de calidad del agua superficial con base en la Demanda Química de Oxígeno (DQO) 88
3.3. Escala de clasificación de calidad del agua superficial con base en los sólidos suspendidos totales (SST). 89
3.4. Escala de clasificación de calidad del agua superficial con base en los coliformes fecales (CF). 90
Anexo 4. Imágenes 91
4.1. Coloración colonial de los cinco aislados fúngicos: a) AGA2, b) AGA3, c) AGA10, d) AGA11, e) AGA29, y de la cepa f) B. adusta, en medio PDA sin colorante. 91
4.2. Microscopía óptica 100X de los cinco aislados fúngicos y de la cepa B. adusta en el día 7 de incubación en medio PDA con la concentración 500 mg/L de los colorantes Procion Blue H-ERD y Procion Yellow H-E4R 92
4.3. Crecimiento de los cinco aislados fúngicos y B. adusta en el medio PDA con la concentración 500 mg/L del colorante Procion Blue H-ERD. 93
4.4. Crecimiento de los cinco aislados fúngicos y B. adusta en el medio PDA con la concentración 500 mg/L del colorante Procion Yellow H-E4R 94
4.5. Comparación del halo de decoloración a los 25 días de los aislados fúngicos: a) AGA2, b) AGA3, c) AGA10, d) AGA11, e) AGA29, y la cepa f) B. adusta, en medio sin

fuente nutricional compleja (izquierda) y en medio con fuente nutricional compleja (derecha), en la concentración 500 mg/L del colorante Procion Blue H-ERD. 95

4.6. Comparación del halo de decoloración entre el aislado AGA10 y la cepa B. adusta en medio sin fuente nutricional compleja (S) y en medio con fuente nutricional compleja (C), en la concentración 500 mg/L de los colorantes Procion Blue H-ERD y Procion Yellow H-E4R. 96

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de colorantes de acuerdo al método de aplicación. Tomado de Zaruma *et al*. (2018). En fondo gris se resalta el tipo de colorante utilizado para este trabajo. 5
Cuadro 2. Principales características y funcionamiento de las enzimas ligninolíticas en hongos. 15
Cuadro 3. Normas mexicanas para la determinación de los parámetros en laboratorio. 28
Cuadro 4. Parámetros fisicoquímicos *in situ* (fondo gris) y analizados en el Laboratorio CEMA (fondo blanco) de la salida directa del agua residual (S1) y del estanque de tierra almacenador (E2). 43
Cuadro 5. Morfología colonial a las 72 horas y características representativas de los 30 aislados fúngicos, obtenidos en los dos sitios de muestreo, y *B. adusta*. En fondo gris se resaltan los cinco aislados fúngicos seleccionados para el presente trabajo. 52
Cuadro 6. Resumen de las capacidades decolorativas de *Procion Blue* por parte de los hongos usados en este estudio. Se comparan los resultados de un medio con nutrientes (PDA), con un medio sin nutrientes (Agar Bacteriológico) y Agua. 67
Cuadro 7. Resumen de las capacidades decolorativas de *Procion Yellow* por parte de los hongos usados en este estudio. Se comparan los resultados de un medio con nutrientes (PDA), con un medio sin nutrientes (Agar Bacteriológico) y Agua. 69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. a) Representación esquemática de las partes de un colorante, b) Estructura química y ejemplificación de partes de un colorante en la molécula del colorante *Procion Blue H-ERD* y c) Estructura química y ejemplificación de partes de un colorante en la molécula *Procion Yellow H-E4R*. 7
Figura 2. Estructura química de la fibra de celulosa. Los grupos alcohol remarcados en rojo permiten la unión al auxócromo triazina en color amarillo (elaboración propia). 8
Figura 3. Ubicación del sitio de muestreo en la ciudad de Zinapécuaro de Figueroa en el Municipio de Zinapécuaro, Michoacán. 25
Figura 4. Sitios de muestreo en la empresa textil T-ANNA.a) Salida directa del agua residual (S1); b) Estanque de tierra donde se diluye el agua residual (E2). 26
Figura 5. Diseño experimental para estimar las Unidades Formadoras de Colonias. a) Diluciones en serie inoculadas en el área correspondiente de dos cajas Petri divididas en 3 secciones para albergar a las 6 diluciones seriadas. b) Tratamientos empleados de los colorantes *Procion Blue* y *Procion Yellow* para cada sitio de muestreo (S1 y E2). 30
Figura 6. Diseño experimental para evaluar la decoloración de los colorantes *Procion Yellow* y *Procion Blue* en medio líquido, de la cepa *Bjerkandera adusta* y el aislado fúngico AGA10. El punto en cada matraz representa el inóculo que fue sembrado del aislado AGA10 y de la cepa *B. adusta*. 37
Figura 7. Comparación de las UFC de hongos obtenidos en los dos sitios de muestreo en medio sin colorante (control) y con colorantes *Procion Blue* y *Procion Yellow*. 50
Figura 8. Cambio de coloración colonial y decoloración de los aislados fúngicos y *B. adusta* en medio sólido PDA con colorante *Procion Yellow* y *Procion Blue* en concentración de 500 mg/L. Los medios círculos representan la colonia y el reborde punteado la presencia

de decoloración. Entre corchetes se anota la relación cualitativa entre [CAMBIO DE COLOR EN LA COLONIA/DECOLORACIÓN DEL MEDIO]. 54
Figura 9. Características microscópicas de los aislados fúngicos AGA2, AGA3, AGA10, AGA11, AGA29 y la cepa *Bjerkandera adusta.* Morfología de hifas y esporas. 57
Figura 10. Cinéticas de crecimiento en medio sólido PDA de los aislados fúngicos y *B*. *adusta* con pH óptimo de 5.91. 60
Figura 11. Cinéticas de crecimiento en medio sólido PDA con colorante *Procion Blue H-ERD* de los aislados fúngicos y *B*. *adusta* con pH óptimo de 5.91. 61
Figura 12. Cinéticas de crecimiento en medio sólido PDA con colorante *Procion Yellow H-E4R* de los aislados fúngicos y *B*. *adusta* con pH óptimo de 5.91. 62
Figura 13. Cinéticas de decoloración en medio sólido PDA con colorante *Procion Blue H-ERD* de los aislados fúngicos y *B*. *adusta*. 63
Figura 14. Cinéticas de decoloración en medio sólido PDA con colorante *Procion Yellow H-E4R* de los aislados fúngicos y *B*. *adusta*. 65

RESUMEN

La necesidad de abordar de manera responsable el tema de la contaminación ambiental causada por la tinción de textiles, impulsó la presente investigación. El trabajo se llevó a cabo con insumos (colorantes y muestras de agua residual) provenientes de la empresa T-ANNA localizada en Zinapécuaro, Michoacán, México.

De forma amplia el estudio buscó conocer la posibilidad de que en el entorno ambiental de la empresa existieran hongos con capacidades decolorativas altas que pudieran ser empleados en alguna estrategia de manejo biológico de aguas residuales; para poder llevar a cabo la comparación se utilizó a el hongo *Bjerkandera adusta*, conocido por su alta capacidad degradativa.

Los resultados mostraron que en el entorno pueden encontrarse hongos que discriminan en su respuesta decolorativa dependiendo del colorante que enfrentan. Además, algunos fueron capaces solo de adsorber el colorante, mientras que solo uno de los seleccionados pudo adsorber y decolorar el medio de cultivo. Al compararse los resultados respecto a *Bjerkandera adusta*, solo un aislado fúngico (AGA10) mostró un porcentaje de decoloración, una velocidad de decoloración y una capacidad de decoloración, potenciales para ser usado en manejo biológico de aguas residuales.

Por último, se reporta por pimera vez la capacidad de la especie *B*. *adusta* para decolorar el colorante *Procion Blue H-ERD*.

Palabras clave: Adsorción; Agua residual textil; Biosorción; *Bjerkandera adusta*; Colorante reactivo azo.

ABSTRACT

Environmental contamination caused by textile dye was the principal aim which impulse this research responsible. The research was carried out using inputs (colorants and residual water samples) from the T-ANNA company located in Zinapécuaro, Michoacán, México.

Broadly, the study explored the possibility that in the environmental surroundings of the company there were fungi with high decolorization capacities that could be used in some biological wastewater management strategy. The fungus *Bjerkandera adusta*, known for its high degradative capacity, was used for comparison.

Results show that fungi can be found in the environment and they discriminate in their decolorization response depending on the type of dye. Furthermore, some fungi were only able to adsorb the dye, while only one was able to adsorb and decoloring the culture medium. Comparing the results with *Bjerkandera adusta*, only one fungal isolate (AGA10) showed a percentage of discoloration, a rate of decolorization, and a decolorization capacity, with the potential to be used in biological wastewater management.

Finally, the ability of the specie *B*. *adusta* to decolorize the *Procion Blue H-ERD* dye is reported for the first time.

Keywords: Adsorption; Biosorption; *Bjerkandera adusta*; Reactive azo dye; Textile wastewater.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La Industria textil en México

En México la industria textil es de gran relevancia ya que representa el 40.3% del Producto Interno Bruto (PIB) de las industrias manufactureras; en 2018 empleó a 208 mil trabajadores y en el año 2019 ocupó la décima posición entre las actividades económicas más importantes; la mayoría de los insumos requeridos por esta industria, son de origen nacional con una baja dependencia de insumos importados (INEGI, 2020).

Este sector ha estado en constante avance y crecimiento, para dar respuesta a la enorme demanda de la sociedad nacional e internacional (Flores, 2004). Por lo anterior, han surgido gran diversidad de fibras y combinaciones entre ellas. Los requisitos de manufactura en cada caso aunado a la constante variación de la demanda ejercida por los mercados, hacen del sector textil un sector dinámico, de gran interés, pero también de gran complejidad (UNEP *et al*, 2002).

Entre la gran variedad de actividades que abarca la industria textil se encuentran el estampado, los acabados y la tintura. Todos ejercen efectos significativos sobre el medio ambiente, tanto a nivel de consumo de recursos (principalmente agua), como de generación de contaminación (aguas residuales) (UNEP *et al*., 2002).

El aumento de estas actividades en la industria textil, conllevan al incremento de uso de los colorantes, al igual que la demanda de agua utilizada, ya que el proceso de fijación de los tintes en las telas se da en medio acuoso.

Es muy importante recalcar que durante el proceso de teñido en la industria textil se requieren aproximadamente 200 L de agua para producir 1 kg de fibra teñida. De ese total, 32 L (16%) son utilizados directamente para el paso del teñido (Ghaly *et al*., 2014). Considerando que los colorantes reactivos se impregnan en las fibras de celulosa con un grado de fijación entre 50% y 90% (Zaruma *et al*., 2018), entonces, entre el 10% y 50% del tinte se descargará en los efluentes textiles, los cuales contienen entre 300 mg/L y 500 mg/L de colorante (Hessel *et al.,* 2007).

Por este motivo, los efluentes que conducen este tipo de sustancias deben ser tratados de manera adecuada antes de ser descargados al ambiente, de lo contrario se estarán afectando directamente a los ecosistemas y, principalmente, a los cuerpos de agua.

Considerando lo anterior, cabe resaltar que uno de los retos más importantes que enfrentan las empresas del sector textil corresponde a fomentar el crecimiento de su producción pero sin afectar de manera considerable el entorno ambiental.

Por tanto, el reto consistirá en manejar adecuadamente las aguas residuales que entre otros contaminantes pueden contener los siguientes: fibras sintéticas o naturales previamente procesadas; electrolitos, como carbonato de sodio (Na_2CO_3) y cloruro de sodio (NaCl); tintes reactivos hidrolizados que no se fijan en las fibras, y son responsables de la coloración del agua; auxiliares de tintura, que actúan con los anteriores facilitando la penetración del colorante, los cuales son sustancias orgánicas difíciles de reciclar y que son los responsables del alto nivel de DBO_5 y DQO de los efluentes (Patarroyo-Hernández, 2013).

Dentro de ese listado, de forma particular, los colorantes textiles que contaminan, representan el motor que ha guiado la presente investigación.

1.2. Los colorantes textiles

Los tintes o colorantes utilizados para el teñido de la tela, son sustancias orgánicas que imparten color a un sustrato por medio de una absorción selectiva de luz (Moeller y Garzón 2003); su estructura básica se compone por dos elementos fundamentales: un grupo cromóforo y un grupo auxócromo, fusionados por grupos químicos de unión (Bansal y Sud, 2011 y 2012).

El grupo cromóforo determina el matiz del colorante y generalmente va unido a sustituyentes como sulfonatos de sodio ($-SO_3Na$) que facilitan la solubilización en agua; por su parte, el grupo auxócromo o grupo reactivo, es la parte de la molécula que se une a la fibra y determina la estabilidad del colorante en el textil (Bansal y Sud, 2011 y 2012).

De acuerdo a Garzón (2009) y Zaruma *et al*. (2018), los colorantes textiles se pueden clasificar con base a su aplicación a la fibra, lo cual está en función de las condiciones en las que se efectúa el proceso de tintura. Desde esta perspectiva y como puede observarse en el Cuadro 1, existen colorantes ácidos, básicos, directos, dispersos, con mordente, a la tina, y reactivos.

Cuadro 1. Clasificación de colorantes de acuerdo al método de aplicación. Tomado de Zaruma *et al*. (2018). En fondo gris se resalta el tipo de colorante utilizado para este trabajo.

Tipo	Fibras	Método de aplicación	Grupos cromóforos
Ácidos	Nylon, lana, seda, papel, tintas y piel	Normalmente para baños de tinte neutros a ácidos	Azo, antraquinona, trifenilmetano, nitro y nitroso
Básicos	Papel, poliacrilonitrilos, nylon, poliéster y seda	Para baños de tintura básicos	Azo, trimetilmetano, antraquinona
Directos	Algodón, rayón, piel y nylon	Inmersión de la fibra en un baño con un electrolito. Forma enlaces de hidrógeno.	Azo
Dispersos	Poliéster, poliamida, acetato, acrílico y plásticos	En forma de presión coloidal con altas temperaturas y presión. Unión del colorante por interacciones dipolares	Azo, antraquinona y nitro
Con mordente	Lana, piel y algodón	Aplicado en conjunto con sales de Cr	Azo y antraquinona
Reactivos	**Algodón, lana, seda y nylon**	**Los grupos reactivos del colorante reaccionan con los grupos funcionales de la fibra para enlazarse covalentemente bajo la influencia de la temperatura y el pH.**	**Azo,** antraquinona
A la tina	Algodón, rayón y lana	Reducción con hidrosulfito de sodio, después de la impregnación se oxida	Antraquinona e índigos

De los tipos anteriores, son los colorantes reactivos los de mayor demanda, con un 60% de uso en esta industria. Se caracterizan por tener grupos antraquinona, ftalocianina y/o grupos azo, y por fijarse a la fibra de algodón a través del grupo auxócromo; los grupos hidroxilo de la celulosa crean un enlace éter que garantiza mayor duración del color (Garzón, 2009; Aragón-Vallenas, 2012).

Por su parte, la característica principal de los colorantes azóicos es que poseen uno o varios grupos azo en su estructura química, este grupo se caracteriza por un doble

enlace Nitrógeno-Nitrógeno y cada uno se encuentra unido a un radical (grupo R) que en muchas de las ocasiones corresponde a compuestos aromáticos (R-N=N-R') (Walters *et al.,* 2005).

Dentro de la categoría de colorantes reactivos con grupo azoico se encuentran los colorantes *Procion Blue H-ERD* y *Procion Yellow H-E4R*. Son de relevancia para este trabajo ya que fueron empleados en la parte experimental del mismo. En la Figura 1 se muestra un esquema representativo y se ilustran el grupo auxócromo, el grupo de unión y el grupo cromóforo, usando como modelo los colorantes *Procion.*

Puede observarse que el colorante *Procion Blue H-ERD* (Figura 1b), presenta dos grupos auxócromos de monoclorotriazina, los cuáles participarán en una reacción de sustitución del cloro por los grupos alcohol de la fibra textil de celulosa, y la consiguiente formación de enlaces covalentes entre el colorante y la fibra textil; es notorio también que el colorante posee dos grupos azo como cromóforos y múltiples grupos sulfonatos que facilitan su solubilización en agua durante el proceso de teñido.

Por otra parte, la estructura química del colorante *Procion Yellow H-E4R*, posee un grupo auxócromo de monoclorotriazina, además de un grupo azo como cromóforo y múltiples grupos sulfonatos (Figura 1c).

Para ambos casos debe subrayarse que son ampliamente usados debido a que el grupo triazina resiste la decoloración inducida por la luz (Bansal y Sud, 2011 y 2012).

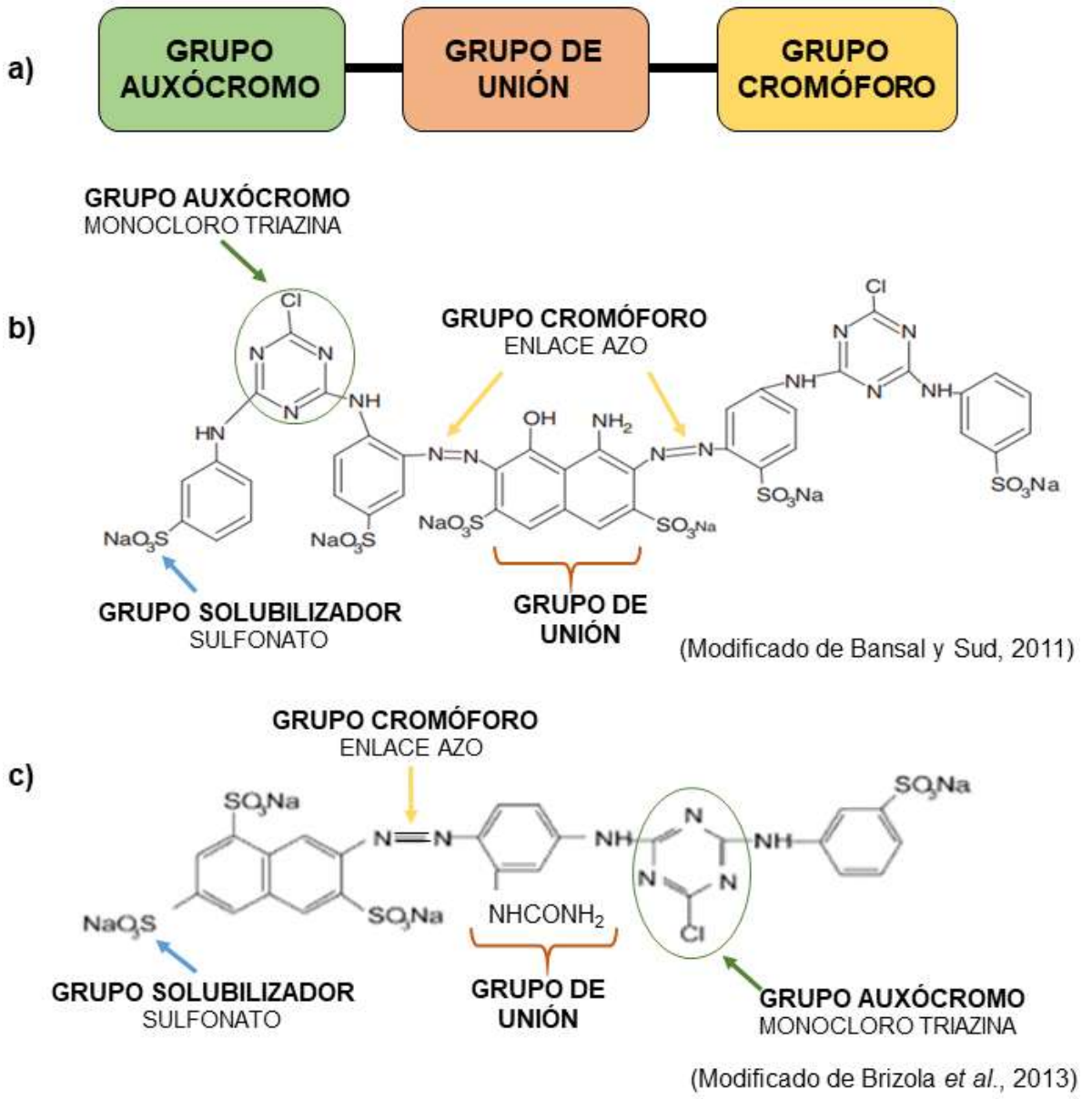


Figura 1. a) Representación esquemática de las partes de un colorante, b) Estructura química y ejemplificación de partes de un colorante en la molécula del colorante *Procion Blue H-ERD* y c) Estructura química y ejemplificación de partes de un colorante en la molécula *Procion Yellow H-E4R*.

En relación a la forma de unión, cuando el grupo auxócromo se une a una fibra textil como el algodón, la cual está formada por fibras de celulosa, lo hace a través de los grupos hidroxilo que sobresalen de las cadenas del polímero; en la Figura 2, se representa la organización de la celulosa y se pueden apreciar las largas microfibrillas

formadas por las unidades de β-D-glucosa, las cuáles forman la estructura de una fibra de celulosa.

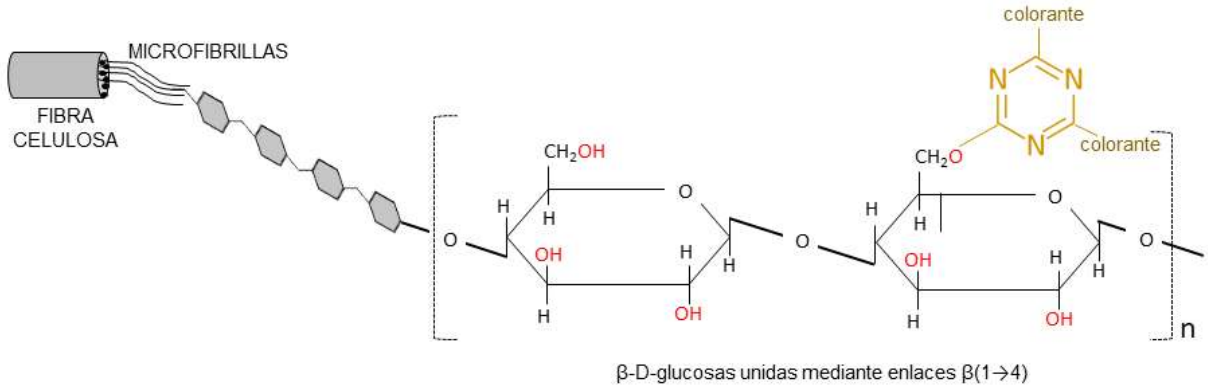


Figura 2. Estructura química de la fibra de celulosa. Los grupos alcohol remarcados en rojo permiten la unión al auxócromo triazina en color amarillo (elaboración propia).

1.3. Problemáticas y propuestas de solución de los efluentes textiles

Los efluentes textiles son una de las aguas residuales más difíciles de tratar, ya que contienen residuos que provocan altos parámetros de: Demanda Bioquímica de Oxígeno que va de 80-500 mg/L y Demanda Química de Oxígeno que va de 150-250 mg/L; cantidades de colorante que va de 300-500 mg/L; sólidos suspendidos de 30-400 mg/L; grandes fluctuaciones de pH (5-12) y una temperatura muy variable (Neamtu *et al*., 2002; Hessel *et al*., 2007; Solís *et al.*, 2012).

Estos desechos industriales con un alto grado de color, poseen un gran poder de bioacumulación y una baja velocidad de degradación, de forma que a largo plazo se acumulan en cuerpos de agua como lagos y bahías, ocasionando una disminución significativa de la incidencia de los rayos solares debido a que actúan como grupos que absorben la luz visible. La consecuencia de lo anterior es la disminución de la actividad fotosintética de algas y cianobacterias, y la disminución del oxígeno disuelto en el agua, los cuáles producen daños y alteraciones finales a la flora y fauna acuáticas (Rodríguez *et al*., 2006; Neamtu *et al*., 2002).

Asimismo, estas descargas favorecen procesos de eutrofización, ya que presentan un alto contenido de nitrógeno, el cual es un nutriente que aumenta la población de algas y peces; cuando esto ocurre, se detona un crecimiento acelerado de algas que despoja a los peces del oxígeno disponible en el entorno acuático. De forma resumida, un incremento en la carga orgánica reducirá la concentración de oxígeno molecular en el agua promoviendo la modificación de las condiciones de ese ecosistema (Mancilla *et al*., 2009; Aranda, 2004).

Adicionalmente, existen investigaciones que señalan la posible toxicidad y carcinogenicidad de ciertos colorantes (Banat *et al.,* 1996). Se ha demostrado que los compuestos azo y nitro (-NO_2), encontrados en algunos tintes textiles, pueden reducirse en los sedimentos acuáticos dando como resultado la producción de aminas tóxicas (Weber y Wolfe, 1987); esto se debe, principalmente al hecho de que muchos colorantes están hechos de carcinógenos conocidos, como la bencidina y otros compuestos aromáticos, los cuales pueden modificarse químicamente como resultado del metabolismo microbiano (Anliker *et al.,* 1981).

Otros tintes con efectos adversos para cuerpos de agua receptores, son los colorantes textiles a base de antraquinona, ya que debido a sus estructuras aromáticas fusionadas (útiles para impartir color durante largos períodos de tiempo) resultan más resistentes a la degradación. En el caso de los tintes complejos a base de cromo, las modificaciones químicas que sufren podrían liberar este metal, de naturaleza cancerígena, en los suministros de agua (Banat *et al.,* 1996); debe hacerse notar que también se han reportado altas concentraciones de metales pesados (plomo, arsénico, cromo y cobre) en algas y plantas acuáticas que han sido expuestas a dichos efluentes (Roy *et al*., 2018). También se ha demostrado que algunos tintes reactivos, como *rojo reactivo* RB, *negro reactivo* B y *azul reactivo,* muestran una tendencia a bioacumularse (Çetin y Dönmez, 2006).

Indudablemente que una solución a los efluentes textiles son las plantas de tratamiento, sin embargo, de acuerdo a Alatorre y Moeller (2006), las plantas convencionales solo remueven un bajo porcentaje de los múltiples colorantes

sintetizados por el hombre y consecuentemente gran cantidad de ellos son vertidos sin un tratamiento previo.

La problemática de contaminación descrita en las líneas anteriores ha promovido el desarrollo de una gran variedad de procesos para el tratamiento de las aguas residuales que provienen de la industria textil. Se trata de una variedad de técnicas y métodos que pueden clasificarse en Fisicoquímicos y en Biológicos.

En relación a los primeros, a continuación se enumeran y después se describen algunas de sus características particulares: 1) membranas de filtración; 2) coagulación; 3) destrucción electroquímica; 4) intercambio iónico; 5) degradación fotoquímica; 6) oxidación química; y 7) adsorción (Miranda, 2009).

1) En el método de membranas de filtración, se hace circular el agua residual a presión, a lo largo de una membrana no porosa, de esta forma se separan por completo las moléculas de agua de los contaminantes disueltos en ella. Este método, por lo general, se utiliza para remover bajas concentraciones de colorantes; sin embargo, sus costos son altos (Sans *et al*., 1989).
2) En la coagulación se utilizan agentes floculantes, como sulfato ferroso, que permite la agregación de los colorantes, logrando su eliminación por medio de la sedimentación del complejo sulfato ferroso-colorante. Este proceso remueve eficientemente sólidos suspendidos en los efluentes industriales, en un corto periodo de tiempo y con bajos costos; sin embargo, genera una gran cantidad de lodos, y presenta resultados pobres en la remoción de colorantes ácidos (Sans *et al*., 1989).
3) La destrucción electroquímica, consiste en la oxidación por medio del paso de corriente eléctrica entre dos electrodos a través de una solución, lo cual propicia un intercambio de electrones. Es un método muy eficiente en la degradación de colorantes, ya que no produce subproductos tóxicos ni lodos residuales, sin embargo, la electricidad hace que sea un proceso costoso (Pelegrini *et al*., 1999; Palma-Goyes *et al.*, 2015).
4) En el intercambio iónico, el agua a tratar se hace pasar por un intercambiador catiónico, donde los cationes disueltos sustituyen a los iones hidronio en la

columna, después el agua pasa a un intercambiador aniónico, en donde los aniones disueltos sustituyen a los iones hidroxilo de la resina. Este método es exclusivo para colorantes catiónicos o aniónicos; además, utiliza solventes muy costosos ya que implica el uso de columnas altamente específicas para cada colorante (Sans *et al*., 1989).

5) La degradación fotoquímica, se lleva a cabo por medio de dióxido de carbono (CO_2) u óxido de titanio (TiO_2) disueltos en agua y por la exposición a luz ultravioleta, que da como resultado una mineralización total de la mayor parte de los contaminantes orgánicos, sin generar lodos residuales; sin embargo, forma subproductos tóxicos, presenta altos costos y es eficiente si la concentración de colorantes es baja (Guillard *et al*., 2003).
6) La oxidación química, se basa en el rompimiento de los anillos aromáticos que componen a los colorantes por medio de un agente oxidante; por ejemplo, el reactivo de Fenton, es una mezcla de ion ferroso (Fe^{2+}) y peróxido de hidrogeno, que produce un radical libre hidroxilo (•OH) y el ion férrico (Fe^{3+}); el radical hidroxilo realiza la oxidación no especifica de muchos compuestos orgánicos, pudiendo llegar a una completa mineralización en tiempos de reacción muy cortos; sin embargo, este reactivo genera grandes cantidades de lodos residuales (Arroyave *et al*., 2008).
7) La adsorción, es el proceso mediante el cual los iones y las moléculas presentes en una fase (adsorbato), tienden a condensarse y concentrarse sobre la superficie de otra fase (adsorbente). Existen tres tipos: la adsorción física se debe a fuerzas de Van der Waals, la adsorción química sucede por enlaces covalentes, y la adsorción de intercambio ocurre por atracciones electrostáticas (Sawyer *et al*., 2001). La ventaja de este proceso es que remueve eficientemente muchos de los colorantes presentes en el agua residual, no obstante genera una gran cantidad de residuos orgánicos (Cortázar-Martínez *et al*., 2012).

Los procesos fisicoquímicos producen efluentes de buena calidad, pero en la mayoría de las ocasiones generan altos costos, y pueden originar subproductos de mayor toxicidad. Por lo anterior, los procesos biológicos han sido ampliamente estudiados a

efecto de explorar estrategias más efectivas a través del empleo de microorganismos (Robinson *et al*., 2001; Garzón, 2009).

1.4. Procesos microbiológicos de aguas residuales

Los procesos microbiológicos se refieren al uso de algún microorganismo, como un hongo o una bacteria, con objeto de eliminar el color o biodegradar las moléculas de colorantes, presentes en las aguas residuales provenientes de la industria textil.

Se ha determinado que el nivel de aeración es determinante para el manejo de este tipo de procesos biológicos. Por ejemplo, en el caso de los colorantes azoicos *violeta brillante remazol 5R* y negro *remazol B,* Lourenço *et al* (2000, 2001), reportaron la formación de aminas aromáticas después de una reducción anaeróbica; es decir, aunque este paso eliminó el color del tinte, no fue capaz de anular el peligro de la presencia de las aminas aromáticas carcinogénicas.

Otros estudios como el de Supaka *et al* (2004), ha sugerido que para los casos de los colorantes *naranja brillante remazol 3R*, *negro remazol B* y *violeta brillante remazol 5R*, las aminas aromáticas que se producen después de una reducción anaeróbica podrían ser degradadas bajo condiciones aerobias; sin embargo, ellos mismos sugieren una investigación más profunda al respecto.

Por otra parte, los mecanismos biológicos por los cuáles pueden darse estos procesos microbianos han sido clasificados en: 1) adsorción; 2) biosorción; 3) degradación enzimática (Cortazar-Martínez *et al*., 2012; Wu *et al.*, 2012). A continuación se detallan estos procesos:

1) La **adsorción o bioadsorción** es un proceso fisicoquímico de superficie donde una sustancia queda acumulada por el contacto con la superficie exterior de una célula; la superficie donde queda depositada la sustancia es el adsorbente, y el material concentrado o adsorbido es el adsorbato (Hidalgo, 2004; Tejada-Tovar *et al*., 2015). Cabe distinguir tres clases de adsorción según el tipo de atracción que se dé entre el adsorbato y el adsorbente: a) adsorción tipo eléctrico, la adsorción se da por intercambio iónico en el cual, los iones de una sustancia de interés se

concentran en una superficie del material adsorbente como resultado de la atracción electrostática entre ambos; b) adsorción por fuerzas de Van der Waals, la molécula adsorbida no está fija en un lugar específico de la superficie, sino más bien está libre de trasladarse dentro de la interfase; c) adsorción de naturaleza química, el adsorbato forma enlaces fuertes localizados en los centros activos del adsorbente (Tejada-Tovar *et al*., 2015). Es importante hacer notar que el proceso de adsorción se puede ver afectado de manera positiva o negativa, por ciertas variables como la temperatura, pH, la naturaleza del adsorbente, el tipo y concentración de adsorbato o simplemente por la presencia de otros iones. La bioadsorción se empezó a implementar a principios de los años noventa con el fin de remover sustancias contaminantes de las aguas residuales provenientes del sector industrial. A lo largo de esos años, las investigaciones se han centrado principalmente en la utilización de la biomasa viva y/o muerta (Tejada-Tovar *et al*., 2015). Entre las ventajas que presenta la bioadsorción se encuentra: un bajo costo, alta eficiencia, minimización de productos químicos y lodos biológicos, además, si se emplea biomasa muerta no se requieren nutrientes adicionales; a pesar de las ventajas que presenta este método, se encuentra aún en etapa de investigación, por esta razón en la actualidad no ha sido implementado a nivel industrial (Tejada-Tovar *et al*., 2015).

2) La **biosorción**, se define como la absorción o acumulación de sustancias químicas por la biomasa microbiana en el interior celular (Tsezos y Bell, 1989). Y aunque es cierto que la acumulación implica una primera etapa de adsorción, sin embargo, a ésta le sigue el transporte de las sustancias al interior de las células (Tejada-Tovar *et al*., 2015); en ese punto se dice que se biosorbió la sustancia. La capacidad de biosorción de los hongos juega un rol muy importante en la decoloración de tintes, y su efectividad depende del pH, la temperatura, la fuerza iónica, el tiempo de contacto, la concentración de adsorbente y colorante, la estructura del colorante y el tipo de microorganismo (Kaushik y Malik, 2009). En algunos casos donde se emplean células de hongos, el mecanismo de decoloración podría implicar, además de la biosorción, un proceso de degradación enzimática (Cortazar-Martínez *et al*., 2012).Este método no se ha aplicado al tratamiento de aguas

residuales en gran escala, debido a los problemas asociados con el manejo de la biomasa residual que ya contiene los colorantes adsorbidos (Cortazar-Martínez *et al*., 2012).

3) La **degradación enzimática**, consiste en la actividad metabólica de hongos o de bacterias capaces de reconocer y metabolizar ciertas partes de los compuestos coloreados. La actividad la realizan complejos enzimáticos entre los que se encuentran las lacasas y las peroxidasas. Es importante hacer notar que la actividad enzimática está dirigida naturalmente a la degradación de lignina, pero que no es altamente específica ya que afecta también a otros sustratos (como los colorantes textiles). Otra cuestión que debe tenerse en cuenta es que la actividad enzimática requiere de condiciones físicas, químicas y biológicas muy reguladas, que de no lograrse, afectarán su efectividad. Debe tenerse en cuenta que las condiciones presentes en el agua residual textil podrían no favorecer su buen desempeño (Cortazar-Martínez *et al*., 2012; Guzmán-Hernández, 2017).

Son abundantes y extensas las investigaciones al respecto de las enzimas involucradas en la actividad decolorativa. Para efectos del presente trabajo se ha sintetizado la información relevante en el Cuadro 2. Ahí se muestran tanto las características descriptivas como el mecanismo de reacción conocido para las tres enzimas más significativas de los hongos de la pudrición blanca: Manganeso Peroxidasa (MnP), Lignina Peroxidasa (LiP) y Lacasas.

Es importante recalcar que las enzimas antes mencionadas son sintetizadas por los hongos, específicamente para la degradación completa de los componentes de la madera (lignina, celulosa y hemicelulosa) durante el metabolismo secundario (Wesenberg *et al*., 2003). Eso significa que no son altamente específicas para un colorante textil, sino que el colorante es un sustrato secundario. Además, son extracelulares, es decir, se liberan al medio para degradar la lignina a compuestos útiles para su crecimiento y metabolismo (Salas *et al.*, 2012).

Dávila y Vázquez-Duhalt (2006), han expuesto que estas enzimas pueden actuar separadas o en cooperación, dependiendo de si el hongo es capaz de producir una o más.

Cuadro 2. Principales características y funcionamiento de las enzimas ligninolíticas en hongos. Elaboración propia con base en la revisión de: Ruíz-Dueñas, 1998; Wesenberg *et al*., 2003; Plaza, 2004; Zille *et al*., 2005; Dávila y Vázquez, 2006; Garzón, 2009; Jadhav y Phugare, 2012.

		MANGANESO PEROXIDASA	LIGNINA PEROXIDASA	LACASAS
DESCRIPCIÓN	Estructura	Glicoproteína, con un grupo hemo de protoporfirina que cataliza la oxidación de Mn^{+2} a Mn^{+3}	Glicoproteína, con un grupo hemo de protoporfirina	Glicoproteína del grupo oxidorreductasas multicobre que cataliza la óxido-reducción del cobre de Cu^{+2} a Cu^{+1} y viceversa
	Tipo de reacción	-Oxida compuestos fenólicos y no fenólicos del sustrato a través del complejo: Mn^{+3} enlazado a un ácido orgánico -Requiere de iones manganeso libres para su actividad -Descarboxila y desmetila	-Oxida compuestos fenólicos e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) -Abstrae electrones individuales de anillos aromáticos -Forma radicales aromáticos	-Oxida un amplio espectro de compuestos tales como ácidos húmicos, monofenoles metoxi-sustituídos, difenoles orto y para, polifenoles, aminas aromáticas, aminofenoles, anilina y compuestos heterocíclicos no fenólicos -Descarboxila y desmetila -Forma radicales libres de naturaleza inespecífica para degradar compuestos sin formar aminas aromáticas tóxicas
	Centro catalítico	El centro activo de la enzima contiene un átomo de hierro en su estado de oxidación +3	El centro activo de la enzima contiene un átomo de hierro en su estado de oxidación +3	El centro activo de la enzima contiene cuatro átomos de cobre en su estado de oxidación +2
	Cofactores*	Utiliza como cofactor el H_2O_2 para oxidar la enzima	Utiliza como cofactor el H_2O_2 para oxidar la enzima	No utiliza cofactores
	Tipo de enzima	Extracelular	Extracelular	Extracelular
MECANISMO DE REACCIÓN	Reacción en centro catalítico	El centro activo de la enzima es oxidado por H_2O_2 para formar un intermediario deficiente de un par de electrones (Fe^{+4}=O), llamado "componente I"	El centro activo de la enzima es oxidado por H_2O_2 para formar un intermediario deficiente de un par de electrones, conocido como "componente I"	El centro activo de la enzima es oxidado por oxígeno o un compuesto aromático para generar un intermediario deficiente de un par de electrones
	Intermediarios	El Mn^{+2} o sustratos fenólicos reducen el "componente I" generando el "componente II"	El "componente I" se reduce a "componente II" en presencia de sustratos fenólicos o aromáticos, debido a que gana un electrón proveniente del sustrato y genera un radical aromático	Este componente será oxidado nuevamente por oxígeno o por sustratos fenólicos, debido a la remoción de un electrón forma radicales libres
	Ciclo	El "componente II" gana un electrón de otra molécula de sustrato, y el oxígeno del oxoferril (Fe^{+4}=O) reacciona con dos átomos de hidrogeno obtenidos del sustrato para formar agua, finalmente el átomo de hierro regresa a su forma inicial (Fe^{+3}) haciendo que la enzima detenga su actividad	El ciclo se completa cuando se genera la enzima nativa, debido a una segunda reducción del "componente II" con un sustrato fenólico o aromático, que dará como resultado un compuesto fenólico o aromático oxidado y agua	El ciclo es completado gracias a cuatro oxidaciones posteriores, lo cual provoca que la enzima vuelva a su estado relajado, finalmente utiliza el oxígeno molecular como aceptor de electrones, reduciéndolo a agua

*Cofactores importantes para las enzimas LiP y MnP: manganeso, hidroperóxidos, alcohol veratrílico, oxalato, 2-cloro-1,4-dimetoxibenceno (Dávila y Vázquez, 2006).

2. ANTECEDENTES

Los Hongos de la Pudrición Blanca (HPB) constituyen el grupo más importante en la degradación de la lignina, gracias a que producen diversas enzimas ligninolíticas extracelulares con una potente capacidad oxidante que les permite acceder a la fuente de carbono limitada de dicho sustrato (Barr y Aust, 1994; Hammel, 1996; Guzmán-Hernández, 2017). Además de su importancia ecosistémica, estos organismos han sido ampliamente estudiados por su actividad enzimática sobre los colorantes textiles, razón por la cual han representado un modelo para diferentes experimentos realizados con el fin de eliminar estos contaminantes de las aguas residuales.

Lo anterior se explica de la siguiente manera. El sistema de degradación enzimático que emplean los HPB hacia la lignina, actúa también sobre los colorantes, promoviendo la decoloración de estas moléculas aromáticas policíclicas (Have *et al*., 1998; Knapp *et al*., 2001; Garzón, 2009). En un primer paso, las enzimas fúngicas inducen la formación de radicales libres, los cuáles se forman cada vez que se elimina o se agrega un electrón al estado fundamental de la sustancia química. Los radicales libres son muy reactivos y rápidamente cederán o extraerán un electrón de otra sustancia química, por lo tanto, sus reacciones producirán rupturas químicas que fracturarán a la molécula de colorante en partes más pequeñas (Barr y Aust, 1994).

La decoloración de tintes llevada a cabo por HPB fue reportada por primera vez por Glenn y Gold (1983), quienes evaluaron la decoloración de colorantes poliméricos sulfonados utilizando el hongo *Phanerochaete chrysosporium*. A partir de ese estudio se han publicado numerosos trabajos (Spadaro *et al*., 1992; Heinfling *et al.,* 1997; Cardona *et al.*, 2009) donde se ha evaluado la capacidad de decoloración de *P. chrysosporium*, siendo este el hongo más estudiado para degradar sustancias coloridas.

No obstante, existen también otros miembros de esta categoría de los HPB, capaces de degradar colorantes azóicos; entre ellos destacan: *Coriolus versicolor*, *Trametes versicolor*, *Fungalia trogii*, *Penicillium geastrivous*, *Rhizopus oryzar*, *Pleurotus*

ostreatus, *Rigidoporus lignosus*, *Pycnoporus sanguineus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* (Sudha *et al*., 2014) y *Bjerkandera adusta* (Anastasi *et al*., 2010; Guzmán-Hernández, 2017).

Particularmente el género *Bjerkandera*, resulta de interés para la presente investigación ya que será empleado como referencia o control positivo. De este hongo se sabe que una vez que actúan las enzimas MnP, LiP y lacasas, posteriormente podrían sintetizar también otras enzimas tales como cresolasas, catecol oxidasas, glioxal oxidasas, aril-alcohol oxidasas y tirosinasas, implicadas en la degradación de sustratos más sencillos. De esta forma, el hongo puede continuar el proceso de degradación hasta formar intermediarios menos complejos o bien, llegar a la mineralización completa hasta CO_2, agua, iones y ácidos orgánicos dependiendo del tipo de compuesto (Fernández-González y Henao-Jaramillo, 2007).

El estudio de las capacidades enzimáticas en hongos, ha promovido una amplia investigación, cuyos resultados se exponen a continuación.

Heinfling *et al.* (1997), analizaron la capacidad de biodegradación de los colorantes reactivos comerciales azo y ftalocianina (azo: *naranja reactivo 96*, *violeta reactivo 5* y *negro reactivo 5*; ftalocianina: *azul reactivo 15* y *azul reactivo 38*), por 18 especies fúngicas aisladas en medio sólido de agar extracto de malta. La conclusión del trabajo fue que de las 18 especies aisladas, solo las especies *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* y *B*. *adusta* eran capaces de decolorar todos los colorantes; además, concluyeron que la degradación de un tinte azo por *B. adusta* daba como resultado metabolitos no tóxicos.

En trabajos relativamente recientes, Yonni *et al*. (2008), evaluaron la capacidad de la cepa *Bjerkandera* sp. BOS55 (ATCC 90940) para la degradación de los colorantes textiles *negro directo 38* y *rojo ácido 114*, (ambos con características carcinogénicas y resistentes al ataque bacteriano), en medio nutritivo limitado de nitrógeno; también analizarón la ecotoxicidad de los colorantes por medio de la dosis letal 50 (DL_{50}) de *Artemia salina.* La conclusión de este trabajo fue que la cepa *Bjerkandera* posee la capacidad para degradar colorantes textiles resistentes al ataque bacteriano.

Cardona *et al.*(2009), analizaron siete cepas de hongos ligninolíticos, en función de su capacidad para degradar los colorantes *orange II*, *rojo cibacrón*®, *rojo erionyl*®, *azul terasil*® y *turquesa erionyl*®. La conclusión a la que llegaron fue que todos los colorantes se eliminaron completamente entre los 8 y 12 días, mostrando halos de decoloración a una velocidad entre 2 y 2.5 cm/dia, en medios de cultivo semisólidos.

Anastasi *et al*. (2010), investigaron la eficacia de decoloración de doce basidiomicetos (diez hongos de pudrición blanca, un hongo de pudrición parda y un hongo no identificado), frente a 13 tintes industriales representativos de diferentes tipos de colorantes estructurales (con cromóforos mono, di, poliazóicos, estilbenos y antraquinónicos) de importancia comercial en condiciones individuales y en medios sólidos con diferentes proporciones de C:N; también los analizaron en cuatro modelos de aguas residuales textiles; y la cepa *Bjerkandera adusta* se empaquetó en un biorreactor de lecho fijo, para el tratamiento de grandes volúmenes de un agua residual real. La conclusión del trabajo para el medio sólido fue que los hongos *B. adusta, Trametes versicolor, G. odoratum, Phlebia radiata, Pleurotus ostreatus* presentaron una capacidad de degradación prometedora, frente a diferentes tintes industriales a altas concentraciones, la cepa *B. adusta* fue capaz de decolorar por completo la mayoría de los tintes, además de desintoxicar tres aguas residuales simuladas en un tiempo muy corto (1-2 días).

Holguín *et al*. (2017), analizaron la capacidad de degradación de la especie *B. adusta*, frente a los colorantes reactivos *bezaktiv azul V-2B 133*, *bezaktiv amarillo V-5 GL, bezaktiv rojo V-5B,* pertenecientes a la familia de colorantes vinilsulfónicos, en tres medios sólidos: Kirk, Zouari-Mechichi y Park-Robinson, evaluando también la presencia de aserrín en el medio, como agente elicitador; por último, determinaron la remoción de colorantes en aguas residuales sintéticas. Las conclusiones a las que llegaron, fueron que el medio Park-Robinson con el agente elicitador, mostró mejores resultados en el proceso de degradación total del color reactivo *bezaktiv rojo V-5B.*

En 2019, Ramos analizó la capacidad decolorativa de colorantes trifenilmetanos (*verde de malaquita, cristal violeta, fucsina básica)* y azoico *(safranina),* a partir de hongos aislados del suelo y restos vegetales, en medio sólido PDA y en caldo dextrosa papa.

Las conclusiones del trabajo fueron la identificación de 10 cepas con capacidad decolorativa: *Aspergillus niger, A. alternata, Penicillium chrysogenum, A. nidulans,* Hialofomiceto*, Nigrospora sp., Oideodendron sp., P. expansum y A. flavus* cepa 1 y 2; de las cuales, las que tuvieron mejores resultados fueron Hialofomiceto y *A. alternata* en *verde de malaquita*, Hialofomiceto y *A. alternata* en *cristal violeta*, *Nigrospora sp.* y *P. expansum* en *safranina* y en *fucsina*, por ultimo, *P. chrysogenum* y *A. alternata* tuvieron la capacidad de decolorar los cuatro colorantes antes mencionados, en particular *P. chrysogenum* fue el que dio mejores resultados.

En la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en el 2017 Guzmán-Hernández estudió la capacidad de *Bjerkandera adusta* para biorremediar los efluentes textiles de una empresa de tinción textil (T-ANNA). Se investigó la capacidad de crecimiento y de decoloración de dicho hongo cuando se enfrentaba a cuatro colorantes textiles DyStar™: *negro remazol NF-A*, *rojo remazol INT R-GB*, *amarillo remazol RR GRAN* y *naranja remazol RR-GRAN* (los cuales son empleados para teñir algodón en la misma empresa). Las conclusiones del trabajo fueron que *B. adusta* es capaz de emplear los colorantes negro, naranja y rojo como fuente de carbono y energía para desarrollarse, y además decolorar el 100%, 81% y 70% de los colorantes respectivamente; aunque fue incapaz de metabolizar al colorante *amarillo remazol RR GRAN.*

En los párrafos anteriores se ha descrito la capacidad de los HPB para degradar el colorante; sin embargo, al ser desechados los contaminantes textiles en el agua, resulta muy relevante hacer referencia a investigaciones acerca de hongos en ambientes acuáticos capaces de decolorar colorantes. Al respecto se presentan a continuación algunas investigaciones, considerando también que la presencia de un hongo en tal ambiente no significa que este sea el hábitat óptimo y/o que ahí cumpla todo su ciclo de vida.

Es importante recalcar que de acuerdo a Wong *et al*. (1998), el estudio de la diversidad fúngica en un sistema acuático puede llevar a encontrar más de 50% de nuevas especies de hongos; lo anterior presenta el desconocimiento de su posible actividad enzimática frente a los colorantes; indudablemente el documentar la capacidad de

biorremediación de diferentes hongos resulta importante, ya que remarcan la importancia que representa su papel en el medio.

Uno de los trabajos, donde se analizó la capacidad de biorremedación de diferentes hongos acuáticos para el tratamiento de efluentes que contienían colorantes, fue el realizado por Yang *et al*. (2016), quienes aislaron cepas fúngicas de pedazos de madera en descomposición sumergidos en arroyos de la provincia de Zhejiang, República Popular de China. Evaluaron la decoloración de siete colorantes sintéticos (*azul ácido 40, rojo reactivo 11, azul ácido 193, azul ácido 62, azul ácido 113, azul reactivo 74* y *rojo ácido 73*), e investigaron 13 aislados fúngicos con alta capacidad de decoloración en un sistema líquido. Las conclusiones del trabajo fueron que varios aislados mostraban la capacidad de decolorar múltiples tintes y, al menos, decolorar uno con alta eficiencia; además, ciertos aislados del estudio tuvieron una eficacia de decoloración mayor que la del hongo de la pudrición blanca *Ceriporia lacerata*; la investigación generó también el primer reporte que expuso las capacidades de decoloración de las especies de hongos *Acrogenospora sphaerocephala, Dictyosporium zhejiangensis* y *Plectosporium tabacinum* sobre los colorantes sintéticos.

Junghanns *et al.* (2008), analizaron el potencial de decoloración de los colorantes azo (*rojo ácido 299, negro directo 38, azul directo 1, rojo directo 28, rojo disperso 1, amarillo disperso 3, negro reactivo 5, rojo reactivo 4 y amarillo reactivo 81*) y antraquinonas (*azul ácido 62, azul disperso 1 y azul reactivo 19*), utilizando 37 cepas de Hifomicetos acuáticos y 95 aislados fúngicos derivados de diferentes ambientes acuáticos, además de cinco Hongos de la Pudrición Blanca (HPB) para su comparación. Para determinar la decoloración, las cepas y los aislados fúngicos fueron cultivados en agar sólido y medio líquido de extracto de malta. La mayoría de los colorantes fue degradado por diferentes aislados acuáticos mitospóricos, a un grado comparable con el de los HPB, y bajo ciertas condiciones, algunas cepas acuáticas degradaron el colorante de forma más eficiente que los HPB. En general, los resultados apuntan al potencial que tienen los hongos que habitan en ambientes de agua dulce para el tratamiento de efluentes que contienen colorantes.

En relación a todos los antecedentes descritos anteriormente, es importante mencionar que en la mayoría de los casos se emplearon medios de cultivo sólidos y/o líquidos, enriquecidos y selectivos con glucosa, con soluciones de sales minerales, vitaminas, peptona, tiamina, levadura, biotina, extracto de malta, o bien con elicitores, como el aserrín. El presente trabajo usó un medio con una suficiente cantidad de nutrientes (Agar Dextrosa y Papa), pero también analizó la respuesta frente a medios carentes de nutrientes a efecto de saber si existían cambios ante el estrés nutricional.

Debe recalcarse que los aislados fúngicos empleados en la presente investigación provinieron de la propia agua residual de la empresa, y que se usaron los mismos colorantes que estaban siendo empleados por la empresa en el momento del muestreo.

3. HIPÓTESIS

Los cinco aislados fúngicos obtenidos del agua residual textil muestreada poseen capacidades decolorativas similares a las del hongo control positivo *Bjerkandera adusta,* cuando se encuentran en un medio con los colorantes DyStar™ *Procion Blue H-ERD* y *Procion Yellow H-E4R*.

4. OBJETIVOS

Objetivo General

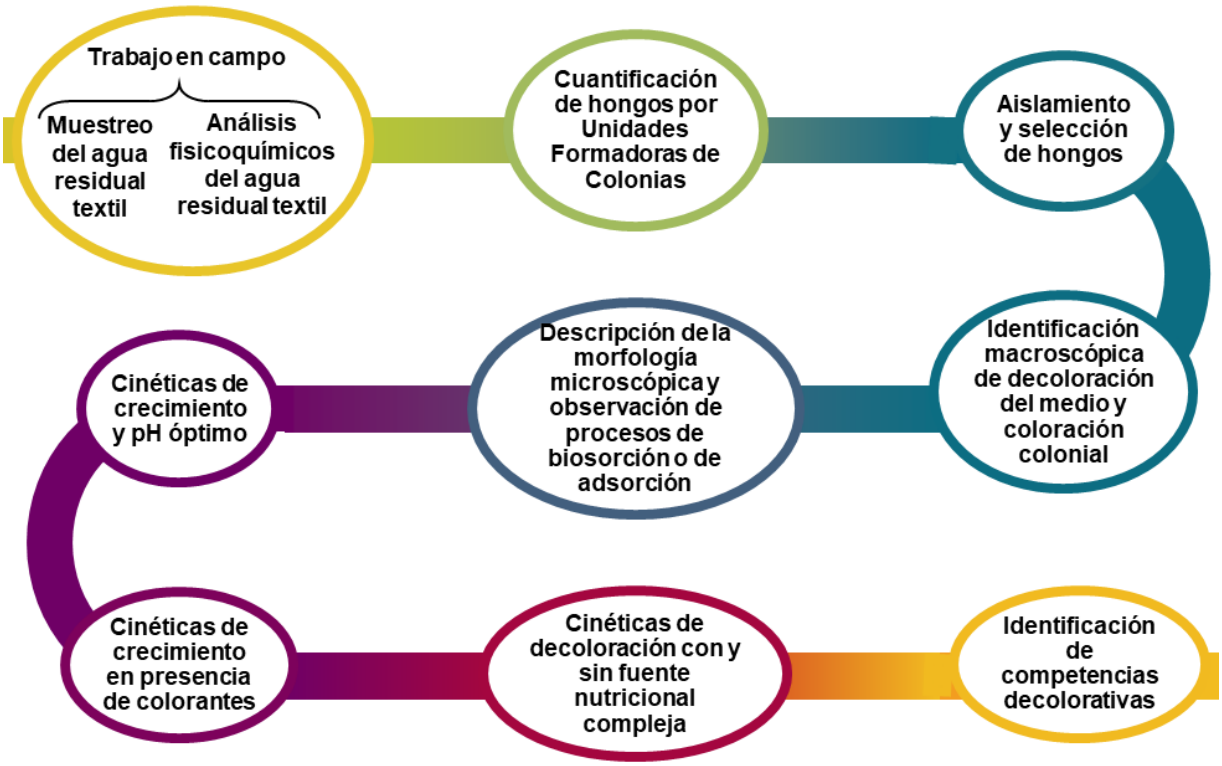
Evaluar las competencias decolorativas *in vitro* de cinco aislados fúngicos obtenidos de agua residual textil frente a los colorantes textiles DyStar™ *Procion Blue H-ERD* y *Procion Yellow H-E4R.*

Objetivos Específicos

1. Obtener los aislados fúngicos del agua residual de una empresa textilera.
2. Evaluar el crecimiento de los aislados fúngicos seleccionados por su visible capacidad decolorativa.
3. Comparar las competencias decolorativas (Porcentaje de Decoloración, Velocidad de Decoloración y Capacidad de Decoloración) de los cinco aislados respecto al control *Bjerkandera adusta.*

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Diagrama Metodológico



5.2. Trabajo en campo

5.2.1. Muestreo y Análisis Fisicoquímicos del agua residual textil

El trabajo en campo consistió tanto en la toma de muestras como en la determinación de algunos parámetros fisicoquímicos en cada sitio del muestreo. En lo referente a la primera actividad, ésta se realizó conforme a lo establecido en el Proyecto de Norma Mexicana PROY-NMX-AA-003/1-SCFI-2008 en la cual se dan los lineamientos generales y recomendaciones para la toma de muestras de aguas residuales.

Las tomas se realizaron el día 21 de septiembre del 2017 en dos sitios dentro de la industria textil T-ANNA ubicada en el municipio de Zinapécuaro de Figueroa en las coordenadas 19° 52’ 36" latitud norte y 100° 49’ 07" longitud oeste, en el estado de

Michoacán; esta empresa se ubica en la salida de la carretera 120 que se dirige a Acámbaro, Guanajuato, Michoacán, México (Figura 3).

Figura 3. Ubicación del sitio de muestreo en la ciudad de Zinapécuaro de Figueroa en el Municipio de Zinapécuaro, Michoacán.

El primer sitio de muestreo fue el efluente de las aguas residuales de la fábrica (S1) y el segundo corresponde a un estanque de tierra aledaño (E2), que en ocasiones suele llenarse con agua residual, además de ser alimentado por escurrimientos del ducto de salida. Ambos lugares quedan ilustrados en la Figura 4.

Figura 4. Sitios de muestreo en la empresa textil T-ANNA.a) Salida directa del agua residual (S1); b) Estanque de tierra donde se diluye el agua residual (E2).

Para los dos sitios de muestreo se determinaron en campo los siguientes parámetros: la temperatura del agua y temperatura ambiental (°C) usando un termómetro de mercurio, el pH con un potenciómetro de campo HANNA® modelo pH20, la conductividad eléctrica (µS/cm) y los sólidos disueltos totales (mg/L) con un conductivímetro de campo HANNA® modelo Hi98130, el oxígeno disuelto (mgO_2/L) con un medidor HQ40d Portable Meter de OD, las coordenadas y la altura con un GPS, las dimensiones del lugar muestreado con una cinta métrica, el color del agua y la materia aparente se describieron por la presencia o ausencia de materiales percibidos a simple vista.

A continuación, se describe la toma de muestra para el análisis de los parámetros fisicoquímicos, microbiológicos y de metales pesados:

- Muestreo de parámetros fisicoquímicos. Las muestras se tomaron en recipientes de plástico con tapa, de capacidad de 2L y se llenaron sin dejar cabezal de aire. Cada recipiente se etiqueto con la fecha y sitio de muestro. Por sitio se tomaron 4L de agua residual los cuales fueron conservados a 4°C hasta su trasladado al

Centro de Estudios en Medio Ambiente (CEMA) ubicado Morelia, Michoacán donde se determinaron los siguientes parámetros: Demanda Bioquímica de Oxígeno, DBO_5, (mg/L), Demanda Química de Oxígeno, DQO, (mg/L), Sólidos Sedimentables, SD, (mg/L), Sólidos Suspendidos Totales, SST, (mg/L), Solidos Disueltos Totales, SDT, (mg/L), Nitrógeno Total, NT, (mg/L), Nitratos, NO_3^-, (mg/L), Nitritos, NO_2^-, (mg/L), Nitrógeno Orgánico, N, (mg/L).

- Muestreo de parámetros microbiológicos. Se tomó la muestra directamente del flujo de salida (S1) o del estanque (E2) mediante una taza previamente esterilizada, y de ella se llenaron dos bolsas estériles Whirlpack con capacidad de 500 mL, sin dejar espacio de aire superior. Las muestras se conservaron a 4°C hasta su traslado al Laboratorio de Investigación y Servicios de Microbiología Acuática de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (donde se inició el aislamiento) y al CEMA (donde se realizaron los análisis de coliformes fecales, coliformes totales, hongos y levaduras).
- Muestreo de metales pasados. Se utilizaron bolsas estériles Whirlpack con capacidad de 500 mL para contener la muestra del sitio S1 o del sitio E2; estas muestras fueron trasportadas en hielera 4°C hasta su llegada al CEMA para la determinación de plomo (mg/L), arsénico (mg/L) y fluoruros (mg/L).

En el Cuadro 3 se muestra la metodología utilizada para establecer las características del agua a partir de métodos normalizados en México para los parámetros fisicoquímicos, elementos químicos y microbiológicos.

Cuadro 3. Normas mexicanas para la determinación de los parámetros en laboratorio.

Parámetro	Metodología
Demanda bioquímica de oxígeno (mg/L)	NMX-AA-028-SCFI-2001
Demanda química de oxígeno (mg/L)	NMX-AA-030/2-SCFI-2011
Sólidos sedimentables (mg/L)	NMX-AA-004-SCFI-2013
Sólidos suspendidos totales (mg/L)	NMX-AA-034-SCFI-2015
Sólidos disueltos totales (mg/L)	NMX-AA-034-SCFI-2015
Nitrógeno total k (mg/L)	NMX-AA-026-SCFI-2010
Nitratos(mg/L)	NMX-AA-079-SCFI-2001
Nitritos (mg/L)	NMX-AA-099-1987
Nitrógeno orgánico (mg/L)	NMX-AA-079-SCFI-2001
Plomo (mg/L)	NMX-AA-051-SCFI-2016
Arsénico (mg/L)	NMX-AA-051-SCFI-2016
Floruros (mg/L)	NMX-AA-077-SCFI-2001
Coliformes fecales NMP/100 mL	NMX-AA-042-SCFI-2015
Coliformes totales NMP/100 mL	NMX-AA-042-SCFI-2015
Hongos UFC/mL	NOM-111-SSA1-1994
Levaduras UFC/mL	NOM-111-SSA1-1994

5.3. Trabajo de laboratorio

5.3.1. Cuantificación de hongos por Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

El cálculo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de hongos en el agua muestreada se realizó con la finalidad de contar, seleccionar y aislar hongos del agua residual textil.

Para el presente estudio se utilizó el método propuesto por Miles y Misra (1938) con algunas modificaciones, ya que es una metodología útil para cuantificar el número de células fúngicas viables que están presentes en muestras líquidas, en distintas etapas de crecimiento (Muñoz-Rojas *et al*., 2016), con este método se estiman las Unidades Formadoras de Colonias de microorganismos (UFC) por un mililitro (1 mL) de muestra.

La realización del método se describe a continuación: se transfirió 1 mL de cada muestra de agua residual a un tubo con tapa previamente esterilizado y que contenía 9 mL de agua destilada. La mezcla se agitó en vórtex por 15 segundos. Se realizó este paso para llevar a cabo diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-6} y se contempló como testigo analítico agua destilada sin muestra.

Posteriormente se prepararon cajas Petri con medio Agar Dextrosa y Papa (PDA) y colorante (*Procion Blue H-ERD* y *Procion Yellow H-E4R*) en concentraciones de 100 mg/L y 500 mg/L y sin colorante (Anexo 1); a los medios con PDA se les agregó estreptomicina ($C_{21}H_{39}N_7O_{12}$) en una concentración de 50 µg/mL.

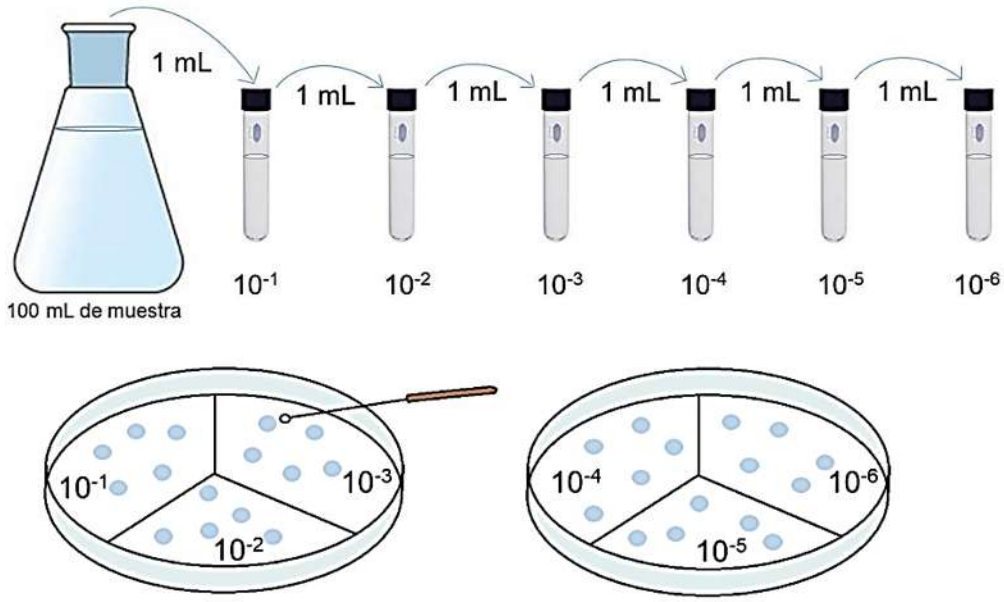
Con un asa microbiológica de 10 µL se inocularon cinco gotas de la dilución apropiada en el área correspondiente de la caja de Petri. Se usaron dos cajas Petri divididas en tres secciones para albergar a las seis diluciones seriadas, y se consideró una réplica para cada dilución seriada.

Además, se incluyó un testigo analítico que contenía agua estéril, la cual fue inoculada en placas de Petri para verificar la correcta esterilización. Cuando el inóculo secó completamente sobre el medio de crecimiento, se invirtió la caja de Petri. De esta manera las cajas se incubaron durante un periodo de 24 horas a una temperatura de 28°C para evaluar la presencia y ausencia de crecimiento microbiano en la superficie de cada placa de Petri inoculada. Durante 12 días cada 24 horas se registró la presencia o ausencia de microorganismos.

Al finalizar la incubación los valores de UFC se estimaron con la media del número de colonias de cada caja y su replica, después se multiplicó el número de UFC/mL obtenido por el factor de dilución correspondiente. Los datos se expresaron como el logaritmo base 10 de las UFC (log10 UFC /mL).

En la Figura 5 se resume el diseño experimental descrito anteriormente.

a)



b)

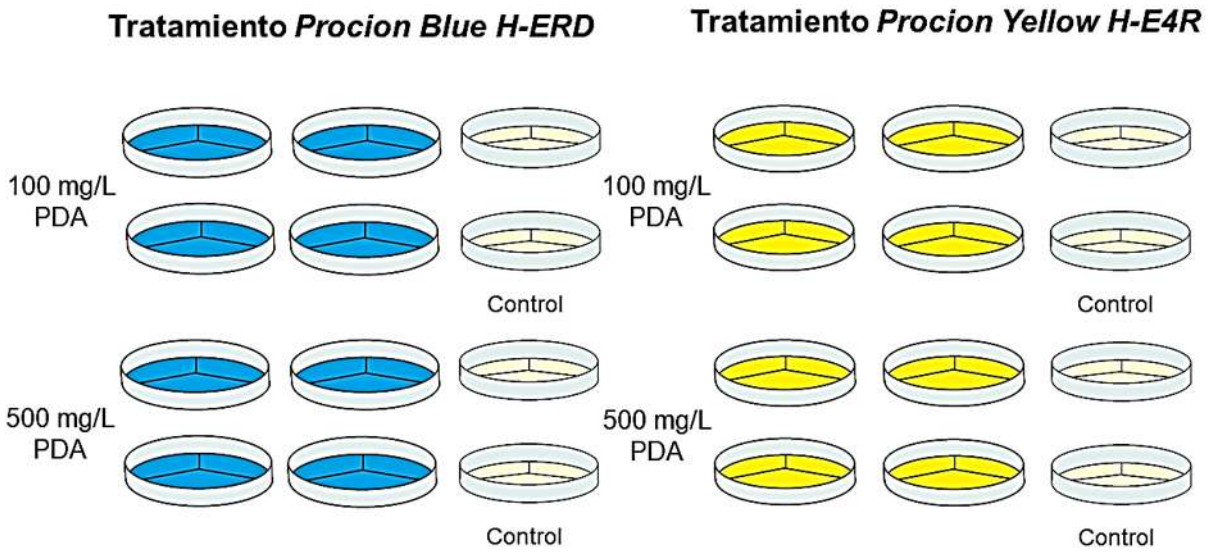


Figura 5. Diseño experimental para estimar las Unidades Formadoras de Colonias. a) Diluciones en serie inoculadas en el área correspondiente de dos cajas Petri divididas en 3 secciones para albergar a las 6 diluciones seriadas. b) Tratamientos empleados de los colorantes *Procion Blue* y *Procion Yellow* para cada sitio de muestreo (S1 y E2).

5.3.2. Aislamiento y selección de hongos

De las colonias fúngicas que crecieron por el método de diluciones en serie, se realizó la resiembra directa de cada una de ellas en medio sólido Agar Dextrosa y Papa (PDA), conservando la misma concentración y el colorante del que provenían.

Posteriormente se seleccionaron y aislaron las colonias que presentaron un buen crecimiento en las condiciones de laboratorio. El aislamiento se llevó a cabo con el medio PDA en cajas de Petri con las concentraciones de 100 mg/L y 500 mg/L de los colorantes *Procion Blue H-ERD* y *Procion Yellow H-E4R* por separado, mediante la técnica de estriado en superficie; la incubación se realizó a 28°C durante 72 hrs. De esta manera el total de hongos aislados provenientes de los dos sitios muestreados fue 30.

A partir de los 30 aislados, se realizó una segunda selección para obtener aquellos con alguna capacidad decolorativa (observada a simple vista) y/o facilidad de crecimiento en el laboratorio. Para lograrlo se realizaron varias resiembras individuales en nuevas cajas de Petri con medio sólido PDA y los colorantes *Procion Blue H-ERD* y *Procion Yellow H-E4R*, en las concentraciones de 100 mg/L y 500 mg/L, hasta que se obtuvo el aislado fúngico puro; a cada aislado se le designo las letras “AGA” y un número consecutivo. En esta segunda selección se escogieron los siguientes cinco hongos: AGA2, AGA3, AGA10, AGA11 y AGA29, que son con los que se trabajó en esta investigación.

5.3.3. Mantenimiento y cultivo de *Bjerkandera adusta* y de los aislados fúngicos

Bjerkandera adusta fue la cepa usada como control positivo en este trabajo de investigación. Es un basidiomiceto degradador de la madera cuyas capacidades para degradar compuestos xenobióticos aromáticos ha sido expuesta en los antecedentes. Pertenece a la siguiente clasificación taxonómica (Encyclopedia of Life, 2020; Global Biodiversity Information Facility, 2020):

Dominio: Eukaryota
Reino: Fungi

Phylum: Basidiomycota
Clase: Agaricomycetes
Orden: Polyporales
Familia: Meruliaceae
Género: *Bjerkandera*
Especie: *Bjerkandera adusta* (Willd.) P.Karst, 1879

Se dispuso de la cepa en cultivo puro de *Bjerkandera adusta* proporcionada por el Laboratorio de Biotecnología Ambiental (Micorremediación y fitorremediación de suelos y agua) de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Dicha cepa fue cultivada en todos los casos en medio PDA, el cual permitió su preservación y manejo en el laboratorio.

Su manejo en laboratorio, al igual que con los aislados puros se realizó de la siguiente manera. Se procedió a abrir la caja de Petri con la cepa (o con el aislado), a la flama del mechero para evitar contaminaciones, y con un sacabocados de 1 cm de diámetro, se perforó el medio que contenía micelio, posteriormente y a la llama del mechero se colocó el inóculo en el centro de una nueva placa de Petri con medio PDA estéril. Las placas se incubaron a una temperatura de 28°C en condiciones de oscuridad por 14 días.

5.3.4. Preparación de condiciones homogéneas en el crecimiento

Con el objetivo de homogeneizar el tiempo de crecimiento de cada uno de los cinco aislados AGA y de *B. adusta*, que se usaron en todos los experimentos, se llevó a cabo la siembra previa de los inóculos de un centímetro de diámetro en cajas Petri con medio sólido PDA estéril. En todos los casos se realizó la incubación a una temperatura de 28°C en condiciones de oscuridad y se esperaron 14 días para poder tomar al organismo y someterlo a los experimentos.

5.3.5. Identificación macroscópica de decoloración del medio y coloración colonial

Una vez realizada la selección, se procedió a describir la morfología colonial de cada aislado fúngico y de *B. adusta* crecidos en medio PDA con y sin colorante; esta se realizó con base a las características que presentaron los hongos, en el aspecto y desarrollo de su colonia sobre la superficie del medio de cultivo; se consideró si las colonias eran filamentosas o circulares, cuál era su elevación aérea, su aspecto (algodonoso, velloso o polvoriento), su color (Microbiology Society, 2017) y para efectos de este trabajo se consideró también si había decoloración en el medio con colorante.

Además, al estar sembrados los aislados fúngicos y *B . adusta* en medio con colorante, se registró el color de la colonia comparándola con la colonia crecida sin colorante a efecto de detectar algún posible cambio en la coloración debido a la probable capacidad de adsorción de los aislados.

5.3.6. Descripción de la morfología microscópica y observación de procesos de biosorción o de adsorción

Por su parte, para la descripción microscópica de los aislados fúngicos y de *B. adusta* se consideraron aspectos estructurales y reproductivos específicos de los hongos, tales como la forma de las hifas que conforman el micelio, las estructuras de reproducción y/o esporas (López *et al*., 1998; Prescott, 2002; Watanabe, 2010) y el proceso de biosorción o de adsorción para esta investigación.

Con la finalidad de identificar la capacidad de adsorción y/o biosorción del micelio, se realizaron observaciones microscópicas de los aislados y de *B. adusta* que provenían de los medios donde habían crecido frente a los colorantes *Procion Blue H-ERD* y *Procion Yellow H-E4R*, para asi observar la presencia o ausencia de los colorantes tiñendo la pared celular o el interior de las hifas.

La descripción microscópica se realizó mediante un microscopio óptico compuesto Leica DM300, usando la tinción simple por impronta de azul de lactofenol de la siguiente manera.

En la parte central del portaobjetos se colocó una gota del colorante lactofenol azul de algodón en solución 1:1 en agua destilada. Posteriormente se cortó con tijeras un fragmento de cinta adhesiva transparente. Se esterilizó el asa micológica y se dejó enfriar, después se adhirió la punta del asa micológica a la cinta adhesiva.

En condiciones asépticas se abrió la caja de Petri con el cultivo y se presionó ligeramente el micelio con la parte adhesiva de la cinta. Inmediatamente después se colocó la muestra sobre la gota de lactofenol azul de algodón que se depositó previamente en el portaobjetos, con ayuda de unas pinzas se extendió la cinta y se esterilizaron nuevamente el asa y las pinzas, enseguida se adicionó otra gota de colorante lactofenol azul de algodón sobre la cinta adhesiva y se colocó un cubreobjetos. Finalmente, se acomodó la preparación en el microscopio óptico con el objetivo de inmersión 10X, seguido de 40X y finalmente 100X para observar a detalle los componentes estructurales de los aislados y de *B. adusta.*

La tinción para observar la morfología microscópica se realizó con cultivos que tenían siete días de crecimiento en cajas con medio sólido PDA sin colorantes y, la tinción para observar el proceso de adsorción se realizó con cultivos que tenían siete días de crecimiento en cajas con los colorantes *Procion Blue H-ERD* y *Procion Yellow H-E4R* en la concentración de 500 mg/L en medio sólido PDA. Para observar este proceso de adsorción, se realizó la tinción con agua destilada para que el tinte lactofenol azul de algodón no impartiera color a las hifas de los hongos.

5.3.7. Cinéticas de crecimiento y pH óptimo

Para poder determinar el pH óptimo de crecimiento, se realizó un experimento donde se cambió el valor de pH del medio sólido PDA de 5.91, a 4 (medio ácido) y 8 (medio alcalino). Cada medio contenía la concentración de 500 mg/L de colorante azul o amarillo. La corrección del pH se efectuó agregando ácido clorhídrico (HCl) o hidróxido de sodio (NaOH) a concentraciones de 1 molar (Anexo 1). Los medios preparados se

esterilizaron en autoclave a 120°C a 15 PSI durante 15 minutos; al término se vaciaron en cajas Petri estériles y se esperaron 48 horas para verificar su esterilidad.

En cada caso se realizaron los experimentos por triplicado.

Para realizar la siembra de cada hongo se empleó un sacabocados de 1 cm de diámetro, con el cual se trasladó una porción del micelio crecido con anterioridad al medio recién preparado. De esta forma se inocularon los aislados fúngicos y la cepa *B. adusta* en cajas Petri con tres valores diferentes de pH (4, 5.91 y 8), con y sin los colorantes *Procion.*

A efecto de determinar la cinética de crecimiento de cada aislado y de *B. adusta*, en los diferentes medios preparados, éstos se incubaron a una temperatura de 28 °C en condiciones de oscuridad y durante 14 días se registró en Excel el incremento del diámetro del micelio hasta alcanzar el borde de la caja.

5.3.8. Cinéticas de decoloración

Estos experimentos consistieron en evaluar la decoloración realizada por los cinco aislados fúngicos y por *B. adusta* en medios sólidos con y sin fuente de nutrientes complejos. En cada caso se realizaron los experimentos por triplicado.

El medio complejo utilizado fue Agar Dextrosa y Papa, el cual representa una amplia variedad de nutrientes entre los que se encuentran el almidón y sus polímeros de amilosa y de amilopectina; contiene también proteínas (casi exclusivamente globulinas y glutelinas), y cerca de 21 aminoácidos como fuente de nitrógeno; entre otros nutrientes se encuentran grasas, calcio, fósforo, hierro y ácido ascórbico (Prada, 2012); por otra parte la dextrosa que se incorpora al medio sirve también como base para el crecimiento de los hongos.

Se vaciaron 25 mL de medio PDA esterilizado en autoclave a 120°C a 15 PSI durante 15 minutos, a cajas Petri plásticas estériles; el medio se preparó con 500 mg/L del colorante *Procion Blue H-ERD* o *Procion Yellow H-E4R.*

En lo que respecta a los medios de cultivo considerados como *medios sin nutrientes complejos*, éstos consistieron en:

- cajas con Agar Bacteriológico (AB) esterilizado, y los colorantes a la misma concentración descrita anteriormente.
- matraces con 80 mL de agua de garrafón estéril conteniendo una concentración de 500 mg/L de los colorantes. El diseño experimental se muestra en la Figura 6.

Para las cajas de PDA y AB se inocularon los aislados y *B. adusta* de forma aséptica con un sacabocados de 1 cm de diámetro. Las placas se incubaron a una temperatura de 28 °C en condiciones de oscuridad y durante 25 días se registró en Excel el incremento del diámetro del halo de decoloración.

En los medios líquidos solo se inocularon al aislado AGA10 y a la cepa *B. adusta,* de forma aséptica con un sacabocados de 1 cm de diámetro; posteriormente se incubaron en la obscuridad a una temperatura de 28 °C durante 23 días. Cada tercer día se agitó el medio y se obtuvieron 6 mL del cultivo, el cual fue filtrado con papel filtro Whatman del número 4 cuyo tamaño de poro es de 20-25 µm. Cada filtrado fue colocado en una celda de cuarzo para su medición espectrofotométrica en el espectrofotómetro marca UNICO® modelo S_2150, utilizando el programa BASIC MODE-%T/Abs measure. La comparación se realizó con medio con colorante sin inocular.

La decoloración del colorante *Procion Blue H-ERD* se determinó midiendo a una longitud de onda de 500 nm; mientras que la decoloración de colorante *Procion Yellow H-E4R* se determinó midiendo a una longitud de onda de 600 nm.

La concentración de cada colorante se obtuvo mediante una curva de calibración (Anexo 2), donde a partir de concentraciones conocidas se determinaron previamente las absorbancias y se realizó un gráfico en Excel (curva estándar).

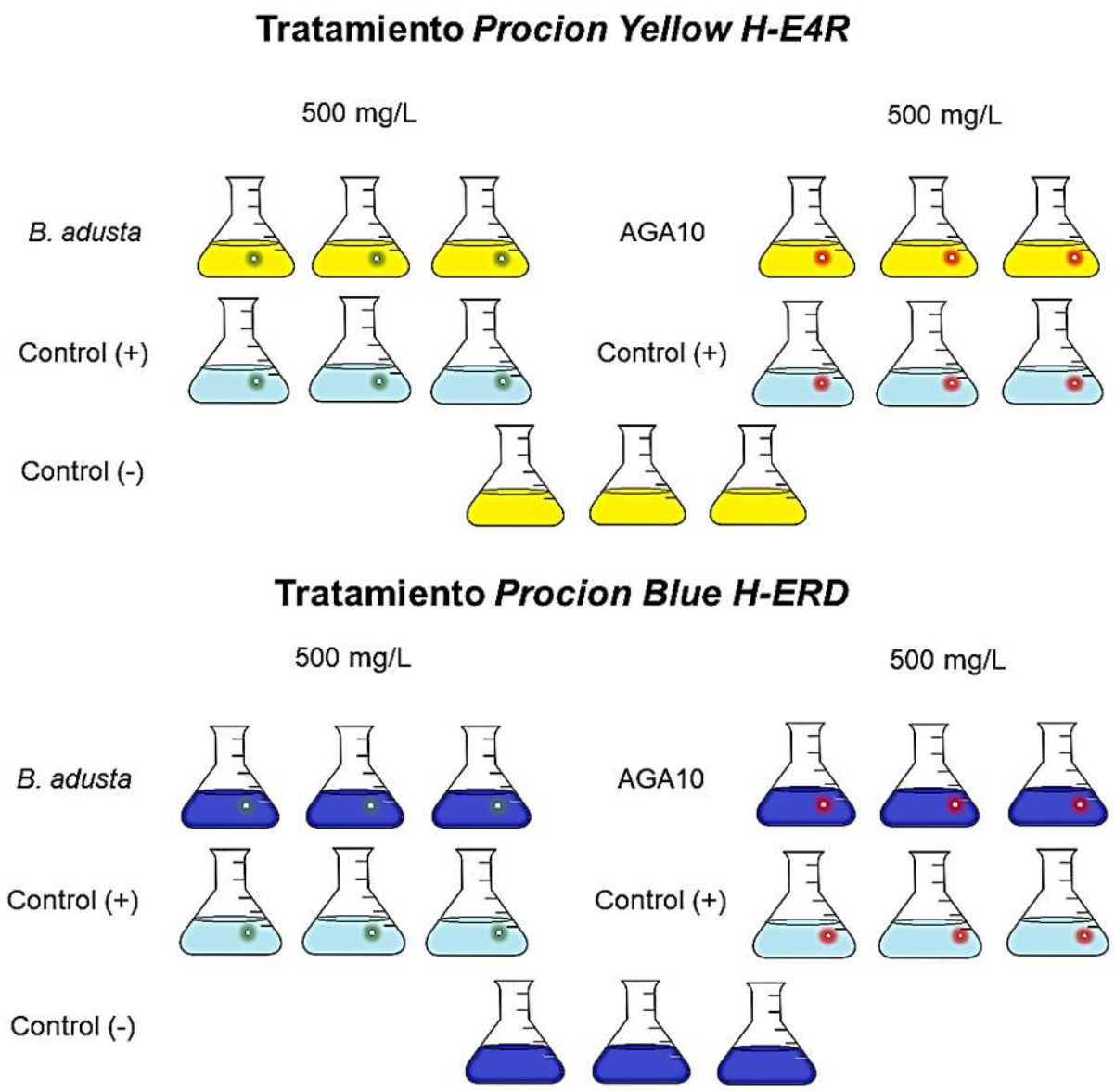


Figura 6. Diseño experimental para evaluar la decoloración de los colorantes *Procion Yellow* y *Procion Blue* en medio líquido, de la cepa *Bjerkandera adusta* y el aislado fúngico AGA10. El punto en cada matraz representa el inóculo que fue sembrado del aislado AGA10 y de la cepa *B. adusta*.

5.4. Identificación de Competencias Decolorativas

Para la presente investigación se considerarán tres características cuando se designe el término “Competencias Decolorativas”.

1. El Porcentaje de Decoloración (%D). Definido como el porcentaje de decoloración que representa el halo decolorativo respecto al diámetro total de la placa de Petri; para el estudio se consideró un diámetro total de 8.5 cm. La forma matemática de calcularlo fue la siguiente:

$$\%D = \frac{\text{Diámetro de decoloración final } (100)}{\text{Diámetro total de la caja Petri}}$$

2. La Velocidad de Decoloración (VD). Definida como los centímetros que por día logra decolorar un hongo en una caja Petri. La forma matemática de calcularla fue la siguiente:

$$VD = \frac{\text{cm finales decolorados}}{\text{días totales de decoloración}}$$

3. La Capacidad de Decoloración (CD). Definida como los miligramos por día que un hongo es capaz de decolorar; se evaluó en medio sólido y en agua. La forma matemática de calcularla fue la siguiente:

$$CD = \frac{\text{mg finales decolorados}}{\text{días totales de decoloración}}$$

5.5. Análisis estadístico

Se desarrolló una prueba de permutación estadística utilizando el estadístico t de Student para dos muestras y así comparar las curvas del halo de decoloración entre los aislados fúngicos y la cepa *B. adusta* durante 25 días. Se realizaron comparaciones por pares entre los aislados fúngicos y los valores de *p* se ajustaron para múltiples pruebas usando un procedimiento de Bonferonni descendente, tal como lo establecen Elso *et al*. (2004) y Baldwin *et al*. (2007).

Se obtuvo un valor *p* para el estadístico de prueba por simulación, cada uno de los aislados fúngicos y la media t se recalculó para 9,999 conjuntos de datos permutados de esta manera, el valor *p* es la proporción de permutaciones, donde la media t es mayor en valor absoluto que la media t para el conjunto de datos original.

Todos los análisis fueron evaluados utilizando la función 'compareGrowthCurves' del paquete de software statmod para R (http://bioinf.wehi.edu.au/software/compareCurves/index.html).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Análisis Fisicoquímicos del agua residual textil *in situ*

Los resultados de los análisis fisicoquímicos realizados tanto en campo como en laboratorio se muestran en el Cuadro 3. Puede observarse que el sitio S1 revela algunos parámetros por arriba del Límite Máximo Permisible (LMP) marcado por las NOM's, como la temperatura, pH, Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO_5) y Demanda Química de Oxígeno (DQO); mientras, en el sitio E2, coliformes totales es el único parámetro que excede el LMP. Todos ellos se han resaltado en color rojo.

Conductividad Electrolítica

La conductividad varía directamente con la cantidad de sólidos disueltos (principalmente sales minerales) en un medio acuoso (Cortina y Márquez, 2008).

En el cuadro 3 puede observarse que el sitio S1 presentó un valor mas alto de conductividad electrolítica respecto al sitio E2; se trata de 2.8 veces más cantidad en la salida del agua residual. Es muy probable que su origen sean las sales de sodio empleadas en la fijación de los colorantes durante la etapa de tintura. Existen reportes previos que indican que el empleo de estas sustancias proporcionan al agua residual una elevada conductividad (Flores, 2004; Henao y Ramirez, 2016).

Oxígeno Disuelto

El sitio S1 presentó un valor más alto de oxígeno disuelto en relación al sitio E2. Es un resultado esperable ya que el agua residual se encuentra con más movimiento en el ducto de salida de la fabrica textil debido a la constante expulsión a través de la tubería (Figura 4a); en contraparte, el valor más bajo que se reportó en el segundo sitio puede deberse a que el agua del estanque de tierra no cuenta con ningún tipo de aireación, ni movimiento, y el agua residual solo llega a él por suave escurrimiento.

Color y Materia aparente

El agua del primer sitio (S1) presentó un color verde relacionado a la tinción que ese día se realizó en la empresa, así como restos de telas y fibras finas que pueden

ocasionar obstrucciones; en el sitio E2 el agua tuvo un color café claro, presentó materia vegetal y tierra relacionado a la exposición al ambiente. La presencia del colorante que se usó en las lavadoras de la empresa para teñir la tela en el momento del muestreo indica que la composición del agua residual en el sitio S1 tiene una concentración mayor de contaminantes que la del sitio E2, donde ya ha existido dilución o algún proceso físicoquímico de precipitación, de óxido-reducción, de foto-oxidación, o de naturaleza biológica.

Temperatura del agua y Potencial de Hidrógeno

La temperatura del agua es una constante física que tiene gran importancia en el desarrollo de diversos fenómenos, por ejemplo, en la solubilidad de los gases (entre los que es fundamental la solubilidad del oxígeno) y de las sales, así como en las reacciones biológicas, las cuales tienen una temperatura óptima para poder realizarse (Zamora, 2009).

El potencial hidrogeno (pH) es el coeficiente que muestra el grado de acidez o basicidad en un líquido, a partir del 0 al 7 en la escala indican las soluciones ácidas y de 7 a 14 indican soluciones alcalinas (Bauder y Singler, 2017).

El sitio S1 presentó una temperatura mayor a los 40°C que sobrepasa el LMP que establece la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996 en las descargas de aguas residuales; así como también excede el LMP en el valor de pH (9.67), establecido por las NOM´s. Para el sitio E2 ambos parámetros se encuentran dentro de los LMP; aunque vale la pena recalcar que el valor de pH para este sitio es de 8.91 (básico).

La alcalinidad en ambos sitios se puede explicar ya que, durante el proceso de lavado se utiliza un complejo de sustancias conocidas como “licor”, mismas que llegan a contener un pH mayor de 12, el licor de lavado constituye del 30% al 50% del total del flujo de residuo y contiene la mayor parte de las sustancias e impurezas del algodón (Flores, 2004).

Respecto a la elevada temperatura del agua obtenida en el sitio S1, esta se debe al proceso propio de teñido de telas en las lavadoras industriales donde este factor físico

ayuda a mejorar la adición del colorante al sustrato. De acuerdo a Flores (2004), las temperaturas empleadas pudieran ir desde 55°C hasta alrededor de 80°C antes de proceder al lavado final de la tela.

Sólidos Disueltos Totales

Los sólidos disueltos totales (SDT) incluyen compuestos muy variados como, sales inórganicas, carbonatos, bicarbonatos, cloruros, sulfatos, fosfatos y nitratos de sodio, potasio, calcio, magnesio y hierro, asi como pequeñas cantidades de materia orgánica disueltas en el medio acuoso (Cortina y Márquez, 2008).

El sitio S1 presenta 2.9 veces más SDT que el sitio E2. El valor elevado de este parámetro en el primer sitio, se debe a que la mayoría de las sustancias antes mencionadas fueron usadas en alguna etapa del proceso textil. Probablemente, el menor valor en el estanque de tierra se debe a que el agua se encuentra en contacto con el entorno, donde la lluvia o alguna otra fuente (como escurrimientos naturales) pueden participar en su dilución.

Cuadro 4. Parámetros fisicoquímicos *in situ* (fondo gris) y analizados en el Laboratorio CEMA (fondo blanco) de la salida directa del agua residual (S1) y del estanque de tierra almacenador (E2).

Parámetro	LMP[1] 014[2]	LMP[1] 001[3]	LMP[1] 065[4]	Sitio S1	Sitio E2	Metodología
Conductividad electrolítica (µS/cm)	-	-	**	3.46	1.24	Potenciométrico
Oxígeno disuelto (mg/L)	-	-	-	6.94	5.85	HQ40d Portable Meter de Oxígeno disuelto
Color aparente	**	-	**	verde claro	café claro	Visual
Materia aparente	-	-	-	partículas de tela	materia orgánica y tierra	Visual
Temperatura del agua (°C)	**	35	**	**47.16**	22.7	Termómetro de inmersión (mercurio)
Potencial de Hidrógeno (pH)	6-9	6.5-8.5	6-9	**9.67**	8.91	Potenciométrico
Sólidos disueltos totales (ppm)	**	-	-	1,156	406	Potenciométrico
Demanda bioquímica de oxígeno (mg/L)	100-120	200.00	**	**620.25**	5.64	Volumétrico
Demanda química de oxígeno (mg/L)	200-240	-	150	**1,222.25**	64.605	Volumétrico
Sólidos sedimentables (mL/L)	1-1.2	2.0	2	< 0.1	< 0.1	Volumétrico
Sólidos suspendidos totales (mg/L)	100-120	-	250	16	24	Gravimétrico
Sólidos disueltos totales (mg/L)	**	-	-	1,640.66	822.66	Gravimétrico
Nitrógeno total k (mg/L)	-	-	**	20.72	5.60	Volumétrico
Nitratos(mg/L)	-	-	-	3.42	< 0.09	Espectrofotométrico
Nitritos (mg/L)	-	-	-	0.07	< 0.04	Espectrofotométrico
Nitrógeno orgánico (mg/L)	-	-	-	19.32	5.04	Volumétrico
Plomo (mg/L)	-	1	-	< 0.154	< 0.154	Espectrofotometría
Arsénico (mg/L)	-	0.4	-	< 0.001	< 0.001	Espectrofotometría
Fluoruros (mg/L)	-	-	-	11.88	0.733	Potenciométrico
Coliformes fecales NMP/100 mL	-	2,000	-	< 3	240	Tubos múltiples
Coliformes totales NMP/100 mL	1,000	-	1,000	< 3	**4,600**	Tubos múltiples
Hongos UFC/mL	-	-	-	0*	60*	Cuenta de bacterias aerobias en placa
Levaduras UFC/mL	-	-	-	0*	120*	Cuenta de bacterias aerobias en placa

LMP[1]: Límite máximo permisible; 014[2]: NORMA Oficial Mexicana NOM-CCA-014-ECOL/1993, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de la industria textil; 001[3]: Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales para quedar como proyecto de modificación de la Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-001-SEMARNAT-2017; 065[4]: Norma Oficial Mexicana NOM-065-ECOL-1994, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores de las industrias de pigmentos y colorantes; *: Placa en agar dextrosa y papa acidificada incubados a 25°C durante 5 días;

**: Se podrán establecer límites máximos permisibles, en el caso de que se identifiquen descargas que a pesar del cumplimiento de los límites máximos permisibles establecidos en esta norma causen efectos negativos en el cuerpo receptor, la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos a través de la Comisión Nacional del Agua, fijará condiciones particulares;

- : No aplica.

6.2. Análisis Fisicoquímicos del agua residual textil en laboratorio

Demanda Bioquímica de Oxígeno y Demanda Química de Oxígeno

Según el Índice de Calidad de Agua propuesto por la CONAGUA (2015) (Anexos 3.1 y 3.2), el primer punto de muestreo se caracteriza por estar Fuertemente Contaminado en relación a la DBO_5 y DQO, mientras que el agua del segundo punto se puede describir de Buena Calidad respecto a la DBO_5 y Contaminada respecto a la DQO. Por tanto el agua que sale directamente de la empresa constituye un volumen hídrico superficial “con fuerte impacto de descargas de aguas residuales crudas”. En contraparte el agua del estanque tiene “bajo contenido de materia orgánica biodegradable” pero proviene de “aguas residuales crudas”.

Sánchez y García (2018) han explicado que cuando la relación DBO_5/DQO es menor de 0.4, existe la presencia de contaminantes refractarios que resultan de la mezcla de aguas residuales domésticas con aguas industriales sin tratamiento; los contaminantes refractarios pueden ser pesticidas, medicamentos, compuestos de aseo personal, residuos tóxicos industriales. Para el caso del presente trabajo se considerará que los compuestos refractarios son mayormente los colorantes textiles ya que de acuerdo a Pearce *et al.,* (2003) muchos colorantes sintéticos son moléculas recalcitrantes que constituyen el principal residuo encontrado en el efluente de la industria del teñido textil. En el caso de S1 la relación DBO_5/DQO indica que existe un buen nivel de biodegradabilidad en el agua (0.507), mientras que para E2 el índice muestra contaminantes refractarios más difíciles de biodegradar (0.087).

Puede suponerse que el sitio E2 se encuentra próximo a parcelas cultivadas, donde probablemente utilizan fertilizantes y/o pesticidas, los cuales, por acción de escorrentía durante la precipitación, podrían llegar al estanque combinándose con las aguas residuales de la industria, logrando que este sitio sea difícil de biodegradar.

Para determinar la biodegradabilidad del agua en ambos sitios se requerirían hacer experimentos que permitieran reconocer en el tiempo el comportamiento de esos compuestos en el estanque.

Sólidos Suspendidos Totales y Sólidos Sedimentables

Los sólidos suspendidos totales (SST) representan los sólidos insolubles de la muestra que forman parte de los sólidos totales (Cortina y Márquez, 2008). Son los sólidos que el agua conserva en suspensión, incluyen a los minerales de arcilla, arena, limo, papel, pedazos de tela, materia orgánica e inorgánica finamente dividida, y células biológicas que forman una masa de sólidos suspendidos en el agua, incluso las partículas de materiales inertes adsorben sustancias orgánicas en su superficie (Beltran y Rangel, 2012; Argandoña y Macias, 2013).

Los SST se determinan como la cantidad de material retenido después de filtrar un determinado volumen de muestra, a través de filtros de fibra de vidrio o filtros de membrana con un tamaño de poro de aproximadamente 1.2 µm (Argandoña y Macias, 2013).

Para el caso de la tinción de algodón, los SST podrían originarse en el proceso de descrude (paso previo al blanqueamiento), donde la tela es bañada con agua a altas temperaturas y mezclada con sosa cáustica (NaOH), para eliminar las imperfecciones restantes como: grasas, aceites, pigmentos naturales, suciedad que pueda contener la tela y parafina (Salas-Colotta, 2003; Flores, 2004).

Las muestras de ambos sitios presentaron un agua de Excelente calidad respecto a SST, con base al Índice de Calidad de Agua propuesto por la CONAGUA (2015) (Anexo 3.3).

Por su parte, los sólidos sedimentables (SD) representan a los sólidos en suspensión que pueden llegar a sedimentar en condiciones de reposo en un período de tiempo, debido a la influencia de la gravedad, llegando a sedimentar aquellos sólidos suspendidos gruesos, que tengan gravedad específica mayor que la del agua; por ejemplo, los lodos son acumulaciones de sólidos sedimentables (Cortina y Márquez, 2008). El tamaño de partícula de los SD corresponde a 10 micras o más (Argandoña y Macias, 2013). Los valores de este parámetro para ambos sitios se encuentran por debajo de los LMP, una explicación para este bajo valor en el estanque de tierra es

que las muestras correspondieron a agua superficial y no al agua más profunda próxima al sedimento.

Nitrógeno Total y Nitrógeno Orgánico

El sitio S1 presentó 3.7 y 3.8 veces más de Nitrógeno total y orgánico, respectivamente, que el sitio E2.

Es evidente que las moléculas de colorantes contienen nitrógeno en su composición química y que estas moléculas están siendo arrojadas directamente por el efluente de salida, donde se encontrarán en mayor concentración. Debe mencionarse que en la empresa textil es muy común usar compuestos coloreados que incluyan grupos funcionales nitrogenados tales como monoazo (N=N), bi-azo, triazo-compuestos, amino ($-NH_2$), nitro ($-NO_2$), triazinas, pirimidinas, piridacinas, ftalazinas, quinoxalinas, benzotiazoles, acrilamidas, y ftalocianina (Marcano, 2018; Flores, 2004).

El empleo de los colorantes nitrogenados por parte de la industria textil en estudio queda en evidencia en la Figura 1, donde se ha mostrado que dentro de la estructura química del colorante *Procion Yellow* y del *Procion Blue* existen respectivamente 9 y 15 átomos de Nitrógeno en formas orgánicas, como son: grupos amino ($-NH_2$), aminas aromáticas secundarias (-NH-C), grupos triazinas (1,3,5-triazina), y enlaces azo (N=N). Los resultados mostraron que casi todo el Nitrógeno detectado correspondió a Nitrógeno orgánico en ambos sitios.

Plomo

Los resultados revelaron que los valores de plomo están por debajo del LMP para las muestras de ambos sitios. Es indicativo de que probablemente la empresa no utiliza algún auxiliar de tintura o un colorante que pueda contener este metal.

La importancia de detectar este catión metálico radica en que en algunos casos se ha relacionado su presencia con el empleo de pigmentos en cuya composición se encuentra el acetato de plomo, el sulfato básico de plomo, el cromato de plomo o el blanco de plomo ($2PbCO_3.Pb(OH)_2$) (Nordberg, 1998; Health, 2017). Debido a su elevada toxicidad estas moléculas poco a poco se dirigen al desuso.

Arsénico y Fluoruros

En Michoacán se ha detectado la contaminación natural geotermal de Arsénico (As) y Fluoruros en el municipio de Zinapécuaro, debido a la geología de tipo volcanosedimentaria, sedimentaria e ígnea intrusiva y extrusiva; se ha reportado en pozos de agua subterránea y manantiales ubicados alrededor del lago de Cuitzeo niveles de As que van desde 0.001 hasta 3.812 mg/L, siendo la localidad de Araró, en Zinapécuaro, la que presenta el mayor nivel de As (Páez, 2008; Benitez, 2013); en esta misma localidad se han reportado rangos de concentración de Fluoruros entre 0.7 a 4.2 mg/L (Alarcón-Herrera *et al*., 2013).

Sin embargo, en una investigación realizada por Benitez en el 2013, se reportaron concentraciones de As y Flúor, entre 0.001 hasta 0.086 mg/L, y rangos de 0.94 a 21.20 mg/L, respectivamente, en agua potable de pozos y manantiales que abastecen a los municipios de Acámbaro y Jerécuaro, los cuales colindan con mantos freáticos de la misma cuenca de agua (lago de Cuitzeo que se integra a la Cuenca Lerma-Chapala-Santiago) a la que pertenece el municipio de Zinapécuaro.

El As es un metaloide (con propiedades tanto de metal como de elemento no metálico) que en el ambiente se encuentra combinado con otros elementos como el oxígeno, cloro y azufre para formar arsénico inorgánico, este esta presente naturalmente en el suelo y en muchos tipos de rocas, especialmente minerales que contienen cobre o plomo. En algunas zonas existe como resultado de la composición geológica o por erupciones volcánicas que por medio de la escorrentía puede entrar al agua debido a infiltraciones a través del suelo, por esta razón las concentraciones en el agua subterránea son elevadas (Benitez, 2013).

El As en el agua subterránea se encuentra asociado a otras especies químicas como el flúor, vanadio, selenio entre otros (Carro y Montoro, 2009). En relación al flúor, éste es un elemento muy reactivo cuya forma química es la aniónica (fluoruro F^{-1}) (Ghosh *et al*., 2012). Los fluoruros liberados al aire por volcanes y la industria son transportados por el viento y la lluvia, a aguas, suelo y fuentes de alimentos cercanas; en el agua y en el suelo los fluoruros se adhieren fuertemente al sedimento o partículas (Benitez, 2013).

Los resultados mostraron valores de As por debajo del LMP en ambos sitios (< 0.001), lo cual indica que probablemente la empresa no utiliza colorantes que pudieran contener este elemento; en cuanto a la cantidad de fluoruros que presentó el sitio S1 fue elevada (11.88 mg/L), 16 veces mayor en comparación con el sitio E2 (0.733 mg/L).

Probablemente los valores tanto de As como de Fluoruros se deben a un origen natural, ya que los valores máximos reportados en este trabajo, resultaron ser menores que los valores reportados por Benitez en el 2013 en esta zona; además, el agua que se emplea en la empresa textil proviene de un pozo de la región, y cerca de la zona se encuentran áreas geotermales, y regiones de origen volcánico como la región donde se encuentra el Lago de Cuitzeo.

Coliformes Fecales y Coliformes Totales

Para el parámetro de coliformes fecales, el primer sitio se categoriza como Excelente, mientras el segundo como Aceptable, según el Índice de Calidad de Agua propuesto por la CONAGUA (2015) (Anexo 3.4).

En el sitio E2, los coliformes totales fue el único parámetro que excedió el LMP, mientras que para el sitio S1 se encuentra dentro del LMP. La diferencia en la cantidad de coliformes totales y fecales encontrada en los dos sitios, concuerda con que el agua residual de la empresa en el sitio S1, no es mezclada con agua residual doméstica; sin embargo, el valor que excede el LMP de coliformes totales en el estanque de tierra (sitio E2) puede deberse en gran medida a las excretas de animales de pastoreo que se observaron muy próximas al estanque.

Hongos y Levaduras

Los resultados del laboratorio Centro de Estudios en Medio Ambiente (CEMA) no mostraron hongos y levaduras en las muestras de agua tomadas del sitio S1, mientras que en el sitio E2 reportaron 60 UFC/mL de hongos y 120 UFC/mL de levaduras.

Los resultados anteriores son similares con los obtenidos en esta investigación ya que para los medios de cultivo sin colorante, se contabilizó una muy baja cantidad de UFC en el sitio S1 (2.70 log UFC/mL) y una cantidad mayor de 5.3 unidades logarítmicas más en el sitio E2 (8 log UFC/mL). Estos resultados podrían ser explicados con algunas

características ya mostradas en el agua del sitio S1: fluoruro en concentraciones que podrían inhibir el crecimiento fúngico, alta concentración de colorantes textiles no fijados y de auxiliares de tintura, además de un mayor contenido de sales. También podrían actuar como inhibidores el pH alcalino y las temperaturas por encima de los 40°C que no favorecen el crecimiento de hongos y levaduras; de acuerdo a Sen *et al*. (2016), la mayoría de los hongos poseen un crecimiento óptimo en condiciones de pH ácidos, normalmente en un rango entre 4 y 5.

6.3. Cuantificación de hongos por Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL)

La cuantificación por UFC se realizó con el fin de conocer la cantidad de hongos que se encontraban en un mililitro (1 mL) de agua en condiciones naturales y de esta forma determinar la abundancia de los hongos con capacidad para crecer en presencia de los colorantes.

Los resultados que se obtuvieron se muestran en la Figura 7. Puede notarse que para el sitio S1, ambos colorantes otorgaron las condiciones para obtener un mayor número de UFC, respecto al valor logarítmico de 2.7 UFC del medio sin colorante. Interesantemente el uso de colorantes incrementó en 1.3 a 5 unidades logarítmicas las UFC en este sitio S1. Esto coincide con el trabajo de investigación de Yang *et al*. (2009), en el que se expone que los microorganismos que se aíslan de ambientes contaminados por la industria textil están adaptados para crecer en condiciones extremas. Así que podría suponerse que los aislados AGA tienen un reconocimiento por las moléculas de colorante *Procion* empleadas en el presente trabajo.

Por su parte en el estanque (sitio E2) la situación encontrada fue diferente. Las UFC recuperadas sin colorante estuvieron en el nivel numérico alto, que es de alrededor de 8 unidades logarítmicas. En ese mismo nivel se encontraron los resultados con 100 mg/L de colorante (azul o amarillo). El estanque de tierra muestra una situación natural donde existe una abundancia fúngica adaptada a la presencia de los colorantes *Procion Blue* y *Procion Yellow*; es una circunstancia diferente al agua de salida S1 donde hay una menor abundancia fúngica adaptada a tales colorantes.

Por otra parte es también notorio que las concentraciones más altas de los colorantes: *Procion Blue* en ambos sitios, y *Procion Yellow* en el sitio E2, hace que disminuyan las UFC, como si existiera cierto efecto inhibitorio. Resulta coincidente con lo reportado por Guzmán-Hernández (2017) y Senthilkumar *et al*., (2012), quienes al trabajar con los hongos *Bjerkandera adusta* y *Curvularia* respectivamente, concluyeron que estos organismos crecen y se desarrollan mejor cuando se disminuye la concentración de los colorantes.

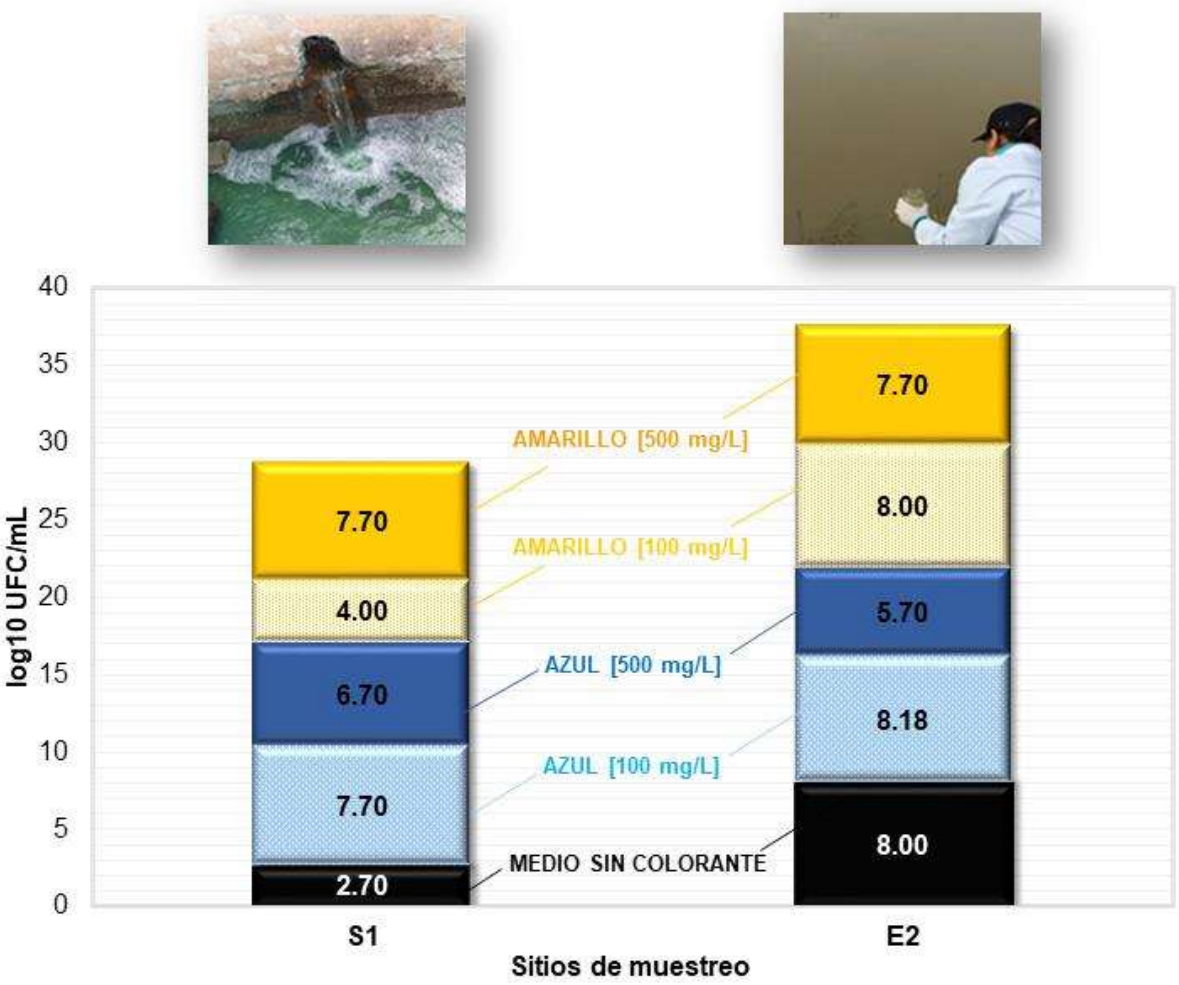


Figura 7. Comparación de las UFC de hongos obtenidos en los dos sitios de muestreo en medio sin colorante (control) y con colorantes *Procion Blue* y *Procion Yellow*.

6.4. Aislamiento y selección de hongos

De las colonias fúngicas que crecieron por el método de diluciones en serie, se realizó una primera selección con base en el buen crecimiento que presentaron en el medio sólido PDA con los colorantes *Procion*. Se obtuvieron un total de 30 aislados fúngicos de los dos sitios muestreados, 14 de ellos provenientes del sitio S1, y 16 del sitio E2. La descripción del origen y de la morfología a las 72 horas para los 30 aislados fúngicos se encuentran reportadas en el Cuadro 5.

Posteriormente, del total de aislados se realizó una segunda selección para obtener aquellos con alguna capacidad decolorativa (observada a simple vista) en medio sólido que tenía las concentraciones de 100 y 500 mg/L de colorante. Del sitio S1 se seleccionaron a los aislados AGA2 y AGA3; del sitio E2 se eligieron AGA10, AGA11 y AGA29. Es importante resaltar que se eligió al aislado AGA2 como un control negativo, ya que aunque creció en presencia de ambos colorantes, no mostró capacidad decolorativa ni absorción que cambiara de color su colonia.

En el Cuadro 5 se resalta con fondo gris la descripción morfológica colonial los cinco aislados seleccionados.

Cuadro 5. Morfología colonial a las 72 horas y características representativas de los 30 aislados fúngicos, obtenidos en los dos sitios de muestreo, y *B. adusta*. En fondo gris se resaltan los cinco aislados fúngicos seleccionados para el presente trabajo.

Aislados fúngicos	Forma	Elevación	Margen	Textura	Color	Concentración del colorante en medio PDA (mg/L)
AGA1 [1]	filamentosa	plana	filamentoso	polvosa	verde-orégano claro	100 [AZ]
AGA2 [1]	circular	plana	filamentoso	polvosa	negro-gris	500 [AZ]
AGA3 [1]	circular	algodonosa	filamentoso	polvosa	blanco	500 [AZ]
AGA4 [1]	circular	umbilicada	espiculado	polvosa	verde oscuro	100 [AMA]
AGA5 [1]	filamentosa	convexa	filamentoso	polvosa	verde claro(centro), verde oscuro (orilla)	500 [AMA]
AGA6 [1]	circular	rugosa	espiculado	cremosa	rosa	100 [AMA]
AGA7 [2]	filamentosa	convexa	filamentoso	polvosa	verde (centro), blanco (orilla)	100 [AZ]
AGA9 [2]	filamentosa	convexa	filamentoso	polvosa	verde-gris	100 [AZ]
AGA10 [2]	circular	convexa	espiculado	polvosa	azul (centro), blanco (orilla)	500 [AZ]
AGA11 [2]	circular	convexa	filamentoso	polvosa	morado-verde	500 [AZ]
AGA12 [2]	irregular	convexa	filamentoso	cremosa	rosa-amarillo	500 [AMA]
AGA13 [2]	filamentosa	convexa	filamentoso	polvosa	verde-negro-gris	500 [AMA]
AGA14 [2]	filamentosa	algodonosa	filamentoso	polvosa	blanco	100 [AMA]
AGA15 [2]	circular	umbilicada	espiculado	polvosa	amarillo-café	100 [AMA]
AGA16 [2]	filamentosa	convexa	filamentoso	polvosa	verde orégano- azul	500 [AMA]
AGA17 [2]	irregular	convexa	espiculado	polvosa	gris (centro), blanco (orilla)	100 [AMA]
AGA18 [1]	filamentosa	umbilicada	espiculado	polvosa	blanco	100 [AZ]
AGA19 [1]	circular	plana	filamentoso	polvosa	café-negro	100 [AZ]
AGA20 [1]	filamentosa	plana	filamentoso	polvosa	gris-negro	500 [AMA]
AGA22 [1]	filamentosa	plana	espiculado	polvosa	rosa	500 [AMA]
AGA23 [1]	filamentosa	elevada	espiculado	polvosa	verde-gris	100 [AMA]
AGA24 [1]	filamentosa	elevada	espiculado	polvosa	verde-gris (centro), rosa (orilla)	500 [AMA]
AGA25 [1]	filamentosa	plana	espiculado	polvosa	verde-gris	500 [AMA]
AGA29 [2]	circular	sumergida en agar	filamentoso	polvosa	verde oscuro-gris	500 [AZ]
AGA30 [2]	filamentosa	convexa	filamentoso	polvosa	gris-negro	500 [AZ]
AGA36 [2]	circular	cóncava-hexagonal	entero	polvosa	azul-blanco	100 [AZ]
AGA49 [2]	filamentosa	plana	filamentoso	polvosa	gris (centro), rosa (orilla)	500 [AMA]
AGA51 [2]	filamentosa	plana	filamentoso	polvosa	gris (centro), rosa (orilla)	500 [AMA]
AGA52 [2]	circular	convexa	espiculado	polvosa	gris (centro), rosa (orilla)	100 [AMA]
AGA54 [1]	circular	convexa	entero	polvosa	azul fuerte	100 [AZ]
B. adusta	circular concéntrica	algodonosa	anillos enteros	polvosa	blanco	NA

[1] : Aislados fúngicos provenientes de sitio S1; [2] : Aislados fúngicos provenientes de sitio E2; [AZ]: Provienen de una siembra en colorante *Procion Blue H-ERD*; [AMA]: Provienen de una siembra en colorante *Procion Yellow H-E4R;* NA: No Aplica.

Cabe resaltar que los cinco AGA formaron colonias de forma circular con textura polvosa; y en su mayoría éstas presentaron margen filamentoso, a excepción de

AGA10 que exhibió un margen espiculado; en todos los casos los aislados provinieron de medios donde el colorante azul actuó como seleccionador; esto fue así porque el colorante amarillo no mostró ser decolorado en estos primeros experimentos.

6.5. Identificación macroscópica de decoloración del medio y coloración colonial

Con la intención de identificar el comportamiento fúngico frente a los colorantes, los cinco aislados AGA y *Bjerkandera adusta* se inocularon en los medios sólidos PDA con y sin colorante (*Procion Blue H-ERD* o *Procion Yellow H-E4R*). Se registró: a) un cambio en la coloración colonial que manifestara algún mecanismo de biosorción o adsorción (lo cual se manifestaría con coloración colonial diferente a la del medio sin colorante, que se muestra en el Anexo 4.1); b) una decoloración del medio de cultivo que diera indicios de una excreción enzimática promotora de la decoloración (en este caso se esperaría visualizar halos de decoloración).

Los resultados se ilustran en la Figura 8. A través de medios círculos se representan las colonias, y se indica la capacidad de biosorber o adsorber el colorante mediante el relleno coloreado del medio círculo. En el caso de que las colonias hubieran mostrado capacidad de decoloración, ésta se ha ilustrado como líneas punteadas fuera del medio círculo. Entre corchetes se muestra la relación cualitativa entre el [CAMBIO DE COLOR EN LA COLONIA / DECOLORACIÓN DEL MEDIO]. El aislado AGA 2 fue usado como control negativo.

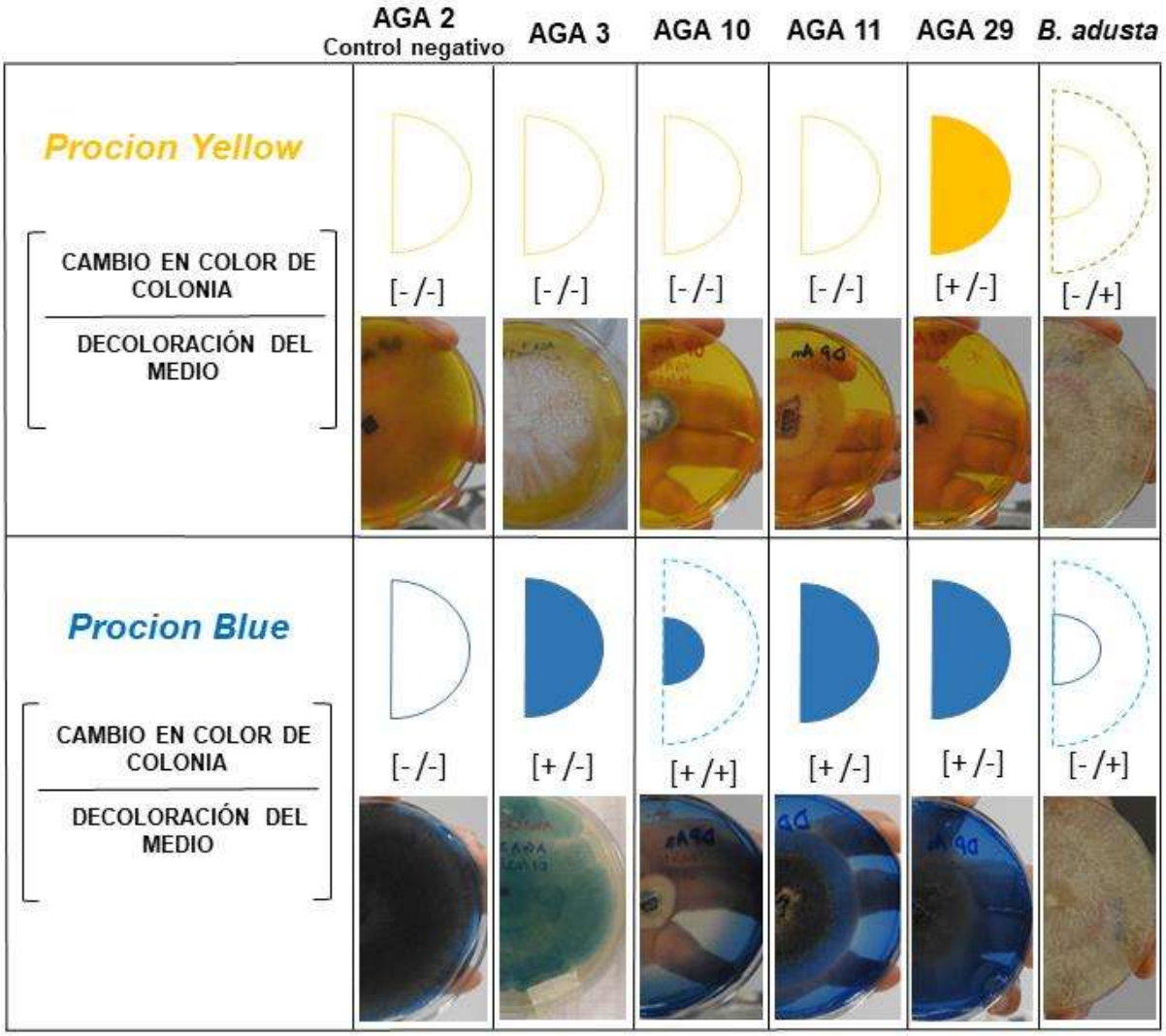


Figura 8. Cambio de coloración colonial y decoloración de los aislados fúngicos y *B. adusta* en medio sólido PDA con colorante *Procion Yellow* y *Procion Blue* en concentración de 500 mg/L. Los medios círculos representan la colonia y el reborde punteado la presencia de decoloración. Entre corchetes se anota la relación cualitativa entre [CAMBIO DE COLOR EN LA COLONIA/DECOLORACIÓN DEL MEDIO].

En la Figura 8 se observa que los aislados AGA3, 10, 11, 29 y *B. adusta* crecidos en los medios con *Procion Blue*, si presentan alguna estrategia para enfrentar a esta molécula ya sea mediante halos de decoloración o algún proceso de biosorción o adsorción. Al realizar una comparación más específica de esas respuestas fúngicas frente al colorante azul, se observan diferencias importantes respecto a *B. adusta* cuya respuesta [CAMBIO DE COLOR EN LA COLONIA / DECOLORACIÓN DEL MEDIO] es [-/+]:

- El aislado AGA10 tiene un tipo de respuesta [+/+], es decir, realiza una decoloración extensa en el medio de cultivo mucho más allá de su límite de crecimiento desde el primer día de su inoculación, y además, su colonia adsorbe o biosorbe el colorante (fotografía en Figura 8).
- Los aislados AGA3, AGA11 y AGA29 son [+/-], lo cual implica que adsorben o biosorben pero no decoloran.
- *B. adusta* muestra una respuesta [-/+], su decoloración es extensa y lejana al límite del crecimiento desde los primeros días de inoculación. Además en ningún momento adquiere color colonial.

Debe resaltarse que existen múltiples reportes que indican que *B. adusta* posee un sistema enzimático ligninolítico no específico que le permite decolorar tintes de varias clases estructurales. De acuerdo a Heinfling *et al*. (1997), son las exoenzimas peroxidasa las responsables de esta actividad, y en 2007 Eichlerová *et al*. incluyeron también como agentes enzimáticos a la lacasa y a la manganeso peroxidasa (MnP).

Probablemente la decoloración por parte de *B. adusta* al tinte *Procion Blue* usado en este trabajo, fue realizada mediante un proceso enzimático extracelular como los señalados por los autores anteriores. Esto queda de manifiesto por el tipo de decoloración dispersa donde se percibe la difusión de una sustancia que decolora extracelularmente. Comparativamente y debido al tipo dispersivo de la decoloración encontrada, podría sugerirse que el aislado AGA10 desarrolló también un proceso enzimático extracelular. Se requerirían estudios posteriores para comprobarlo.

Para el colorante azul, los aislados AGA3, AGA11 y AGA29 no mostraron una excreción enzimática debido a que no formaron halos de decoloración, sin embargo, estos aislados AGA mostraron cambio en la coloración colonial en este colorante; por tanto se sugiere que están utilizando otras vías de decoloración no enzimáticas tales como la biosorción o la adsorción. Existen diversos reportes de hongos como *Myrothecium verrucaria*, *Ganoderma* sp, *Pleurotus ostreatus*, *Pichia* sp. y *Penicillium* sp., capaces de decolorar mediante adsorción de los tintes sobre la superficie del micelio (Sumathi y Manju, 2000; Múnera *et al.,* 2017), y que permiten validar esta posibilidad.

En relación al colorante *Procion Yellow*, solamente AGA29 y *B. adusta* mostraron alguna estrategia para afrontarlo. Debe resaltarse que las maneras de responder de ambos hongos es muy diferente: el primero parece biosorber o adsorber, mientras que el segundo decolora amplia y dispersivamente. En *B. adusta* existió una respuesta idéntica cuando decoloró al *Procion Blue* respecto a cuando lo hizo con el *Procion Yellow*, mostrando así que la actividad enzimática extracelular de este hongo afronta a ambos colorantes indistintamente.

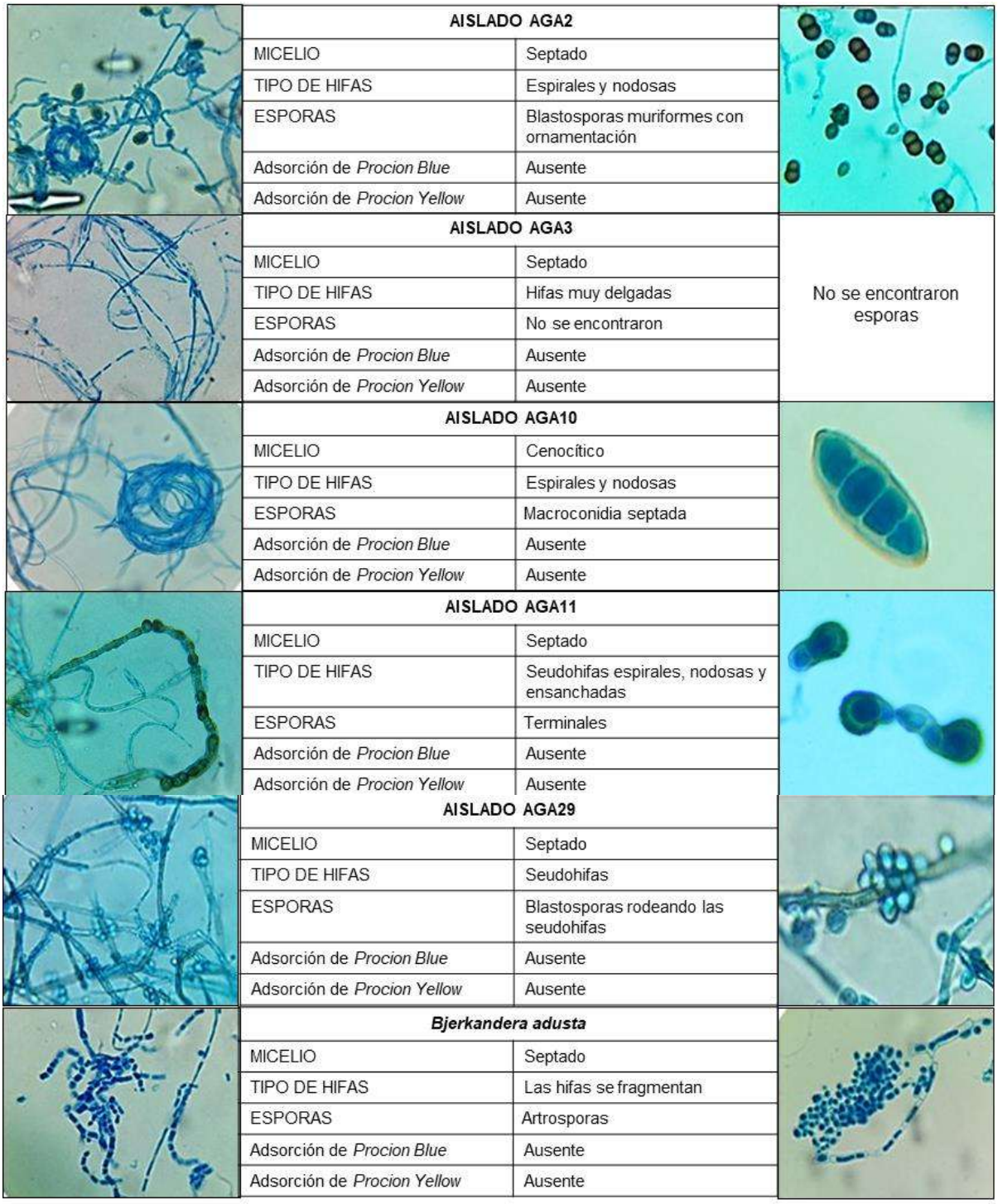
6.6. Descripción de la morfología microscópica y observación de procesos de biosorción o de adsorción

Morfología microscópica

Para los cinco aislados fúngicos y la cepa *B. adusta* se realizaron tinciones con azul de lactofenol para poder conocer su estructura microscópica más precisa. Los resultados se muestran en la Figura 9. Puede observarse que los aislados fúngicos AGA2, AGA3, AGA11, AGA29 y la cepa *B. adusta* presentaron micelio septado, mientras que únicamente AGA10 mostró micelio cenocítico; además, las hifas de los aislados AGA2, AGA10 y AGA11 se encontraron enrolladas en forma de anillos.

Por otro lado, la presencia de esporas se observó en todos los hongos a excepción de AGA3 (es probable que no se encontrara en un estadío reproductivo al momento de revisarlo, porque no se encontraron conidios). En AGA2 se observaron blastosporas con conidióforos pobremente desarrollados, células conidiogenas globosas o simples y conidios septados longitudinal y transversalmente (muriformes), los cuales presentan dos o más células, un marcado aumento de tamaño y una superficie ornamentada con espinas. El aislado AGA10 mostró esporas macroconidías septadas, en forma de barca de pared delgada y lisa con tres septos; mientras que *B. adusta* se distinguió por la producción de conidios de tipo de artrosporas (provenientes de la fragmentación de hifas para la producción de artroconidios), estas estructuras han sido documentadas en esta especie por Rajchenberg (1996). El aislado AGA11 presentó esporas terminales y seudohifas ensanchadas y vesiculosas; y el aislado AGA29 exhibió conidios esféricos-ovalados de una sola célula en agrupaciones de blastosporas

rodeando las seudohifas, con conidióforos ausentes, siendo el conidio transparente mientras que la hifa no.



AISLADO AGA2	
MICELIO	Septado
TIPO DE HIFAS	Espirales y nodosas
ESPORAS	Blastosporas muriformes con ornamentación
Adsorción de *Procion Blue*	Ausente
Adsorción de *Procion Yellow*	Ausente

AISLADO AGA3	
MICELIO	Septado
TIPO DE HIFAS	Hifas muy delgadas
ESPORAS	No se encontraron
Adsorción de *Procion Blue*	Ausente
Adsorción de *Procion Yellow*	Ausente

No se encontraron esporas

AISLADO AGA10	
MICELIO	Cenocítico
TIPO DE HIFAS	Espirales y nodosas
ESPORAS	Macroconidia septada
Adsorción de *Procion Blue*	Ausente
Adsorción de *Procion Yellow*	Ausente

AISLADO AGA11	
MICELIO	Septado
TIPO DE HIFAS	Seudohifas espirales, nodosas y ensanchadas
ESPORAS	Terminales
Adsorción de *Procion Blue*	Ausente
Adsorción de *Procion Yellow*	Ausente

AISLADO AGA29	
MICELIO	Septado
TIPO DE HIFAS	Seudohifas
ESPORAS	Blastosporas rodeando las seudohifas
Adsorción de *Procion Blue*	Ausente
Adsorción de *Procion Yellow*	Ausente

Bjerkandera adusta	
MICELIO	Septado
TIPO DE HIFAS	Las hifas se fragmentan
ESPORAS	Artrosporas
Adsorción de *Procion Blue*	Ausente
Adsorción de *Procion Yellow*	Ausente

Figura 9. Características microscópicas de los aislados fúngicos AGA2, AGA3, AGA10, AGA11, AGA29 y la cepa *Bjerkandera adusta.* Morfología de hifas y esporas.

Observación microscópica de los procesos de biosorción o adsorción

Se ha definido la biosorción como la acumulación de sustancias químicas por la biomasa microbiana en el interior celular (Tsezos y Bell, 1989). De acuerdo a Cortazar-Martínez *et al*. (2012), para algunos hongos la decoloración puede ser resultado de esta retención física del colorante en la biomasa fúngica.

Al realizar la observación microscópica sin azul de lactofenol a partir de los hongos crecidos previamente en medio con colorante (azul y amarillo), no se visualizó el proceso de biosorción en las hifas de ninguno de los aislados fúngicos ni de *B. adusta* (Anexo 4.2); es decir, no se observó color azul o amarillo tiñendo el interior celular. Por tanto se establece como resultado que no se realizó en ningún caso el proceso de biosorción.

En lo relativo al mecanismo de adsorción o bioadsorción, el cual es descrito como un proceso fisicoquímico de superficie donde una sustancia solo queda acumulada por el contacto con la superficie exterior de una célula, éste no logró verse por la microscopía óptica convencional usada. Sin embargo, aunque la capa de colorante que cubre una hifa no pudo ser vista en el microscopio, la adquisición de color por parte de las colonias si nos expone la existencia del fenómeno.

Es decir, para los aislados AGA3,10,11 y 29 que si adquirieron color colonial (Figura 8), existe la posibilidad de que el mecanismo desarrollado para afrontar los colorantes sea el de una acumulación en su superficie o adsorción. Esto sería probable ya que de acuerdo a Gautam *et al*. (2014), los adsorbentes más usados en la actualidad son microorganismos tales como algas, hongos y levaduras.

Por su parte, en la observación microscópica *B. adusta* no presentó tampoco ningún tipo de coloración membranal. Eso coincide con lo descrito por Singh (2006) y por Rybczyńska-Tkaczyk *et al.* (2020), donde exponen de forma particular que el principal mecanismo para la decoloración de los tintes llevado a cabo por *B. adusta* es la biodegradación enzimática extracelular. Rybczyńska-Tkaczyk *et al.,* realizaron su experimentación con la cepa *B. adusta* CCBAS 930 y reportaron que eliminó los

colorantes de antraquinona (*alizarina azul negro B* y *azul ácido 129*) principalmente por biodegradación (86.50–89.22%) en lugar de biosorción (9.91–12.67%).

Además, en una investigación realizada por Guzmán-Hernández (2017), en la cual analizó de forma cualitativa los procesos de bioadsorción y bioabsorción, llevados a cabo por el hongo *B. adusta* de los colorantes: *amarillo remazol*, *naranja remazol* y *rojo remazol,* en medio de cultivo sólido de Sales Minerales*,* y reportó que en la observación microscópica de las hifas de este hongo no se observó bioabsorción ni bioadsorción con ninguno de los colorantes.

6.7. Cinéticas de crecimiento y pH óptimo

El trabajo con microorganismos obliga a determinar de forma inicial su crecimiento mediante una cinética. Para la presente investigación se llevaron a cabo las curvas de crecimiento a diferentes pH a efecto de conocer las mejores condiciones de laboratorio para realizar los posteriores experimentos. Se evaluaron tres diferentes valores de pH (4, 5.91 y 8). El primero con la intención de saber si es mejor un pH más ácido; el segundo para saber si el pH del medio era el óptimo; y el último para reconocer si a pH alcalino (que es el pH aproximado del efluente) crecerían mejor.

Los resultados mostraron que el pH óptimo en todos los casos fue el del medio PDA sin modificar (5.91), por esa razón se presentan en las Figuras 10, 11 y 12 las cinéticas de crecimiento que como base se considerarán en este trabajo de tesis.

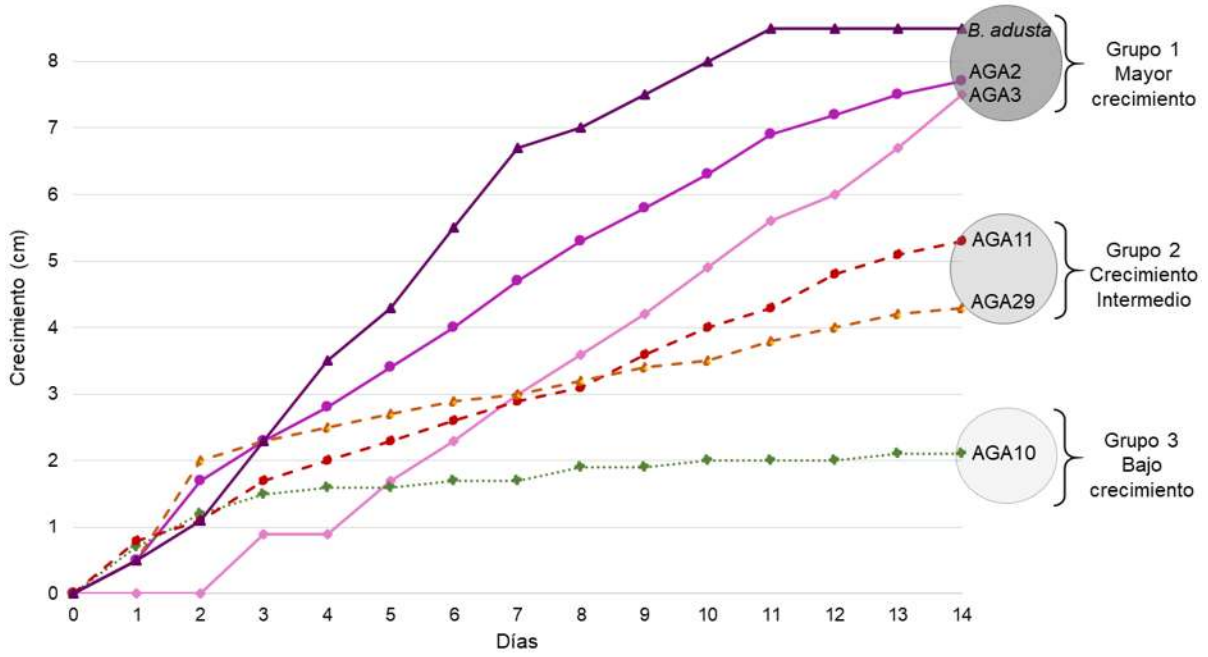


Figura 10. Cinéticas de crecimiento en medio sólido PDA de los aislados fúngicos y *B. adusta* con pH óptimo de 5.91.

De acuerdo a los resultados obtenidos, en la Figura 10 se pueden observar tres agrupaciones que permiten definir tres categorías para reconocer el crecimiento de los aislados fúngicos. El Grupo 1 asocia a los aislados AGA2, AGA3 y *B. adusta,* ya que su crecimiento estuvo entre 6.5 cm y 8.5 cm; el Grupo 2, está integrado por los aislados AGA11 y AGA29, cuyo crecimiento se encontró entre 4.0 cm a 6.4 cm; finalmente el Grupo 3, muestra al aislado AGA10, cuyo crecimiento es bajo, menor a 3.9 cm. Esta escala relativa de crecimiento seguirá siendo usada como referencia en todas las cinéticas de crecimiento en medio sólido.

6.8. Cinéticas de crecimiento en presencia de colorantes

Cinéticas de crecimiento en presencia de Procion Blue en medio PDA

A efecto de reconocer algún cambio que pudiera ocurrir en el crecimiento fúngico de los aislados y *B. adusta* cuando se enfrentan a los colorantes (Anexo 4.3), se realizaron cinéticas a pH 5.91 y con una concentración única de 500 mg/L del colorante. Los resultados con colorante *Procion Blue* (Figura 11), muestran que todos los aislados

AGA y la cepa *B. adusta* se mantienen en la misma categoría de crecimiento establecida para el crecimiento en medio PDA con pH óptimo sin colorante.

Cinéticas de crecimiento en presencia de Procion Yellow en medio PDA

Los resultados que corresponden al crecimiento en colorante *Procion Yellow* (Anexo 4.4), mostraron que los aislados AGA y la cepa *B. adusta* también se mantienen en la misma categoría de crecimiento que presentaron en el medio PDA con pH óptimo sin colorante y con colorante *Procion Blue* (Figura 12).

Por lo tanto debe destacarse que la concentración de 500 mg/L de colorante (azul o amarillo) en el medio donde crecieron los aislados fúngicos y la cepa *B. adusta,* no representó un factor que inhibiera o promoviera el crecimiento para estos hongos.

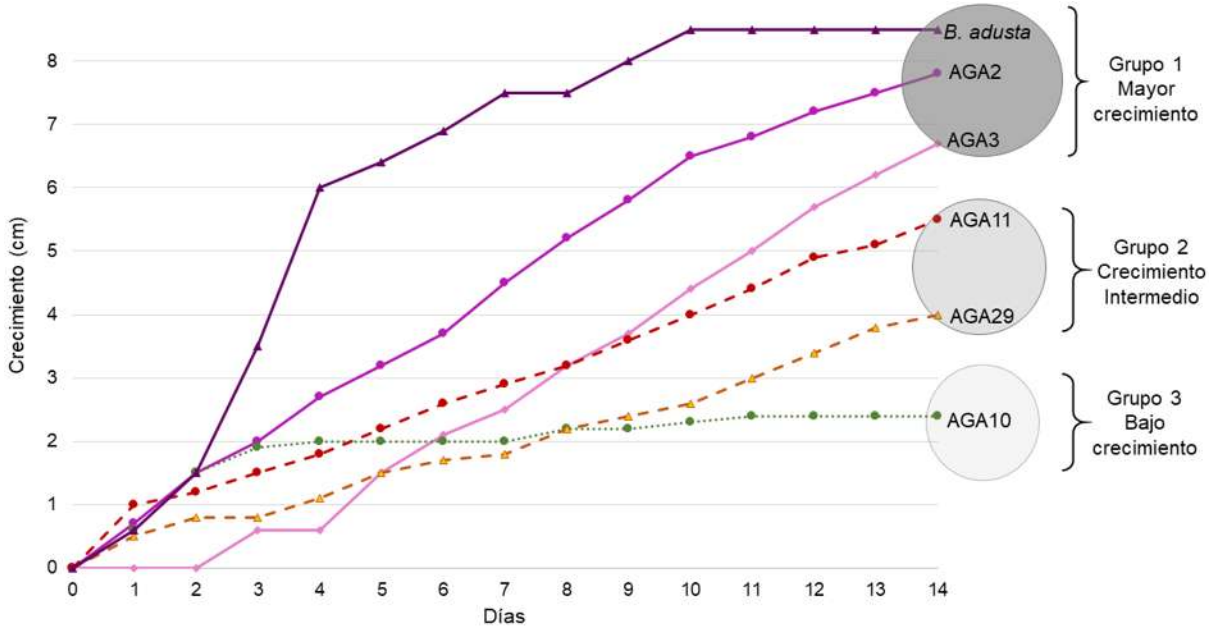


Figura 11. Cinéticas de crecimiento en medio sólido PDA con colorante *Procion Blue H-ERD* de los aislados fúngicos y *B. adusta* con pH óptimo de 5.91.

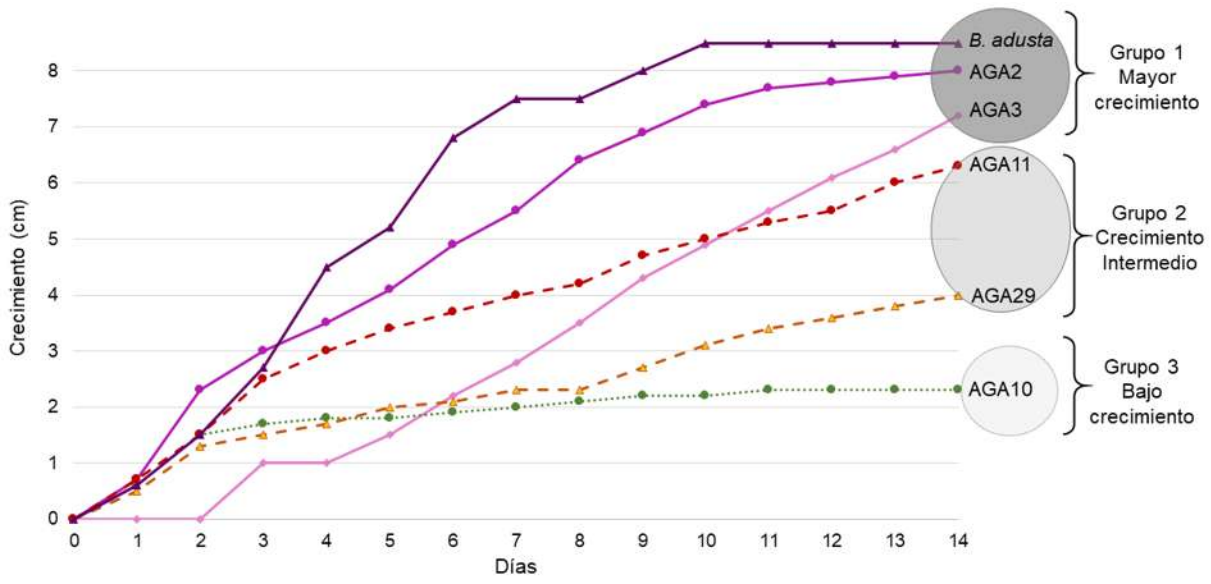


Figura 12. Cinéticas de crecimiento en medio sólido PDA con colorante *Procion Yellow H-E4R* de los aislados fúngicos y *B. adusta* con pH óptimo de 5.91.

6.9. Cinéticas de decoloración en medio PDA (con nutrientes)

Cinéticas de decoloración en medio sólido PDA con Procion Blue

En este trabajo se llevaron a cabo las curvas de decoloracion con el pH óptimo (5.91), a fin de comparar las capacidades de decoloración de los aislados AGA respecto a *B. adusta* en presencia de los colorantes *Procion.*

Es importante recalcar que los experimentos realizados contemplan a la decoloración como el resultado de la ruptura del grupo cromóforo en una molécula de colorante y no siempre implica la degradación completa de la molécula del colorante. La diferencia anterior ha sido destacada por otros autores como Guillard *et al*., 2003.

Los resultados de las cinéticas de decoloración en medio sólido con PDA preparado con 500 mg/L de *Procion Blue* se presenta en la Figura 13. Se observan líneas horizontales sin cambio en la decoloración para AGA3, AGA11, AGA29 y el control AGA2; en ninguno de esos casos se presentó capacidad decolorativa relacionada con una excreción extracelular de enzimas y por eso se han agrupado en un mismo conjunto de No Decoloradores.

Por el contrario, el aislado AGA 10 y la cepa *B. adusta* si realizaron una decoloración del medio con el colorante *Procion Blue*. En este punto es importante destacar las diferencias en esa actividad decolorativa.

El aislado AGA10 decoloró en 25 días el 88.24% del colorante presente en la caja Petri (%D=porcentaje de decoloración) y lo realizó a una velocidad (VD=velocidad de decoloración) de 0.3 cm/día, que equivale a 0.44 mg/día (que representa su CD=capacidad de decoloración).

B. adusta decoloró en nueve días el 100% del colorante presente en la caja Petri (%D=100%) y lo realizó a una VD=0.94 cm/día que equivale a una CD de 1.39 mg/día. Los resultados anteriores implican que *B. adusta* supera 3 veces a AGA10 en su velocidad y capacidad de decoloración.

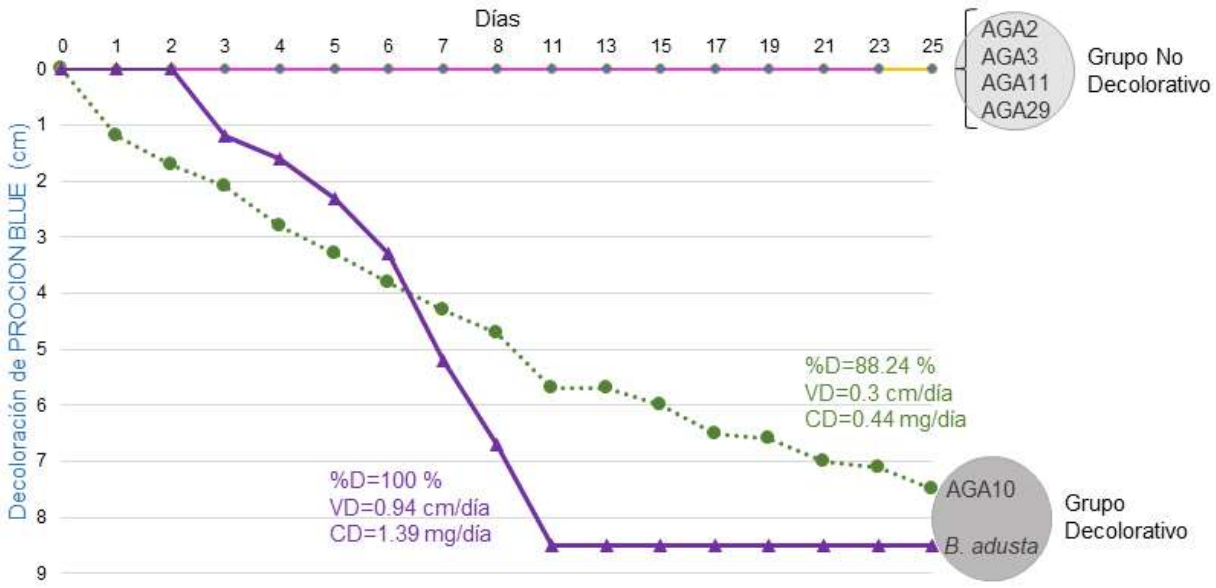


Figura 13. Cinéticas de decoloración en medio sólido PDA con colorante *Procion Blue H-ERD* de los aislados fúngicos y *B. adusta*.

Un resultado relevante en el presente trabajo es el relativo al momento en que AGA10 y *B. adusta* decoloran. En términos generales para el colorante *Procion Blue* el proceso de decoloración inició desde el día 0 de la cinética y terminó en el día 25 para AGA10, y para *B. adusta* comenzó en el día 2 y finalizó en el día 11, esta actividad la realizaron los dos hongos en la fase exponencial (Figuras 11 y 13). Como dato comparativo,

Cardona *et al*. (2009), reportó que en los perfiles de degradación del tinte *orange II* los hongos *Phanerochaete chrysosporium* y *P. sórdida* (hongos de la pudrición blanca), mostraron una alta velocidad de decoloración durante su fase de crecimiento exponencial.

Cinéticas de decoloración en medio sólido PDA con Procion Yellow

En relación al comportamiento frente al colorante *Procion Yellow*, únicamente *B. adusta* mostró capacidad para decolorar (Figura 14). Los aislados AGA no mostraron indicios de excreción enzimática que eliminara el color amarillo del medio PDA.

Cabe destacar que en los trabajos de Rodriguez *et al.* (1999), y Tinoco y Vazquez-Duhalt (2007), evaluaron la decoloración del tinte *Procion Yellow H-E4R* por los hongos ligninolíticos *Phanerochaete chrysosporium* (ATCC-24725), *Phanerochaete ostreatus* (IE8), y *Trametes hispida* (8260). En ningún caso lograron decolorar el tinte, lo cual demuestra que existen hongos que no expresan o que no poseen capacidad decolorativa frente a algún colorante.

De forma particular la descripción de la capacidad decolorativa de *B. adusta* ante *Procion Yellow* es la siguiente: en cinco días decoloró el 100% del colorante presente en la caja Petri (%D=100%) y lo realizó a una VD=1.70 cm/día que equivale a una CD de 2.50 mg/día. En el trabajo de Tinoco y Vazquez-Duhalt (2007) reportaron también que *B. adusta* logró la decoloración de este colorante y logró el mismo efecto frente a una amplia gama de tintes industriales.

Puede notarse que los valores de VD y de CD son mayores en relación al colorante azul. De acuerdo a Saratale *et al.* (2011), las variaciones de decoloración para diferentes tintes podrían atribuirse a la diversidad estructural y complejidad que estos presentan, particularmente de la naturaleza y posición de grupos sustituyentes en los anillos aromáticos, ya que la biodecolorización del tinte depende en gran medida de la capacidad de extracción de los electrones de los grupos funcionales en la proximidad del enlace azo.

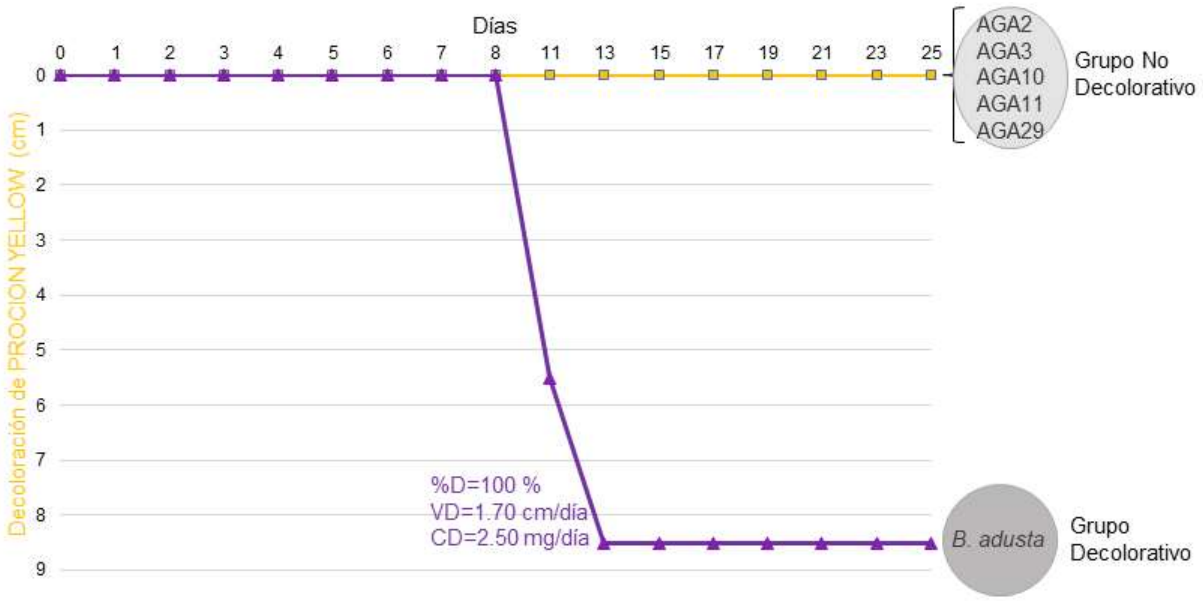


Figura 14. Cinéticas de decoloración en medio sólido PDA con colorante *Procion Yellow H-E4R* de los aislados fúngicos y *B. adusta*.

Para el colorante *Procion Yellow* el proceso de decoloración de *B. adusta* inició en el día 8 de la cinética y concluyó en el día 13, esa actividad la realizó durante la fase exponencial y parte de la estacionaria (Figuras 12 y 14); este resultado coincide con lo reportado por Holguín *et al*. (2017), para el hongo *B. adusta*, el cual se tardó siete días para empezar a mostrar actividad decolorativa frente a los colorantes reactivos de la familia *Bezaktiv*.

6.10. Cinéticas de decoloración en medio sin nutrientes

A efecto de conocer si los aislados AGA pudieran mostrar un mejor desempeño decolorativo respecto a *B. adusta,* se cambiaron algunas condiciones nutritivas. De esta forma se realizaron cinéticas de crecimiento sin nutrientes:

- Primeramente se llevaron a cabo cinéticas solo en Agar Bacteriológico y el colorante (azul o amarillo) a una concentración de 500 mg/L (Anexo 4.5 y 4.6).
- Posteriormente, solo para AGA10 y *B. adusta* se realizaron los experimentos en agua con el colorante a una concentración de 500 mg/L.

Los resultados en agar PDA, Agar Bacteriológico (AB) y Agua en el colorante *Procion Blue*, se muestran en el Cuadro 6. En relación a *B. adusta* es notorio que la escasez de nutrientes no modifica su respuesta decolorativa en cualquiera de los dos medios sólidos (PDA o AB); sus valores de porcentaje de decoloración (%D), velocidad de decoloración (VD), y capacidad de decoloración (CD) permanecen igual. Pero al realizar el experimento en medio líquido, la CD se incrementó poco más de 14 veces. Lo anterior coincide con los resultados de Choi *et al*. (2013), quienes reportaron que cuatro cepas de *B. adusta* (KUC8204, KUC8808, KUC9065 y KUC9107) aisladas de varios sustratos leñosos, presentaron tasas de decoloración distintas en medio sólido respecto al líquido; en el primer caso eliminaron más del 70% del color de los tintes, mientras que en el medio líquido obtuvieron mayores porcentajes de decoloración del orden de 90%. Esto podría deberse a que el hongo está en contacto con el colorante en una mayor proporción.

Por su parte, para AGA10 la circunstancia de deficiencia nutricional entre ambos medios sólidos si causó una disminución en sus capacidades decolorativas; logró decolorar solo el 51.76% del colorante azul (un 36% menos que en condiciones con suficientes nutrientes). De igual forma su capacidad decolorativa disminuyó a 0.26 mg/día (que son 0.18 mg menos al día). Pero al colocar al hongo AGA10 en el medio líquido, su capacidad decolorativa se incrementó en 56 veces respecto a sí misma en medio sólido. El medio líquido parece favorecer el contacto con el colorante y además resulta tener más similitudes con el agua residual de donde se aisló.

Inesperadamente el aislado AGA29, que no había mostrado competencias decolorativas en medio con nutrientes (PDA), en el medio sólido AB consiguió decolorar el 70.59% del tinte azul, y exhibió en 12 días una capacidad de 0.74 mg/día a una velocidad de 0.50 cm/día. Estas competencias superan en más del doble a los resultados con AGA10 cuando se creció en AB con colorante azul.

Olvera (2003), señala que en algunos de los hongos ligninolíticos se observa que la lignólisis ocurre durante el metabolismo secundario, es decir bajo condiciones de limitación de nutrientes, lo que permite que el hongo sintetice y secrete enzimas ligninolíticas que comiencen a fragmentar el polímero; esto podría ayudar a

comprender por qué al no adicionar nutrientes al medio, el hongo AGA29 presentó decoloración en este medio y no en un medio de mejor calidad nutritiva; posiblemente este hongo tomó como fuente de carbono al colorante.

Cuadro 6. Resumen de las competencias decolorativas de *Procion Blue* por parte de los hongos usados en este estudio. Se comparan los resultados de un medio con nutrientes (PDA), con un medio sin nutrientes (Agar Bacteriológico) y Agua.

	PORCENTAJE DE DECOLORACIÓN [%D] de *Procion Blue* (%)		VELOCIDAD DE DECOLORACIÓN [VD] de *Procion Blue* (cm/día)		CAPACIDAD DE DECOLORACIÓN [CD] de *Procion Blue* (mg/día)		
HONGO	PDA	Agar Bacteriológico	PDA	Agar Bacteriológico	PDA	Agar Bacteriológico	Agua
AGA2	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	nd*
AGA3	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	nd*
AGA10	**88.24**	**51.76**	**0.3**	**0.18**	**0.44**	**0.26**	**24.71**
AGA11	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	nd*
AGA29	**0**	**70.59**	**0**	**0.50**	**0**	**0.74**	nd*
B. adusta	**100**	**100**	**0.94**	**0.94**	**1.39**	**1.39**	**20.41**

*nd: no determinado.

Posteriormente, al realizar la prueba t de Student para comparar la decoloración entre AGA10 y *B. adusta* en el medio con el tinte *Procion Blue* con nutrientes, se obtuvo diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.002$), al igual que en el medio sin nutrientes ($p = <0.0001$).

De igual manera, al comparar la decoloración entre AGA29 y *B. adusta* en el medio con el tinte *Procion Blue* sin nutrientes, se obtuvo diferencia estadística ($p = 0.0009$). Por lo tanto, la decoloración es distinta entre los aislados AGA10 y AGA 29, en comparación con *B*. *adusta*.

En lo relativo al colorante *Procion Yellow,* los resultados en agar PDA, Agar Bacteriológico y Agua se muestran en el Cuadro 7. Puede advertirse que cuando *B.*

adusta se encuentra en buenas condiciones nutricionales en medio sólido, incrementa sus competencias decolorativas. Para comparar, hay que recordar que frente al colorante azul estas mismas competencias quedaban sin cambio.

Esas buenas condiciones nutricionales permitieron a *B. adusta* decolorar en cinco días el 100% del colorante en la placa, además, su capacidad decolorativa aumentó a 2.50 mg/día (que son 1.11 mg más al día, en comparación con *B. adusta* en el colorante *Procion Blue*).

Al igual que en los casos anteriores, cuando se desarrolla el hongo en el medio líquido se mejora la capacidad de decoloración. Esto se debe a que al agitar los cultivos líquidos se mejora la transferencia de oxígeno y distribución de nutrientes (en este caso la distribución del colorante), acción que no puede realizarse en un medio estacionario (Kaushik y Malik, 2009).

Esto se demuestra en el trabajo de Rigas y Dritsa (2006), quienes reportan una mayor eficiencia decolorativa del tinte *poly R-478* utilizando cepas de basidiomicetos en medio líquido con agitación, en comparación a medios en condiciones estáticas; la eficiencia de eliminación del tinte en los cultivos con agitación varió de 50.31 ± 6.72% a 93.4 ± 5.64%, mientras que en los cultivos estáticos varió de 26.14 ± 1.02% a 52.95 ± 0.97%.

Cuadro 7. Resumen de las competencias decolorativas de *Procion Yellow* por parte de los hongos usados en este estudio. Se comparan los resultados de un medio con nutrientes (PDA), con un medio sin nutrientes (Agar Bacteriológico) y Agua.

	PORCENTAJE DE DECOLORACIÓN [%D] de *Procion Yellow* (%)		VELOCIDAD DE DECOLORACIÓN [VD] de *Procion Yellow* (cm/día)		CAPACIDAD DE DECOLORACIÓN [CD] de *Procion Yellow* (mg/día)		
HONGO	PDA	Agar Bacteriológico	PDA	Agar Bacteriológico	PDA	Agar Bacteriológico	Agua
AGA2	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	nd*
AGA3	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	nd*
AGA10	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
AGA11	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	nd*
AGA29	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	nd*
B. adusta	**100**	**100**	**1.70**	**0.94**	**2.50**	**1.39**	**19.33**

*nd: no determinado.

7. RESUMEN DE RESULTADOS Y PERSPECTIVAS

La contaminación por colorantes textiles en nuestro país requiere trabajos de investigación que se dirijan a solucionar el problema ambiental que representan. En este sentido, la presente investigación se desarrolló con la intención de analizar una posible estrategia biológica en el manejo de aguas residuales con insumos biológicos locales. Se comparó el desempeño de las capacidades decolorativas de aislados fúngicos provenientes del agua residual de la misma empresa que emite la contaminación, respecto al hongo *Bjerkandera adusta*, conocido por su gran capacidad para decolorar estas moléculas.

Los resultados obtenidos se resumen a continuación.

1. El agua residual en la salida de la empresa (sitio S1) excede algunos Límites Máximos Permisibles (LMP) en los rubros de Temperatura, pH, Demanda Bioquímica de Oxígeno y Demanda Química de Oxígeno. Con esa información se puede considerar al efluente como óptimo para algún tipo de tratamiento.
2. Tanto el agua residual (sitio S1) como el agua almacenada en un estanque de tierra (sitio E2) pueden proveer hongos con capacidades decolorativas, potencialmente útiles para ser empleados en algún tratamiento biológico del agua. Es recomendable su aislamiento en concentraciones de 100 mg/L a 500 mg/L.
3. Tanto en el agua de salida como en el estanque se encontrarán hongos con respuestas diferenciales a los colorantes textiles; es necesario investigar más acerca de las razones por las que un colorante no es decolorado como en el caso del *Procion Yellow*, mientras que otro sí (*Procion Blue*).
4. Tanto en el agua de salida como en el estanque se encontrarán hongos que expresan capacidades decolorativas diferentes:
    - Los capaces de adsorber los colorantes en la superficie del micelio
    - Los capaces de adsorber los colorantes en la superficie del micelio y al mismo tiempo excretar sustancias decolorativas

5. No necesariamente los hongos que crezcan más rápidamente y con mayor biomasa serán los que presenten capacidades decolorativas. En el caso del aislado AGA10, presentó una buena capacidad decolorativa pero se localiza en un grupo de bajo crecimiento. Es importante realizar más estudios para intentar mejorar el crecimiento con cambios nutricionales o ambientales.
6. Las competencias decolorativas (porcentaje de decoloración, velocidad de decoloración y capacidad de decoloración) del aislado AGA10 estuvieron por debajo de las correspondientes a *Bjerkandera adusta* con respecto al colorante azul en los medios sólidos empleados. Sin embargo AGA10 posee mayor CD en medio acuoso preparado con 500 mg/L.
7. En relación al colorante amarillo no hubo respuesta decolorativa por ninguno de los aislados.
8. Con esta investigación, se observa por primera vez la capacidad de *B. adusta* para decolorar el colorante textil *Procion Blue H-ERD*, agregándolo a la lista de compuestos capaces de ser decolorados por esta especie.

8. CONCLUSIÓN

La Hipótesis de Trabajo fue:

Los cinco aislados fúngicos obtenidos del agua residual textil muestreada poseen capacidades decolorativas similares a las del hongo control positivo *Bjerkandera adusta****, cuando se encuentran en un medio con los colorantes DyStar™ Procion Blue H-ERD y Procion Yellow H-E4R.***

Se concluye que :

A. Cuatro aislados fúngicos (AGA2, AGA3, AGA11 y AGA29) obtenidos del agua residual textil muestreada no poseen capacidades decolorativas similares a las del hongo control positivo *Bjerkandera adusta* cuando se encuentran en un medio con el colorante DyStar™ *Procion Blue H-ERD.* **Pero el aislado AGA10 si muestra esas capacidades decolorativas, en menor proporción en medio sólido y en mayor proporción en medio acuoso.**

B. Ninguno de los cinco aislados fúngicos obtenidos del agua residual textil muestreada poseen capacidades decolorativas similares a las del hongo control positivo *Bjerkandera adusta* cuando se encuentran en un medio con el colorante DyStar™ *Procion Yellow H-E4R*.

9. LITERATURA CITADA

Alarcón-Herrera, M. T., Bundschuh, J., Nath, B., Nicolli, H. B., Gutierrez, M., Reyes-Gomez, V. M., y Sracek, O. 2013. **Co-occurrence of arsenic and fluoride in groundwater of semi-arid regions in Latin America: Genesis, mobility and remediation**. *Journal of Hazardous Materials*, 262, 960-969.

Alatorre, F. A. y Moeller, G. 2006. **Incluencia de las características Hidráulicas y geometrías de biofiltros empacados sobre la eliminación de un colorante Azo**. XV Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales. México.

Anastasi, A., Spina, F., Prigione, V., Tigini, V., Giansanti, P., y Varese, G. C. 2010. **Scale-up of a bioprocess for textile wastewater treatment using Bjerkandera adusta**. *Bioresource Technology*, 101(9), 3067-3075.

Anliker, R., Clarke, E. A. y Moser, P. 1981. **Use of the partition coefficient as an indicator of bio-accumulation tendency of dyestuffs in fish**. *Chemosphere*, 10: 263-274.

Aragón-Vallenas, J. C. 2012. **Optimización y reducción de costos del proceso de teñido de tejidos de poliéster/algodón sin alterar la solidez del lavado**. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional de Ingeniería. Lima, Perú. 98 *pp*.

Aranda, C. N. 2004. **Eutrofización y calidad del agua de una zona costera tropical**. Tesis de Doctorado. Programa Ciencias del mar Bienia 2000-2002. Departament d' ecologia. Universitat de Barcelona. 246 pp.

Argandoña, Z., L. E. y Macias, G. R. G. 2013. **Determinación de sólidos totales, suspendidos, sedimentados y volátiles, en el efluente de las lagunas de oxidación situadas en la parroquia Colón, Cantón Portoviejo, Provincia de Manabí, durante el período de marzo a septiembre 2013**. Tesis de Grado. Universidad Técnica de Manabí. Facultad de Ciencias Matemáticas Físicas y Químicas. Ingeniería Química. Portoviejo – Manabí – Ecuador.

Arroyave R. J. A., Garcés. G. L. F. y Mejía T. J. 2008. **Empleo del reactivo de Fenton para la degradación del colorante Tartrazina**. *Revista Lasallista De Investigación*, 6(1): 27-34.

Baldwin, T., Sakthianandeswaren, A., Curtis, J., Kumar, B., Smyth, G. K., Foote, S. y Handman, E. 2007. **Wound healing response is a major contributor to the severity of cutaneous leishmaniasis in the ear model of infection**. *Parasite Immunology*, 29: 501-513

Banat, I. M., Nigam, P., Singh, D., y Marchant, R. 1996. **Microbial decolorization of textile-dyecontaining effluents: A review**. *Bioresource Technology*, 58(3): 217–227.

Bansal, P., y Sud, D. 2011. **Photodegradation of commercial dye, Procion Blue HERD from real textile wastewater using nanocatalysts**. *Desalination*, 267(2-3): 244-249.

Bansal, P., y Sud, D. 2012. **Photodegradation of commercial dye, CI Reactive Blue 160 using ZnO nanopowder: Degradation pathway and identification of intermediates by GC/MS**. *Separation and Purification Technology*, 85: 112-119.

Barr, D. P. y Aust, S. D. 1994. **Mechanisms white-rot fungi use to degrade pollutants**. *Environmental Science & Technology*, 28(2):78A-87

Bauder, J., y Singler, A. 2017. **Alcalinidad, pH, y Sólidos Disueltos Totales**. Well Ecucated.

Beltran, J., y Rangel, J. 2012. **Modelación dinámica de los sólidos suspendidos totales en la humedad Jaboque, Bogotá, Colombia**. *Colombia Forestal*, 15(2): 191-205.

Benitez, A. S. 2013. **Evaluación de la calidad del agua potable en Acámbaro y Jerécuaro, Guanajuato**. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Tesis Maestria.

Brizola, S. L., Santos Domingues, F., Rosseto, F., de Cinque Almeida, V., Garcia, J. C., y Evelázio de Souza, N. 2013. **Simultaneous determination of textile dyes by Adsorptive Cathodic Stripping Voltammetry. Acta Scientiarum**. *Technology*, 35(2).

Cardona, M., Osorio, J. y Quintero, J. 2009. **Degradación de colorantes industriales con hongos ligninolíticos**. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia, 4*8: 27-37.

Carro, P. M. E. y Montoro, M. A. 2009. **Adsorción de arsénico en geomateriales. III Conferencia Sudamericana de Ingenieros Geotécnicos Jóvenes**. III Conferencia Sudamericana de Ingenieros Geotécnicos Jóvenes. Córdoba, Argentina.

Çetin, D., y Dönmez, G. 2006. **Decolorization of reactive dyes by mixed cultures isolated from textile effluent under anaerobic conditions**. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(7): 926-930.

Choi, Y. S., Seo, J. Y., Lee. H., Yoo. J., Jung. J., Kim. J. J. y Kim. G. H. 2013. **Decolorization and Detoxification of Wastewater Containing Industrial Dyes by *Bjerkandera adusta* KUC9065**. *Water Air Soil Pollut,* 225 (1801): 1-10.

CONAGUA. 2015. **Monitoreo de calidad del agua superficial con Indicadores**. Comisión Nacional del Agua. Consultado el 16 de Abril del 2020 de: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/145524/Monitoreo_de_calidad_del_agua_en_M_xico_2012-2015.pdf

Cortázar-Martínez, A., González-Ramírez, C. A., Coronel-Olivares, C., Escalante-Lozada, J. A., Castro-Rosas, J. y Villagomez-Ibarra, J. R. 2012. **Biotecnología aplicada a la degradación de colorantes de la industria textil**. *Universidad y Ciencias Trópico Húmedo*, 28(2): 187-199.

Cortina, D. C. F., y Márquez Ortiz, R. 2008. **Alternativa de tratamiento de aguas residuales de la industria textil**. México DF.

Dávila, G., y Vázquez-Duhalt, R. 2006. **Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales**. *Mensaje bioquímico*, 30(1), 29-55.

Eichlerová, I., Homolka, L., y Nerud, F. 2007. **Decolorization of high concentrations of synthetic dyes by the white rot fungus Bjerkandera *adusta* strain CCBAS 232**. *Dyes and Pigments*, 75(1): 38-44.

Elso, C. M., Roberts, L. J., Smyth, G. K., Thomson, R. J., Baldwin, T. M., Foote, S. J., y Handman, E. 2004. **Leishmaniasis host response loci (lmr13) modify disease severity through a Th1/Th2-independent pathway**. *Genes and Immunity*, 5: 93-100.

Encyclopedia of Life (EOL). 2020. ***Bjerkandera adusta* (Willd.) P. Karst. 1879**. Consultado el 16 de Abril del 2020 de: https://eol.org/pages/1009755/names

Fernández-González, J. y Henao-Jaramillo, L. 2007. **Hongos de la podredumbre blanca y fotocatálisis homogénea nanoestructurada con TiO2 como alternativa biotecnológica para la remoción del negro reactivo 5**. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana, Colombia. 164 *pp*.

Flores, T. G. E. 2004. **Evaluación de la contaminación generada por el vertido de aguas residuales provenientes de la industria textil en Zinapécuaro, Michoacán**. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. México D. F. 96 *pp*.

Garzón, R. 2009. **Cinética de degradación de colorantes textiles de diferentes clases químicas por hongos y bacterias inmovilizados sobre fibra de Agave tequilana Webber var. Azul**. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogota, Colombia.

Gautam, R. K., Mudhoo, A., Lofrano, G. y Chattopadhyaya, M. C. 2014. **Biomass-derived biosorbents for metal ions sequestration: Adsorbent modification and activation methods and adsorbent regeneration**. *Journal of environmental chemical engineering*, 2(1): 239-259.

Ghaly, A. E., Ananthashankar, R., Alhattab, M. y Ramakrishnan, V. V. 2014. **Production, Characterization and Treatment of Textile Effluents: A Critical Review**. *Journal of Chemical Engineering & Process Technology*, 5: 1

Ghosh, A., Kakali, M. Ghosh, S. K.y Bidyut, S. 2012. **Sources and toxicity of fluoride in the environment**. *Research on Chemical Intermediates*, 39(7): 2881–2915.

Glenn, J. K., y Gold, M. H. 1983. **Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium***. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(6), 1741-1747.

Global Biodiversity Information Facility (GBIF). 2020. ***Bjerkandera adusta* (Willd.) P.Karst**. Consultado el 16 de Abril del 2020 de: https://www.gbif.org/es/species/2543824

Guillard, C., Lanchheb, H., Houas, A., Ksibi, M., Elaloui, E. y Herrman, J. M. 2003. **Influence of chemical structure of dyes, of pH and of inorganic salts on their photocatalytic degradation by TiO2 comparison of the efficiency of powder and supported TiO2**. *Science Direct Journal of photochemistry and photobiology A: Chemistry*, 158: 27-36.

Guillard, C., Lanchheb, H., Houas, A., Ksibi, M., Elaloui, E. y Herrman, J. M. 2003. **Influence of chemical structure of dyes, of pH and of inorganic salts on their photocatalytic degradation by TiO2 comparison of the efficiency of powder and supported TiO2**. *Science Direct Journal of photochemistry and photobiology A: Chemistry*, 158: 27-36.

Guzmán-Hernández, D. 2017. **Determinación de la capacidad de decoloración de cuatro colorantes textiles por Bjerkandera adusta**. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. 67 *pp*.

Hammel, K. E. 1996. **Extracellular free radical biochemistry of ligninolitic fungi**. *New Journal of Chemistry*, 20(2):195-198.

Have, R., Hartmans,. S., Teunissen, P. J. M. y Field, J. A. 1998. **Purification and characterization of two lignin peroxidase isozymes produced by *Bjerkandera* sp. strain BOS55**. *Federation of European Biochemical Societies*, 422: 391-394.

Health NJ. 2017. **Hoja informativa sobre sustancias peligrosas**. Consultado en línea el 26 de Junio del 2020 en: https://www.nj.gov/health/eoh/rtkweb/documents/fs/1097sp.pdf

Heinfling, A., Bergbauer, M., y Szewzyk, U. 1997. **Biodegradation of azo and phthalocyanine dyes by *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta***. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48(2), 261-266.

Henao O. N., y Ramírez Betancur, S. 2016. **Tratamiento de aguas residuales del sector textil mediante proceso acoplado electro-coagulación-electro-oxidación**. Bachelor's thesis. Universidad EAFIT.

Hessel, C., Allegre, C., Maisseu, M., Charbit, F., y Moulin, P. 2007. **Guidelines and legislation for dye house effluents**. *Journal of Environmental Management*, 83(2): 171–180.

Hidalgo, H. S. 2004. **Reutilización de residuos de rapa para la eliminación de metales tóxicos en efluentes líquidos**. Proyecto/Trabajo final de carrera. Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Industrial de Barcelona. Universitat Politècnica de Catalunya. España. 94 pp.

Holguín, J. F. M., Escobar, A. E. O., Monroy, R. D. P. R., y Muñoz, G. M. M. 2017. **Remoción de colorantes reactivos empleando el hongo Bjerkandera adusta**. *Informador técnico*, 81(2): 142-150.

INEGI. 2020. **Colección de estudios sectoriales y regionales: Conociendo la Industria textil y de la confección**. Consultado de: https://www.inegi.org.mx/contenidos/productos//prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/nueva_estruc/702825195649.pdf el 5 de Febrero del 2020.

Jadhav, J. P. y Phugare, S. S. 2012. **Textile dyes: general information and environmental aspects**. In: Nemr, A. E. (ed.). 2001. **Non-conventional textile wastewater treatment**. Nova Science, New York, pp 1–345.

Junghanns, C., Krauss, G. y Schlosser, D. 2008. **Potential of aquatic fungi derived from diverse freshwater environments to decolourise synthetic azo and anthraquinone dyes**. *Bioresource Technology*, 99(5): 1225–1235.

Kaushik, P. y Malik, A. 2009. **Fungal dye decolourization: Recent advances and future potential**. *Environment International,* 35(1): 127–141.

Knapp, J. S., Vantoch-Wood, E. J. y Zhang, F. 2001. **Use of wood-rotting fungi for the decolorization of dyes and industrial effluents**. *In*: Gadd, G. M (ed.). 2001. **Fungi in Bioremediation**. Cambridge University Press. pp. 242-304

Lansing, M. P. 2002. **Microbiology**. 5th Edition. McGraw-Hill.

López, M. R., Méndez, T. L. J., Hernández, H. F. y Castañón, O. R. 1998. **Micología médica**: **Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio**. Trillas. México.

Lourenço, N. D., Novais, J. M. Pinheiro, H. M. 2000. **Reactive textile dye colour removal in a sequencing batch reactor**. *Water Science & Technology*, 42(5-6): 321-328.

Lourenço, N. D., Novais, J. M. Pinheiro, H. M. 2001. **Effect of some operational parameters on textile dye biodegradation in a sequential batch reactor**. *Journal of Biotechnology*,. 89(2-3): 163-174.

Mancilla, E., Mancilla, H., Lizama, C., Gutarra, A. y Rodríguez, J. **Tratamiento de Residuos Líquidos de la Industría de Celulosa y Textil**. Consultado en línea el 13 de Septiembre del 2007 en: http://www.cnea.gov.ar/xxi/ambiental/cyted/20cap13.pdf En: Garzón, J. R. C. 2009. **Cinética de degradación de colorantes textiles de diferentes clases químicas por hongos y bacterias inmovilizados sobre fibra de Agave tequilana Webber var. Azul. Azul**. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogota, Colombia.

Marcano, D. 2018. **Introducción a la Química de los colorantes**. Colección Divulgación Científica y Tecnológica. Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales, Caracas, Venezuela. 254 pp.

Microbiology Society. 2017. **Observing fungi in a Petri dish.**Consultado el 26 de abril del 2017 En: https://microbiologysociety.org/why-microbiology-matters/what-is-microbiology/fungi/observing-fungi-in-a-petri-dish.html#:~:text=Colony%20morphology%20is%20a%20method,to%20help%20to%20identify%20them.&text=The%20mould%20spores%20from%20the,malt%20extract%20agar%2C%20plate%202

Miles, A. y Misra, S. 1938. **The estimation of the bactericidal power of the blood**. *Epidemiology and Infection*, 38(6), 732-749.

Miranda, M. E. V. 2009. **Evaluación del desempeño de dos procesos para el tratamiento del colorante azul negro directo. Tesis de Maestría. Programa de Maestría y Doctorado en Ingeniería**. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional Autónoma de México. 132 pp.

Moeller, G. E. y Garzón, M. A. 2003. **Desarrollo de tecnologías no convencionales para el tratamiento de efluentes de la fabricación de colorantes del tipo azo**. *Anuaria Imta*, 23: 123-129.

Múnera, J. F. H., Oquendo, A. E. E., Rodríguez, R. D. P. M. y Marín, G. M. M. 2017. **Remoción de colorantes reactivos empleando el hongo *Bjerkandera adusta***. *Informador técnico*, 81(2): 142-150.

Muñoz-Rojas, J., Morales-García, Y., Baez, A. y Quintero-Hernandez, V. 2016. **Métodos económicos para la cuantificación de microorganismos**. In: **Instituciones de Educación Superior la Labor Investigadora e Innovadora en México**. Science Associated Editors: Cheyenne, WY, USA; pp. 67–84.

Neamtu, M., Siminiceanu, I., Yadiler, A. y Kettrup, A. 2002. **Kinetics of decolorization and mineralization of reactive azo dyes in aqueous solution by the UV/H2O2 oxidation**. *Dyes and Pigments*, 53: 93-99

Nordberg, G. 1998. **Metales: Propiedades químicas y toxicidad**. In: Mager-Stellman, J. y McCann, M. (eds.). 1998. **Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. OIT**. Madrid, España. pp. 63.1 – 63.75.

Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996. 1996. **Que establece los limites máximos permisibles de contaminantes en las descargas residuales en aguas y bienes nacionales**. Diario Oficial de la Federación 6 de enero de 1996

Norma Oficial Mexicana NOM-065-ECOL-1994. 1994. **Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores de las industrias de pigmentos y colorantes**. Diario Oficial de la Federación 5 de enero de 1995.

Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994. 1994. **Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico**. Diario Oficial de la Federación 10 de mayo de 1995.

Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994. 1994. **Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos**. Diario Oficial de la Federación 10 de mayo de 1995.

Norma Oficial Mexicana NOM-CCA-014-ECOL/1993. 1993. **Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de la industria textil**. Diario Oficial de la Federación 18 de octubre de 1993

Olvera, P. 2003. **Aislamiento de levaduras que tengan la capacidad para degradar lignina y búsqueda de algunos genes implicados en dicha degradación**. Tesis profesional presentada para obtener el título en maestría en

biotecnología. Escuela de Ciencias, Universidad de las Américas. Puebla-México.

Páez, S. A. 2008. **Evaluación de la concentración de As y calidad del agua subterránea en funcipon de su manejo en la cuenca de Cuitzeo, Michoacán**. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Palma-Goyes, R. E., Vazquez-Arenas, J., Torres-Palma, R. A., Ostos, C., Ferraro, F. y González, I. 2015. **The abatement of indigo carmine using active chlorine electrogenerated on ternary Sb2O5-doped Ti/RuO2-ZrO2 anodes in a filter press FM01-LC reactor**. *Electrochimica Acta*, 174: 735-744.

Patarroyo-Hernández, E. M. 2013. **Procesos de estabilización de residuos generados en la industria textil en Colombia mediante lodos activados**. Recuperado el 3 de Julio del 2020 de: Universidad Militar de Nueva Granada: https://repository.unimilitar.edu.co/handle/10654/10862?fbclid=IwAR3QixRrKQWaKUc_qNDjwHnchmB53MpTE6tkP75cxapOx8E6lyoypr9Af3U

Pearce, C. J., Lloyd, J. R. y Guthrie, J. T. 2003. **The removal of color from textile waste-water using whole bacterial cells. A review**. *Dyes Pigments*, 58: 179–186.

Pelegrini, R., Peralta-Zamora, P., de Andrade, A. R., Reyes, J. y Durán, N. 1999. **Electrochemically assisted photocatalytic degradation of reactive dyes**. *Applied Catalysis B: Environmental*, 22(2): 83-90.

Plaza, S. Y. 2004. **Caracterización fisiológica y molecular del proceso de decoloración de un efluente industrial con el basidiomiceto" Coriolopsis gallica"**. Tesis Doctoral. Universidad de Alcalá, España.

Prada-Ospina, R. 2012. **Alternativa de aprovechamiento eficiente de residuos biodegradables: el caso del almidón residual derivado de la industrialización de la papa Bogotá**. *Revista EAN*, (72): 182-192.

Proyecto de Norma Mexicana PROY-NMX-AA-003/1-SCFI-2008. 2008. **Aguas residuales-muestreo (todas las partes cancelan al proy nmx-aa-003-scfi-2006). parte 1. Guia para el diseño de programas de muestreo y tecnicas de muestreo**. Diario Oficial de la Federación 9 de octubre de 2008.

Proyecto de Norma PROY-NOM-001-SEMARNAT-2017. 2017. **Proyecto de modificación de la norma oficial mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales para quedar como proyecto de modificación de la norma oficial mexicana PROY-NOM-001-SEMARNAT 2017, que establece los límites permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en cuerpos receptores propiedad de la nación**. Diario Oficial de la Federación 5 de enero de 2018.

Rajchenberg, M. 1996. **Los hongos pudridores de *Nothofagus pumilio* (Lenga): identificación de los cultivos puros**. *Bosque*, 17(2): 87-100.

Ramos, S. A. B. 2019. **Biorremediación de colorantes trifenilmetanos y azoico por hongos aislados de suelo y restos vegetales**. ICA. Tesis de Licenciatura. Facutad de Ciencias Biológicas. Escuela Académica Profesional de Biologia. Universidad Nacional San Luís Gonzaga.

Rigas, F. y Dritsa, V. 2006. **Decolourisation of a polymeric dye by selected fungal strains in liquid cultures**. *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 120–4.

Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R. y Nigam, P. 2001. **Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative**. *Bioresource technology*, 77(3): 247-255.

Rodriguez, E., Pickard, M. A. y Vazquez-Duhalt, R. 1999. **Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi**. *Current microbiology*, 38(1): 27-32.

Rodríguez, S., Bermúdez, R, Serrat, M. y Koroma, A. 2006. **Selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* para la decoloración de efluentes Industriales**. *Revista Mexicana de Micología*, 23: 9-15.

Roy, C., Jahan, M. y Rahman, S. 2018. **Characterization and treatment of textile wastewater by aquatic plants (macrophytes) and algae**. *European Journal of Sustainable Development Research*, 2(3): 29.

Ruíz-Dueñas, F. J. 1998. **Caracterización molecular de un nuevo tipo de peroxidasa**. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid. Tesis doctoral. España pp. 130.

Rybczyńska-Tkaczyk, K., Korniłłowicz-Kowalska, T., Szychowski, K. A. y Gmiński, J. 2020. **Biotransformation and toxicity effect of monoanthraquinone dyes during *Bjerkandera adusta* CCBAS 930 cultures**. *Ecotoxicology and environmental safety*, 191: 110203.

Salas, V. D. M., Morales, B. I. y Terrazas, S. E. 2012. **Capacidad decolorativa de *Coriolopsis polyzona*, *Pycnoporus* sp. y *Penicillium* sp. sobre Reactive Black 5 a diferentes condiciones de cultivo**. *Biofarbo*, 20(1): 41-48.

Salas-Colotta, G. 2003. **Tratamiento físico-químico de aguas residuales de la industria textil**. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química,* 5(2): 73-80.

Sánchez, P. R. G. y García, G. K. J. 2018. **Tratamiento de aguas residuales de cargas industriales con oxidación avanzada en sistemas convencionales**. *La granja: Revista de Ciencias de la Vida,* 27(1): 103-111

Sans, R. F. y Ribas, J. P. 1989. **Ingeniería ambiental: contaminación y tratamientos**. Barcelona, España: BIOXAREU.

Saratale, R. G., Saratale, G. D., Chang, J. S. y Govindwar, S. P. 2011. **Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: a review**. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42(1): 138-157.

Sawyer, C. N., McCarty, P. L. y Parkin, G. F. 2001. **Química para ingeniería ambiental**. Massachusetts Estados Unidos: Mc Graw Hill.

Sen, S. K., Raut, S., Bandyopadhyay, P. y Raut, S. 2016. **Fungal decolouration and degradation of azo dyes: A review**. *Fungal Biology Reviews*, 30 (3): 112-133.

Senthilkumar, S., Perumalsamy, M., Ahmed-Basha, C., Selvakumar, K. V., Swaminathan, G., Thajudeen. N. y Prabhu, H. J. 2012. **Biodecolorization of a persistent organic dye from model wastewater using *Curvularia* spp**. *Desalination and Water Treatment*, 1: 1-6.

Singh, H. 2006. **Mycoremediation: Fungal Bioremediation**. John Wiley y Sons: New Jersey/Canada.

Solís, M., Solís, A., Pérez, H. I., Manjarrez, N. y Flores, M. 2012. **Microbial decolouration of azo dyes: A review**. *Process Biochemistry*, 47(12): 1723-1748.

Spadaro, J. T., Gold, M. H. y Renganathan, V. 1992. **Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus Phanerochaete chrysosporium**. *Applied and environmental microbiology*, 58(8): 2397-2401.

Sudha, M., Saranya, A., Selvakumar, G., y Sivakumar, N. 2014. **Microbial degradation of azo dyes: a review**. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(2): 670-690.

Sumathi, S. y Manju, B. S. 2000. **Uptake of reactive textile dyes by Aspergillus foetidus**. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(6): 347-355.

Supaka, N., Juntongjin, K., Damronglerd, S., Delia, M. L. y Strehaiano, P. 2004. **Microbial decolorization of reactive azo dyes in a sequential anaerobic–aerobic system**. *Chemical Engineering Journal*, 99(2):169-176.

Tejada-Tovar, C., Villabona-Ortiz, Á. y Garcés-Jaraba, L. 2015. **Adsorción de metales pesados en aguas residuales usando materiales de origen biológico**. *TecnoLógicas*, 18(34), 109-123.

Tinoco, R., Verdin, J. y Vazquez-Duhalt, R. 2007. **Role of oxidizing mediators and tryptophan 172 in the decoloration of industrial dyes by the versatile peroxidase from Bjerkandera adusta**. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 46(1-4): 1-7.

Tsezos, M. y Bell, J. P. 1989. **Comparison of the biosorption and desorption of hazardous organic pollutants by live and dead biomass**. *Water Research*, 23(5), 561-568.

UNEP. 2002. **Prevención de la contaminación en la industria textil en los países del mediterráneo**. Centro de Actividad Regional para la Producción Limpia (CAR/PL). España. 249 pp.

Walters, A., Santillo. D. y Johnston, P. 2005. **El tratamiento de textiles y sus repercusiones ambientales**. Greenpeace nota técnica 08/2005 pp 32.

Watanabe, T. 2010. **Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi. Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species**. Third Edition. CRC Press Taylor & Francis Group. Unites States.

Weber, E. J. y Wolfe, N. L. 1987. **Kinetics studies of reduction of aromatic azo compounds in anaerobic sediment/water systems**. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 6: 911-920.

Wesenberg, D., Kyriakides, I. y Agathos, S. N. 2003. **White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents**. *Biotechnology Advances*, 22(1-2): 161-187

Wong, M. K., Goh, T. K., Hodgkiss, I. J., Hyde, K. D., Ranghoo, V. M., Tsui, C. K., Ho, W. H., Wong, S. W. y Yuen, T. K. 1998. **Role of fungi in freshwater ecosystems**. *Biodiversity & Conservation*, 7(9): 1187-1206

Wu, Y., Li, T. y Yang. L. 2012. **Mechanisms of removing pollutants from aqueous solutions by microorganisms and their aggregates: a review**. *Bioresour Technol*. 107: 10–8.

Yang, P., Shi, W., Wang, H. y Liu, H. 2016. **Screening of freshwater fungi for decolorizing multiple synthetic dyes**. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(4): 828-834.

Yang, Q., Li, C., Li, H., Li, Y. y Yu, N. 2009. **Degradation of synthetic reactive azo dyes and treatment of textile wastewater by a fungi consortium reactor**. *Biochemical Engineering Journal*, 43: 225–30.

Yonni, F., Fasoli, H., Giai, M. y Álvarez, H. 2008. **Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad sobre colorantes textiles**. *Higiene y Sanidad ambiental*, 8: 331-334.

Zamora, J. R. 2009. **Parámetros fisicoquímicos de dureza total en calcio y magnesio, pH, conductividad y temperatura del agua potable analizados en conjunto con las Asociaciones Administradoras del Acueducto,(ASADAS), de cada distrito de Grecia, cantón de Alajuela, noviembre**. *Pensamiento Actual*, 9(12). 125-134.

Zaruma, A. P. E., Proal, N. J. B., Chaires, H. I. y Sala, A. H. I. 2018. **Los Colorantes Textiles Industriales Y Tratamientos Óptimos De Sus Efluentes De Agua Residual: Una Breve Revisión**. *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas* 19: 38-47.

Zille, A., Górnacka, B., Rehorek, A. y Cavaco-Paulo, A. 2005. **Degradation of Azo Dyes by Trametes villosa Lacasse over Long Periods of Oxidative Conditions**. *Applied Environmental Microbiology,* 71: 6711-6718.

ANEXOS

Anexo 1. Preparación de medios de cultivo y colorantes utilizados.

1) Agar Dextrosa y Papa

La preparación del medio Agar Dextrosa y Papa (PDA), se describe a continuación: se pesaron 39 g del medio de cultivo deshidratado marca BD Bioxon, posteriormente se vertió el medio de cultivo en un matraz Erlenmeyer para disolver en 1 L de agua destilada hasta eliminar los grumos.

Después de agitar se cerró el matraz con un tapón de algodón cubierto de gasa y papel aluminio para esterilizarlo en una autoclave a 121°C y 15 psi durante 15 minutos, una vez esterilizado, se vació el medio PDA en cajas de Petri estériles colocando 25 mL de medio de cultivo en cada una, a la flama del mechero y cerrando posteriormente cada caja para dejar solidificar.

Para la preparación de las cajas con medio de cultivo y con los colorantes *Procion Yellow H-E4R* y *Procion Blue H-ERD*; se agregó 2 mL y 10 mL de la solución stock de cada colorante, por separado, al matraz que contenía el medio de cultivo sin esterilizar, para obtener las concentraciones de 100 mg/L y 500 mg/L, respectivamente.

2) Agar Bacteriológico

Se pesó 25 g de medio Agar Bacteriológico (AB) deshidratado marca BD Bioxon, enseguida se vertió el medio de cultivo en un matraz Erlenmeyer para disolver en 1 L de agua destilada hasta eliminar los grumos.

Después de agitar se procedió a cubrir la boca del matraz con un tapón de algodón cubierto de gasa y papel aluminio. Se esterilizó el medio en autoclave a 121°C y 15 psi durante 15 minutos.

Una vez estéril se vació el medio en cajas de Petri estériles colocando 25 mL de medio de cultivo en cada una de ellas a la flama del mechero, y cerrando posteriormente cada caja para dejar solidificar.

Para la preparación de las cajas con medio de cultivo y con los colorantes *Procion Yellow H-E4R* y *Procion Blue H-ERD*; se agregó 2 mL y 10 mL de la solución stock de ambos colorantes, por separado, al matraz que contenía el medio de cultivo sin esterilizar, para obtener las concentraciones de 100 mg/L y 500 mg/L, respectivamente.

3) Corrección de pH

Se pesó 39 g del medio PDA y se agregó en un matraz Erlenmeyer para disolver en 1 L de agua destilada. Se prepararon medios sin y con colorante, al medio de cultivo con colorante se le agregó 10 mL de la solución stock de los tintes (*Procion Blue H-ERD* y *Procion Yellow H-E4R*) por separado, para obtener una concentración final de 500 mg/L.

Inmediatamente después se colocó el matraz sobre un agitador magnético con resistencia, con el fin de mantener el medio de cultivo con el colorante en movimiento y asi poder agregar lentamente con una pipeta la solución de hidróxido de sodio (NaOH) hasta que se obtuvo un pH de 8; esta solución se estuvo midiendo con un potenciómetro HANNA® modelo pH20 hasta que se consiguió el pH deseado.

Para conseguir el pH 4, el procedimiento anteriormente descrito se repitió de la misma manera, con la diferencia que se le adicionó al medio coloreado de PDA la solución de ácido clorhídrico (HCl), los medios con el pH modificado se esterilizaron en una autoclave a 121°C y 15 psi durante 15 minutos.

Una vez estéril el medio se vació en cajas de Petri colocando 25 mL del medio en cada una, a la flama del mechero y cerrando posteriormente para dejar solidificar.

4) Medio líquido

En un matraz Erlenmeyer se preparó un volumen de 750 mL de medio liquido con una concentración de 500 mg/L, este medio se elaboró con agua de garrafón y con 37.5 mL de la solución stock del colorante *Procion Blue H-ERD.*

Dicha solución se vació a nueve matraces Erlenmeyer que incluyeron: tres replicas por cada tratamiento y tres controles negativos, posteriormente se cubrió la boca de cada matraz con un tapón de algodón, cubierto de gasa y papel aluminio.

Después se esterilizaron todos los matraces con calor húmedo a 121°C y 15 psi durante 15 minutos, una vez que se enfriaron los medios, se inocularon agregando al medio de forma aséptica 1 cm de diámetro de inóculo del aislado fúngico AGA10 y de la cepa *B. adusta,* por separado. El procedimiento anterior se realizó de igual manera para el colorante *Procion Yellow H-E4R*.

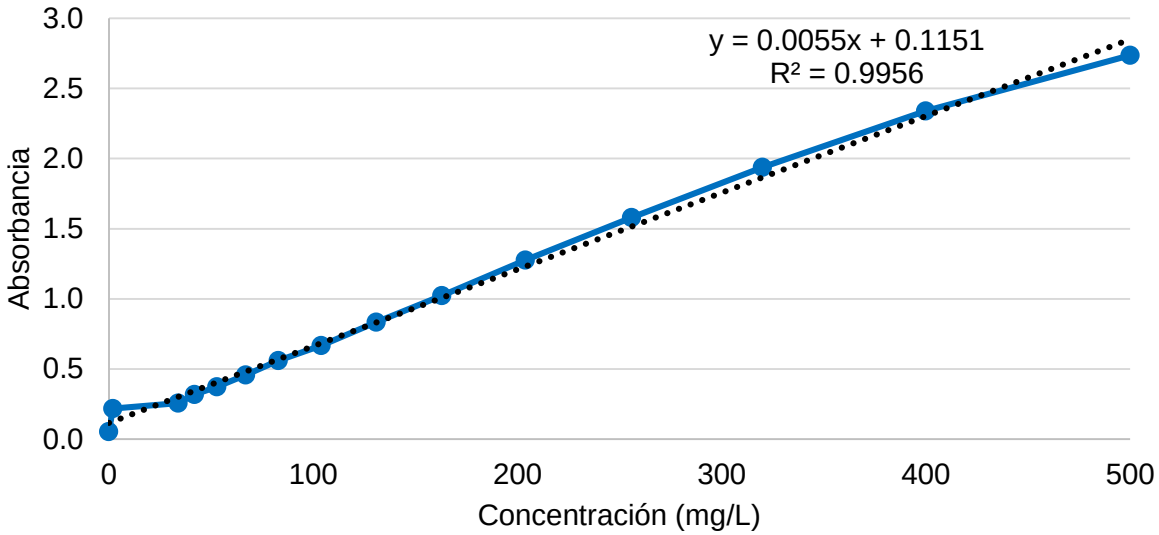
5) Colorantes textiles

Los colorantes textiles DyStar™: *Procion Blue H-ERD* y *Procion Yellow H-E4R* son empleados para teñir algodón, estos fueron donados por la empresa DyStar de México, S. de R. L. de C. V. Estos colorantes entre otros, son los que se utilizan en la empresa textil muestreada.

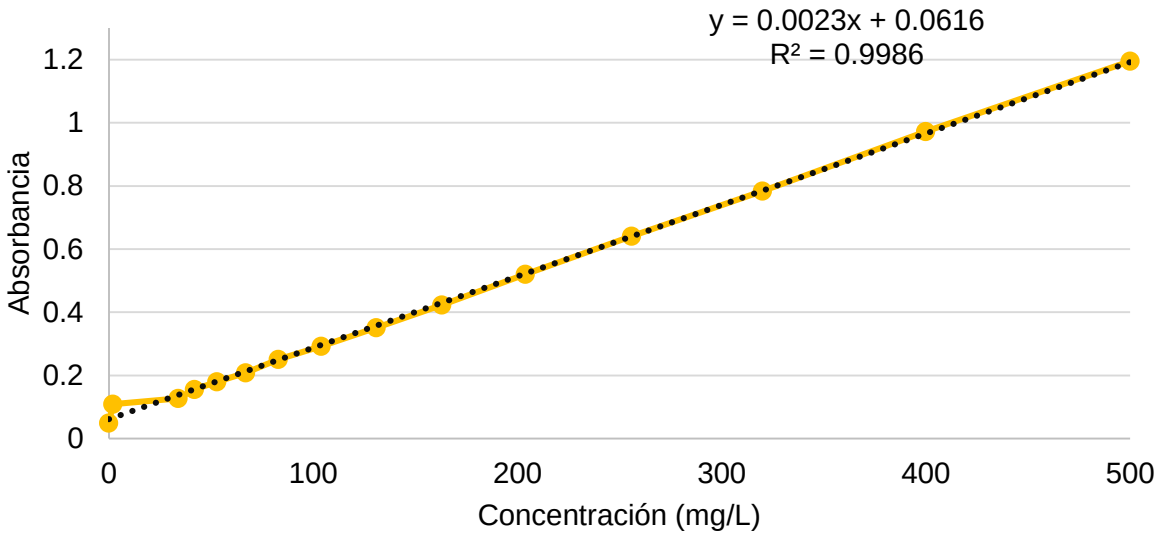
Se preparó una solución stock de 250 mL con 2.5 g de cada colorante (*Procion Blue H-ERD* o *Procion Yellow H-E4R*), donde 2 mL equivale a 100 mg y 10 mL equivale a 500 mg; estas cantidades se utilizaron para preparar los medios de cultivo sólidos.

Anexo 2. Curvas de calibración de los colorantes *Procion* en la concentración de 500 mg/L.

2.1. Curva de calibración de *Procion Blue H-ERD* a λ de 500 nm.



2.2. Curva de calibración de *Procion Yellow H-E4R* a λ de 600 nm.



Anexo 3. Indicadores de calidad del agua (CONAGUA, 2015).

3.1. Escala de clasificación de calidad de agua superficial con base en la Demanda Bioquímica de Oxígeno a cinco días (DBO_5).

Criterio (mg/L)	Clasificación	Color
$DBO_5 \leq 3$	**EXCELENTE** No contaminada.	Azul
$3 < DBO_5 \leq 6$	**BUENA CALIDAD** Aguas superficiales con bajo contenido de materia orgánica biodegradable.	Verde
$6 < DBO_5 \leq 30$	**ACEPTABLE** Con indicio de contaminación, aguas superficiales con capacidad de autodepuración o con descargas de aguas residuales tratadas biológicamente	Amarillo
$30 < DBO_5 \leq 120$	**CONTAMINADA** Aguas superficiales con descargas de aguas residuales crudas, principalmente de origen municipal.	Naranja
$DBO_5 > 120$	**FUERTEMENTE CONTAMINADA** Aguas superficiales con fuerte impacto de descargas de aguas residuales crudas municipales y no municipales.	Rojo

3.2. Escala de clasificación de calidad del agua superficial con base en la Demanda Química de Oxígeno (DQO).

Criterio (mg/L)	Clasificación	Color
DQO ≤ 10	**EXCELENTE** No contaminada.	Azul
10 < DQO ≤ 20	**BUENA CALIDAD** Aguas superficiales con bajo contenido de materia orgánica biodegradable y no biodegradable.	Verde
20 < DQO ≤ 40	**ACEPTABLE** Con indicio de contaminación, aguas superficiales con capacidad de autodepuración o con descargas de aguas residuales tratadas biológicamente	Amarillo
40 < DQO ≤ 200	**CONTAMINADA** Aguas superficiales con descargas de aguas residuales crudas, principalmente de origen municipal.	Naranja
DQO > 200	**FUERTEMENTE CONTAMINADA** Aguas superficiales con fuerte impacto de descargas de aguas residuales crudas municipales y no municipales.	Rojo

3.3. Escala de clasificación de calidad del agua superficial con base en los sólidos suspendidos totales (SST).

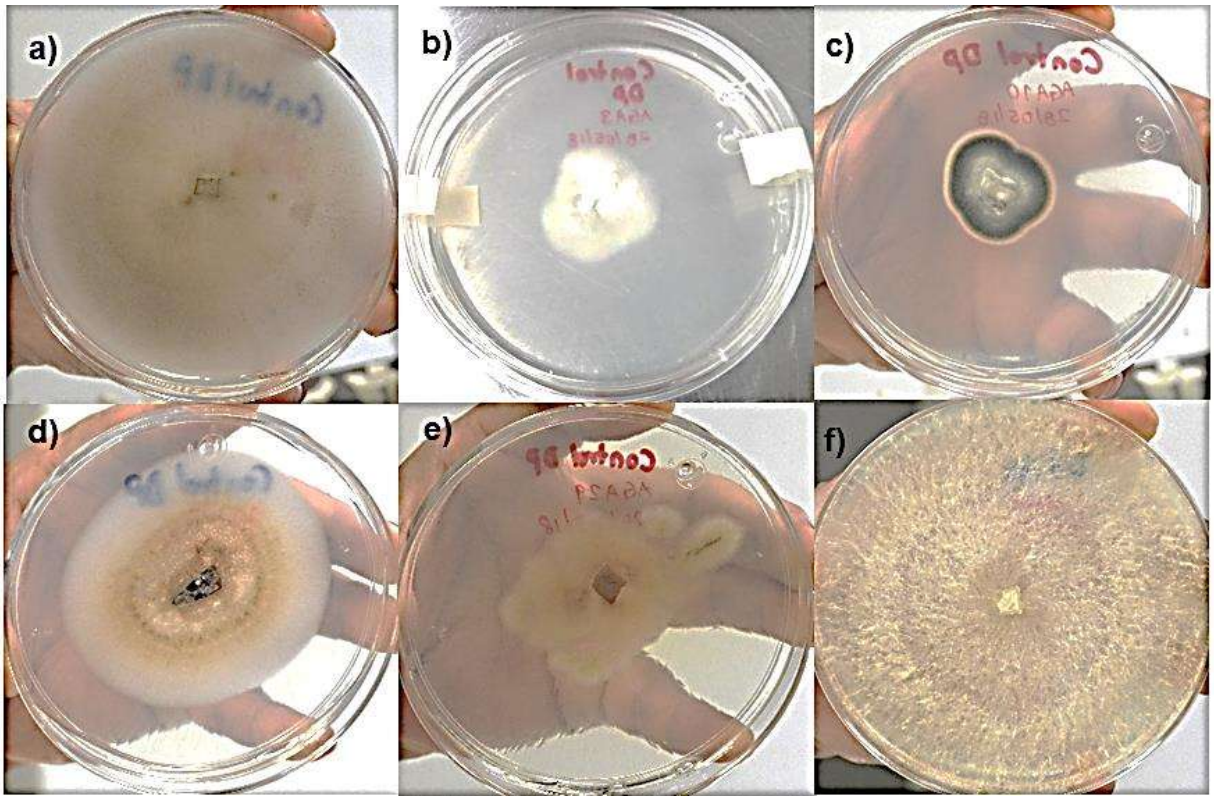
Criterio (mg/L)	Clasificación	Color
SST ≤ 25	**EXCELENTE** Clase de excepción, muy buena calidad.	Azul
25 < SST ≤ 75	**BUENA CALIDAD** Aguas superficiales con bajo contenido de sólidos suspendidos, generalmente condiciones naturales. Favorece la conservación de comunidades acuáticas y el riego agrícola irrestricto.	Verde
75 < SST ≤ 150	**ACEPTABLE** Aguas superficiales con indicio de contaminación, con descargas de aguas residuales tratadas biológicamente. Condición regular para peces. Riego agrícola restringido.	Amarillo
150 < SST ≤ 400	**CONTAMINADA** Aguas superficiales de mala calidad con descargas de aguas residuales crudas, aguas con alto contenido de materia suspendida.	Naranja
SST > 400	**FUERTEMENTE CONTAMINADA** Aguas superficiales con fuerte impacto de descargas de aguas residuales crudas municipales y no municipales con alta carga contaminante, mala condición para peces.	Rojo

3.4. Escala de clasificación de calidad del agua superficial con base en los coliformes fecales (CF).

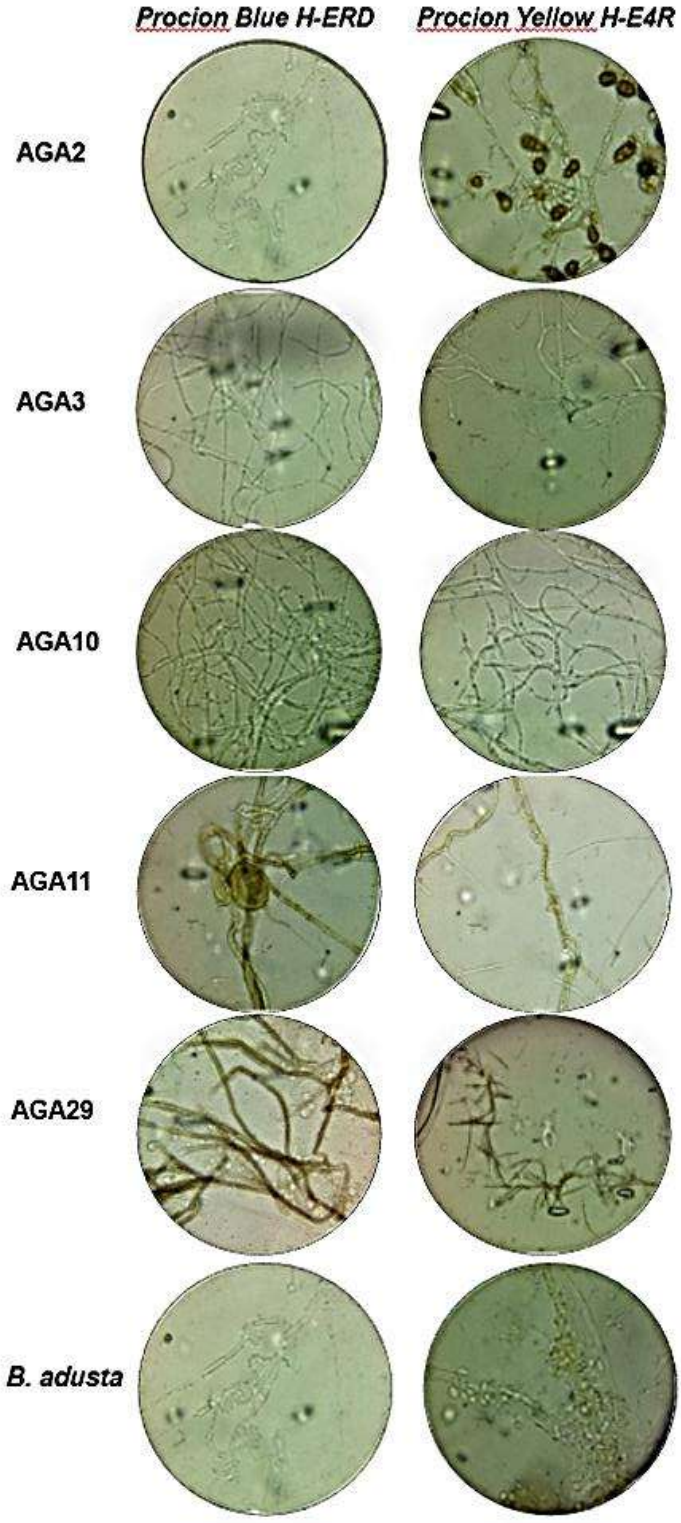
Criterio (mg/L)	Clasificación	Color
CF ≤ 100	**EXCELENTE** No contaminada.	Azul
100< CF ≤ 200	**BUENA CALIDAD** Aguas superficiales con calidad satisfactoria para la vida acuática y para uso recreativo con contacto primario.	Verde
200 < CF ≤ 1000	**ACEPTABLE** Aguas superficiales con calidad satisfactoria como fuente de abastecimiento de agua potable y para riego agrícola.	Amarillo
1000 < CF ≤ 10000	**CONTAMINADA** Aguas superficiales con contaminación bacteriológica.	Naranja
CF > 10000	**FUERTEMENTE CONTAMINADA** Aguas superficiales con fuerte contaminación bacteriológica.	Rojo

Anexo 4. Imágenes

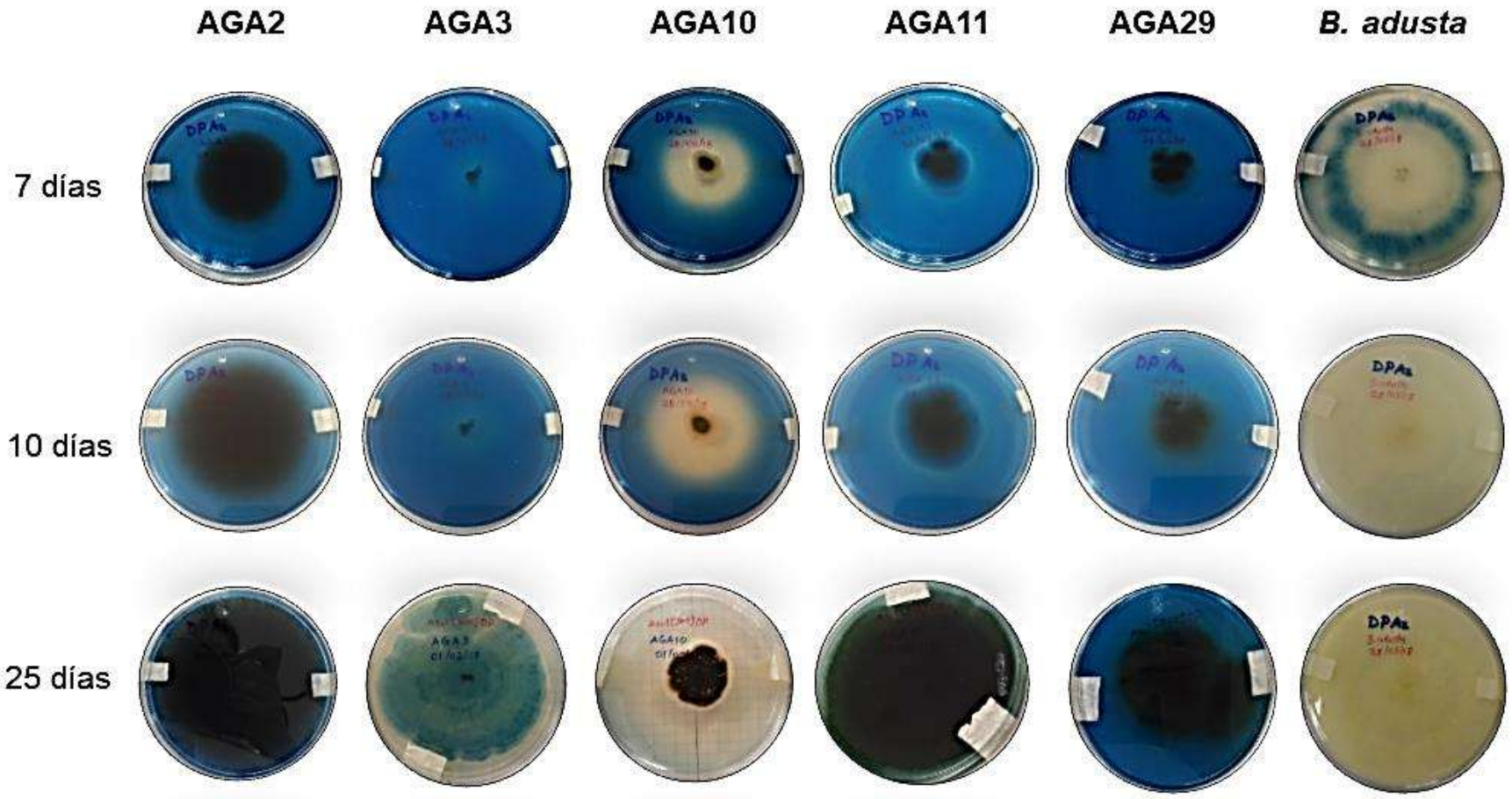
4.1. Coloración colonial de los cinco aislados fúngicos: a) AGA2, b) AGA3, c) AGA10, d) AGA11, e) AGA29, y de la cepa f) *B. adusta,* en medio PDA sin colorante.



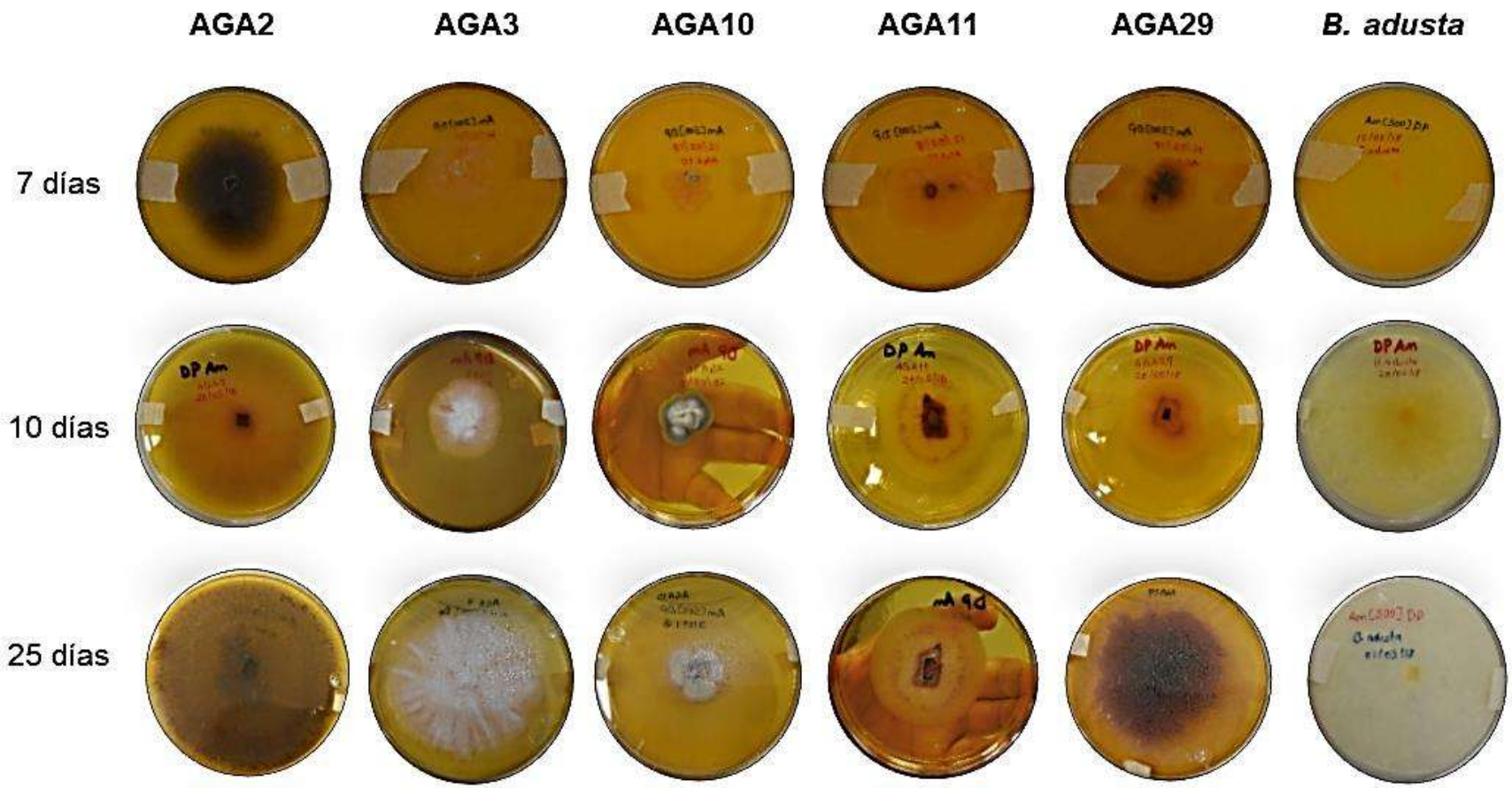
4.2. Microscopía óptica 100X de los cinco aislados fúngicos y de la cepa *B. adusta* en el día 7 de incubación en medio PDA con la concentración 500 mg/L de los colorantes *Procion Blue H-ERD* y *Procion Yellow H-E4R.*



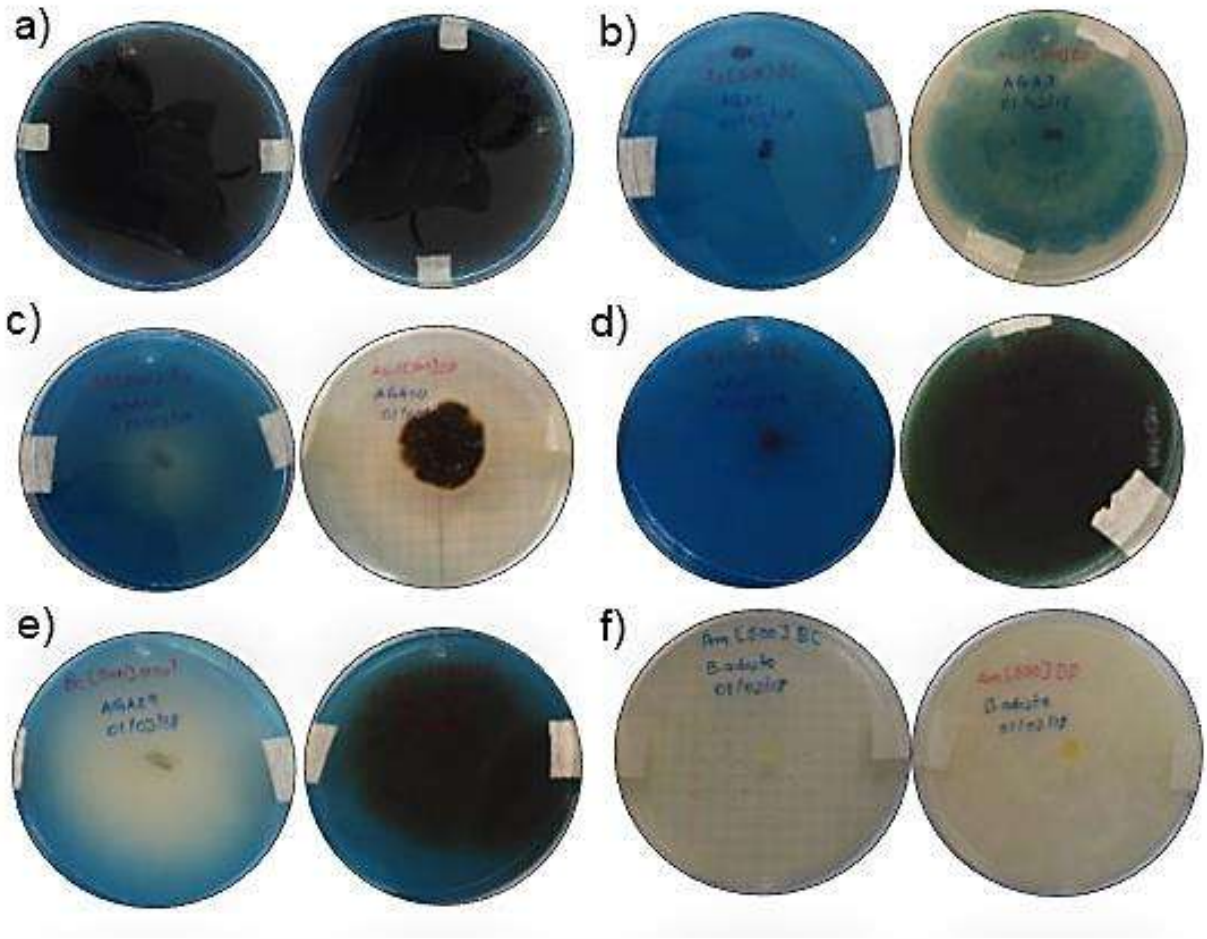
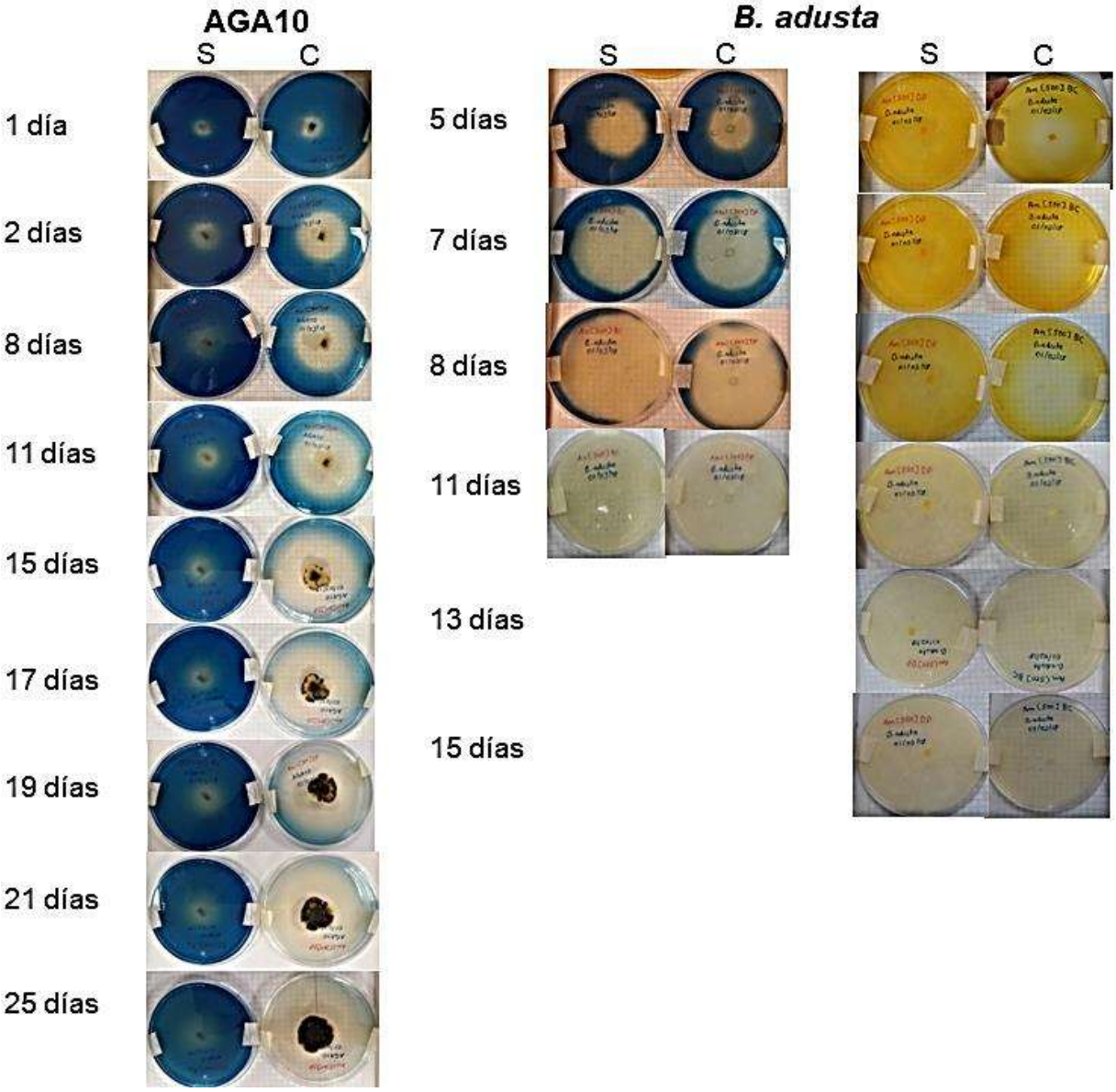
4.3. Crecimiento de los cinco aislados fúngicos y *B. adusta* en el medio PDA con la concentración 500 mg/L del colorante *Procion Blue H-ERD.*



4.4. Crecimiento de los cinco aislados fúngicos y *B. adusta* en el medio PDA con la concentración 500 mg/L del colorante *Procion Yellow H-E4R.*



4.5. Comparación del halo de decoloración a los 25 días de los aislados fúngicos: a) AGA2, b) AGA3, c) AGA10, d) AGA11, e) AGA29, y la cepa f) *B. adusta*, en medio sin fuente nutricional compleja (izquierda) y en medio con fuente nutricional compleja (derecha), en la concentración 500 mg/L del colorante *Procion Blue H-ERD*.



4.6. Comparación del halo de decoloración entre el aislado AGA10 y la cepa *B*. *adusta* en medio sin fuente nutricional compleja (S) y en medio con fuente nutricional compleja (C), en la concentración 500 mg/L de los colorantes *Procion Blue H-ERD* y *Procion Yellow H-E4R*.