



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE  
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



---

**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS  
EN INGENIERÍA AMBIENTAL**

**FACULTAD DE BIOLOGÍA  
FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL  
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**

Tesis con el tema:

**Decoloración de una mezcla de colorantes textiles por un  
consorcio hongo-bacteria**

**Presenta:**

**Biól. David Guzmán Hernández**

Como requisito para obtener el título de Maestro en Ciencias en  
Ingeniería Ambiental.

Directora de tesis:

**Dra. Maricela Villicaña Méndez**

Codirectora de tesis:

**M.C. Rosenda Aguilar Aguilar**

**Morelia Michoacán, enero del 2020**

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) que me otorgo la beca para realizar mis estudios de posgrado durante el periodo de septiembre del 2017 a septiembre del 2019.

Al programa de Maestría en Ciencias en Ingeniería Ambiental (MCIA) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, el cual pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC).

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, que me formo desde mi bachillerato hasta el posgrado, y darme el honor de ser orgullosamente Nicolaita.

A mi directora de tesis, la Dra. Maricela Villicaña Méndez, quien fue mi asesora en la maestría y me brindó su apoyo.

A mi codirectora de tesis, la M.C. Rosenda Aguilar Aguilar, quien desde mi formación en la Facultad de Biología fue mi profesora y siempre un apoyo en mi trayectoria profesional.

A los miembros de mi mesa sinodal, la Dra. Ana Alejandra Vargas Tah, el Dr. Miguel Martínez Trujillo y el Dr. Roberto Guerra González, quienes me brindaron apoyo, consejos y guía en esta parte de mi formación profesional.

Al Dr. Gerardo Vázquez Marrufo, quien me proporcionó valiosos consejos a lo largo de la maestría para la mejora del proyecto.

A la Dra. Ruth Alfaro Cuevas-Villanueva y al Dr. Raúl Cortés Martínez quienes fueron un apoyo importante en la realización del proyecto con valiosos consejos y son personas muy amables y valiosas.

## Dedicatoria

A mi madre Silvia Elena Hernández Pérez, que con mucho amor me crio y me apoyo en cada paso que di desde el día en que nací, a quien debo las cosas buenas que hay en mí y mi vida misma.

A mi padre Arturo Guzmán Sánchez, quien es mi motor para seguir adelante a pesar de su ausencia, su ejemplo y recuerdo me inspira a ser mejor cada día de mi vida, y las promesas que algún día le hice fueron lo que lograron que esto fuera posible.

A mis hermanos, Arturo, Ana y Mario, quienes a pesar de las diferencias compartimos una linda historia familiar.

A mi amiga Esther Ruiz quien fue además de una compañera en la maestría, mi amiga y un apoyo y una persona con quien retroalimentarse profesionalmente y quien me dio muchos consejos profesionales siempre.

A mi amiga Ana Dilia Mota Gutiérrez, quien fue un apoyo técnico y personal en mi posgrado, que siempre pude contar con ella en cualquier aspecto o problema.

A mi sobrino Arturo, quien es junto con mi padre y mi madre, es la razón por la cual me levanto todos los días para trabajar duro y ser un ejemplo para él quien es como un hijo para mí.

A mi amigo Octavio Hurtado Marroquín, quien es un amigo muy cercano a mi desde la universidad, quien es como un hermano para mí.

A mi amiga Karla Victoria Vera, quien es una amiga incondicional que siempre está para escucharme y ayudarme quien es como una hermana para mí.

Y a todos quienes alguna vez me brindaron su apoyo en esta parte de mi vida y en mi formación como profesional.

“Quien no tiene ideas es solamente un mueble en el escenario del mundo” Baden-Powell

<b>ÍNDICE</b>	
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	II
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	II
<b>ÍNDICE DE FOTOS</b> .....	II
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	5
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	7
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b> .....	7
<b>5. OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	7
<b>6. ANTECEDENTES</b> .....	8
<b>7. MARCO TEÓRICO</b> .....	10
<b>COLORANTES TEXTILES</b> .....	10
<b>COLORANTES DIRECTOS</b> .....	11
<b>COLORANTES SULFUROSOS</b> .....	11
<b>COLORANTES AZO REACTIVOS</b> .....	11
<b>REMOCIÓN DE COLORANTES TEXTILES EN AGUAS RESIDUALES</b> .....	12
<b>8. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	17
<b>COLORANTES</b> .....	17
<b>Material Biológico</b> .....	18
<b>Medios de cultivo</b> .....	18
<b>Medio agar dextrosa papa (PDA)</b> .....	18
<b>Medio Agar nutritivo (AN)</b> .....	18
<b>Medio de cultivo líquido mínimo</b> .....	19
<b>CINÉTICA DE DECOLORACIÓN</b> .....	19
<b>Mantenimiento en medio PDA</b> .....	19
<b>Mantenimiento en medio agar nutritivo</b> .....	19
<b>Cinética de crecimiento y decoloración en medio líquido mínimo selectivo para hongos y bacterias</b> .....	20
<b>9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	22
<b>10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	23
<b>CINÉTICAS DE CRECIMIENTO</b> .....	23
<b>11. CONCLUSIONES</b> .....	48

<b>12. PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	49
<b>PREPARACIÓN Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE MEDIOS DE CULTIVO MEDIOS DE CULTIVO</b> .....	49
<b>Medio agar dextrosa papa (PDA)</b> .....	49
<b>Medio de cultivo líquido mínimo</b> .....	49
<b>13. LITERATURA CITADA</b> .....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ....	12
FIGURA 2.....	14
FIGURA 3.....	16
FIGURA 4.....	18
FIGURA 5.....	24
FIGURA 6.....	25
FIGURA 7.....	28
FIGURA 8.....	29
FIGURA 9.....	32
FIGURA 10.....	34
FIGURA 11.....	35
FIGURA 12. ....	36
FIGURA 13 .....	37
FIGURA 14.....	40
FIGURA 15.....	42
FIGURA 16.....	44
FIGURA 17.....	45
FIGURA 18.....	46

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. ....	6
TABLA 2.....	22

## ÍNDICE DE FOTOS

FOTO 1 .....	50
FOTO 2 .....	51
FOTO 3 .....	52
FOTO 4 .....	52
FOTO 5 .....	53

## RESUMEN

Las industrias textiles, además de consumir grandes volúmenes de agua, desechan en sus efluentes una gran cantidad de contaminantes. Se calcula que esta industria genera 120 m<sup>3</sup> de agua residual por cada tonelada de fibra teñida, y que este volumen puede contener una concentración de 1100 a 1300 *unidades Hazen* de una gran gama de moléculas colorantes. La compleja estructura orgánica de las moléculas de colorantes, su estabilidad a la luz y su resistencia a la degradación por muchos microorganismos, tienen una naturaleza recalcitrante que hace que uno de los problemas de la industria textil sea la remoción de estos contaminantes, antes de disponer el agua en un sistema hidrológico. Para lograrlo se han propuesto métodos físicos, químicos y biológicos, entre los que la actividad fúngica y bacteriana ha demostrado ser eficiente en la degradación y decoloración de estos compuestos. El presente trabajo prueba la capacidad de decoloración de dos consorcios hongo-bacteria, el hongo para ambos consorcios es *Trametes versicolor*, y las bacterias fueron aislado bacteriano denominado AGA8, que fue aislados obtenido de un efluente de aguas residuales, de una industria que se dedica a teñir algodón, y la otra bacteria fue *Burkholderia xenovorans* LB400. Los resultados muestran que el consorcio *B. xenovorans* + *T. versicolor* tiene la capacidad de decoloración del colorante Proción Blue fue del 94% y 99% en los tratamientos a pH 5.2 en las concentraciones de 300 mg/L y 500 mg/L, respectivamente. En ningún tratamiento hubo una decoloración mayor al 30% para el colorante Proción Yellow.

**Palabras clave:** mezclas de colorantes, consorcios hongos/bacterias, porcentaje decoloración, Procion Blue, Procion Yellow.

## ABSTRACT

Textile industries not only consume large volumes of water; they dispose of a large amount of pollutants in their effluents. It is estimated that this industry generates 120 m<sup>3</sup> of wastewater for every ton of dyed fiber, and that this volume can contain a concentration of 1100 to 1300 Hazen units from a wide range of coloring molecules. The complex organic structure of the dye molecules, their light stability and resistance to degradation by many microorganisms, have a recalcitrant nature that makes one of the problems of the textile industry is the removal of these contaminants, before disposing Water in a hydrological system. To achieve this, physical, chemical and biological methods have been proposed, among which fungal and bacterial activity has proven efficient in the degradation and discoloration of these compounds. The present work tests the decolorization capacity of two fungus-bacterial consortiums, the fungus for both consortia is *Trametes versicolor*, and the bacteria were isolated bacterial called AGA8, which was isolated obtained from an effluent from wastewater, from an industry that is engaged to dye cotton, and the other bacterium was *Burkholderia xenovorans* LB400. The results show that the *B. xenovorans* + *T. versicolor* consortium has the decoloration capacity of the Procion Blue dye was 94% and 99% in the treatments at pH 5.2 in the concentrations of 300 mg / L and 500 mg / L, respectively. In no treatment was there a discoloration greater than 30% for the Proción Yellow dye.

**Keywords:** dye mixtures, fungi / bacteria consortiums, percentage discoloration, Procion Blue, Procion Yellow.

## 1. INTRODUCCIÓN

Históricamente la tinción de textiles ha tenido un desarrollo en cuatro ámbitos, el artístico, el mecánico, el químico y el tecnológico. Hasta antes de la Revolución Industrial, en China, Grecia y Egipto, la tinción artística de textiles estuvo por delante de los otros ámbitos (Baumann, 1966), y los colorantes naturales como el índigo (extraído de *Indigofera tinctoria*) y la alizarina (obtenida de la planta *Rubia perigrina*) tuvieron un alto valor comercial debido a la capacidad de teñir de forma atractiva a las telas.

De 1780 a 1860, el ámbito mecánico desplazó a las labores manuales de tinción y de esta manera la alta mecanización de los diversos procesos dio un auge a la industria. Casi paralelamente, en 1856 William Perkin desarrolló el primer colorante sintético, la anilina morada o malveína, iniciando con ello el crecimiento y fortalecimiento de los ámbitos tecnológico y de síntesis química de la industria (Sousa *et al.*, 2008).

Actualmente, la gran variedad de fibras textiles (algodón, poliéster, nylon, orlon, acrilán, dacrón, entre otras) ha originado el desarrollo de una gama muy amplia de moléculas colorantes. Se estima que a nivel mundial existen alrededor de 10,000 tipos diferentes de colorantes, siendo la producción anual de ellos por arriba de  $7 \times 10^5$  toneladas (Neamtu *et al.*, 2002).

En nuestro país se estima que la producción de colorantes es de 9,490 toneladas y el consumo anual es de 20,406 toneladas (Piña *et al.*, 2007). Mostrando con ello un nivel de importación considerable en estos compuestos. Sin embargo, la industria de la tinción textil implica problemas ambientales severos. Por una parte, esta actividad económica requiere del consumo de importantes volúmenes de agua, y por la otra, descarga grandes cantidades de contaminantes tales como organoclorados, surfactantes y metales pesados; además, en las aguas residuales de la industria textil, los parámetros de DBO pueden ir desde 80 hasta 500 mg/L y la DQO que puede tomar valores desde 150 a 250 mg/L, con una relación DQO/DBO de 3-5; además, la cantidad de sólidos suspendidos puede variar de 30 a 400 mg/L, y el pH puede tomar valores muy variables (Rodríguez-Couta *et al.*,



2013). A lo anterior debe agregarse que uno de los contaminantes más abundantes, son los colorantes que no se adhieren a la fibra.

Un efluente de este tipo puede contener concentraciones de colorante que pueden ir desde 300 hasta los 500 mg/L, ya que durante el proceso de teñido se desecha del 2-60 % de estas moléculas (Rodríguez-Couta *et al.*, 2013). Debe remarcarse que la industria textil general alrededor de 120 m<sup>3</sup> de agua residual por cada tonelada de fibra textil teñida (Anjaneyelu *et al.*, 2005). Ello conlleva a considerar que en el agua residual con concentraciones de 500 mg/L, se desecharán 60 kg de colorante por cada tonelada de fibra teñida.

La presencia de colorantes en cuerpos de agua además de ser un problema estético, tiene repercusiones severas en el medio ambiente ya que reduce significativamente la incidencia de los rayos solares en el cuerpo de agua receptor y con ello disminuye el proceso fotosintético de algunas algas y cianobacterias; la disminución de las concentraciones de oxígeno disuelto provoca daños y alteraciones importantes sobre la flora y fauna acuáticas (Neamtu *et al.*, 2002).

También se conocen los efectos tóxicos de los colorantes; muchos de ellos, una vez que están en el entorno, son modificados químicamente para producir aminas aromáticas altamente tóxicas y con elevado potencial carcinogénico (Neatum *et al.*, 2002, Rodríguez-Couta *et al.*, 2013). Bae *et al.*, (2006) emplearon como modelo biológico para pruebas de ecotoxicidad a *Daphnia magna*; sus resultados mostraron que el colorante azul directo 218 fue muy tóxico para el crustáceo, con una dosis letal DL50 de entre 1 y 10 mg/L en 48 horas; fue propuesto por los autores como un vindicador del riesgo para un ecosistema acuático.

No obstante, la problemática que representan las moléculas colorantes, la prosperidad de esta industria origina cada vez mayor diversidad de fibras, de nuevas tecnologías y maquinaria, y por consiguiente impulsa constantemente la síntesis química de nuevos colorantes textiles. La diversidad de éstos últimos es tan amplia que han sido clasificados, de acuerdo al textil a colorear, en colorantes: reactivos, directos, de tina, sulfurosos, azoicos, ácidos, con cromo, premetalizados y dispersos (Walters *et al.*, 2005). De ellos, los que resultan de interés para el presente trabajo

son los empleados para teñir algodón. Pero considerando mezclas de colorantes, simulando las concentraciones y la diversidad de colorantes en dicho efluente, para posteriormente tomar en cuenta para aplicarlo con agua residual real, ya que se tiene en cuenta que los métodos de decoloración biológica, son un método que se puede emplear en dicha depuración, ya que muchos hongos pertenecientes a los hongos de la pudrición blanca, y algunas bacterias, se tienen reportado su potencial en cuanto a decoloración, llevando a cabo procesos de decoloración enzimáticos.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

Los colorantes textiles son utilizados en nuestra entidad federativa principalmente para el proceso del teñido de algodón, y una de las plantas de teñido de algodón está ubicada en el municipio de Zinapécuaro, la cual es una industria que favorece el desarrollo económico de la población de dicho municipio, ya que emplea mano de obra local para dicho proceso de teñido.

Pero el problema es que no existe un tratamiento del agua residual que proviene de dicha planta de teñido, dicha agua proviene de las lavadoras que son donde se lleva a cabo la tinción del algodón, y es agua que tiene las siguientes características:

Tabla 1. Análisis de agua residual de la empresa textil T-ANNA (Guadarrama-Cárdenas. (2017)).

PARÁMETRO	LMPECOL	LMP NOM	SITIO S1	SITIO E2	METODOLOGÍA
Temperatura del agua (°C)	**	35	47.16	22.7	Termómetro de inmersión (mercurio)
pH	6 - 9	6.5 - 8.5	9.67	8.91	Potenciométrico
Conductividad eléctrica (µS/cm)	NA	NA	3.46	1.24	Potenciométrico
Sólidos disueltos totales (mg/L)	**	NA	1156.00	406.00	Potenciométrico
Oxígeno disuelto (mg/L)	NA	NA	6.94	5.85	HQ40d Portable Meter de Oxígeno disuelto
Color aparente	**	Pureza del 15%	Verde claro	Café claro	Visual
Materia aparente	NA	NA	Restos de telas	Materia orgánica, tierra	Visual
Demanda Bioquímica de Oxígeno (mg/L)	100-200	200.00	<b>620.25</b>	5.64	Volumétrico
Demanda Química de Oxígeno (mg/L)	200-240	NA	<b>1,222.25</b>	64.605	Volumétrico
Sólidos sedimentables (mg/L)	1.0-1.2	2.0	<0.1	<0.1	Volumétrico
Sólidos suspendidos totales (mg/L)	100-200	200.0	16.0	24.0	Gravimétrico
Sólidos disueltos totales (mg/L)	NA	NA	1 640.66	822.66	Gravimétrico
Nitrógeno total (mg/L)	NA	NA	20.72	5.60	Volumétrico
Nitratos(mg/L)	NA	NA	3.42	<0.09	Espectrofotométrico
Nitritos (mg/L)	NA	NA	0.07	<0.04	Espectrofotométrico
Nitrógeno orgánico (mg/L)	NA	NA	19.32	5.04	Volumétrico
Plomo (mg/L)	NA	1.00	<0.154	<0.154	Espectrofotometría
Arsénico (mg/L)	NA	0.4	<0.001	<0.001	Espectrofotometría
Fluoruros (mg/L)	NA	NA	11.88	0.733	Potenciometro
Coliformes fecales (NMP/100 mL)	NA	2 000	<3	240	Tubos múltiples
Coliformes totales (NMP/100 mL)	NA	NA	<3	4600	Tubos múltiples
Hongos (UFC/mL)	NA	NA	0*	60*	Cuenta de bacterias aerobias en placa

PARÁMETRO	LMPECOL	LMP NOM	SITIO S1	SITIO E2	METODOLOGÍA
Levaduras (UFC/mL)	NA	NA	0*	120*	Cuenta de bacterias aerobias en placa

De acuerdo a Guadarrama-Cárdenas (2017), este efluente de agua residual tiene rangos de DBO por encima de la NOM-001-ECOL-1996, esto se debe a la gran cantidad de colorantes presentes en el agua residual de esta industria, y esto implica una liberación de materia orgánica de difícil biodegradación al ambiente, pero sin embargo una de las motivaciones de este trabajo es ofrecer una opción para la remover los colorantes del agua residual de este tipo de efluentes, de manera eficiente y económica, y así permitir que la industria y la economía de dicho municipio siga prosperando, pero reduciendo el impacto al ambiente que tiene este tipo de sustancias.

### 3. HIPÓTESIS

Los consorcios formados por *Trametes versicolor*+ *Burkholderia xenovorans* y *Trametes versicolor* + AGA8 tendrán mayor capacidad de decoloración *in vitro* que los mismos microorganismos, presentados de manera individual, en un medio de cultivo mínimo que consta de una mezcla en una proporción 50/50 de los colorantes Procion® Azul H-ERD y Procion® Amarillo H-E4R.

### 4. OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad de decoloración *in vitro* de los consorcios *Trametes versicolor*+ *Burkholderia xenovorans* y *T. versicolor* + AGA8 y de manera individual cada microorganismo, ante la mezcla de colorantes una proporción 50/50 de los colorantes Procion® Azul H-ERD y Procion® Amarillo H-E4R.

### 5. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el crecimiento y capacidad de decoloración de los microorganismos de manera individual en cultivo puro, a concentraciones de mezcla de colorantes de 300 mg/L y 500 mg/L y a pH de 5.2 y 8.3, en medio mínimo.

- Determinar el crecimiento y capacidad de decoloración de los consorcios *Trametes versicolor*+ *Burkholderia xenovorans* y *T. versicolor* + AGA8, a concentraciones de mezcla de colorantes de 300 mg/L y 500mg/L y a pH de 5.2 y 8.3, en medio mínimo.
- Determinar si hay diferencia entre la decoloración de los consorcios con respecto a los organismos en cultivo puro.

## 6. ANTECEDENTES

Se sabe que los hongos y bacterias en el ambiente, son los principales organismos descomponedores, ya que son organismos en su mayoría quimioheterótrofos, que consumen materia orgánica. Son capaces de degradar, monosacáridos, ácidos grasos, aminoácidos, moléculas de peso molecular más elevado, como polisacáridos, lípidos, proteínas, respectivamente; todas ellas son moléculas utilizadas como fuente de carbono y energía (Madigan *et al.*, 2009). sin embargo, se sabe que, a pesar de este tipo de metabolismo de las biomoléculas más comunes, los hongos y bacterias son capaces de degradar o incluso mineralizar por completo, algunas moléculas de estructura más complicada, o que no se encuentran en la naturaleza, conocidas como xenobióticos. Algunos ejemplos de estas moléculas son los hidrocarburos aromáticos, algunos ácidos grasos de cadena larga, hormonas, y colorantes textiles orgánicos, que son las moléculas referidas en la presente investigación.

Un ejemplo de degradación de los colorantes textiles por bacterias es observado por Álvarez. (2013), quien realizó un experimento donde se midió la capacidad de decoloración de *Anoxybacillus flavithermus*. ellos analizaron el efluente de agua residual y obtuvieron que mayoritariamente había dos colorantes presentes, que eran el Negro Reactivo 5 y el Negro Ácido 48, el primero es un colorante di-azo y el segundo una antraquinona. prepararon una mezcla de ambos colorantes simulando el efluente de aguas residuales, y colocaron la biomasa viva de *A. flavithermus*, y obteniendo el 60% de la decoloración en tan sólo 12 horas.

Por otra parte, los hongos son organismos eucariontes, y de más lento crecimiento que una bacteria, y presentan capacidades de producir de igual manera enzimas de

tipo peroxidasas y lacasas, que son las que llevan a cabo principalmente el proceso de decoloración de algunas sustancias como los colorantes textiles. Se sabe que muchos hongos conocidos como de la pudrición blanca como lo son *Phanerocheate chysosporium* que es el más utilizado de este grupo de hongos, ya que es el más estudiado por decolorar una gran gama de colorantes como los son los colorantes azoicos directos y reactivos, colorantes del grupo de las antraquinonas, se han reportado su eficiencia en la remoción del Negro reactivo 5, Rojo Reactivo 158, Amarillo reactivo 27, Naranja II y Azul Reactivo 25, aunque también otros hongos como lo son el *Geotrichum.sp*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Pleorotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, y *Bjerkandera adusta*, presentan capacidad de decoloración de dichos xenobióticos (Sudha *et al.*, 2014)

En relación con otro género fúngico, se sabe que *Bjerkandera adusta* tiene la capacidad de decolorar los colorantes Negro Remazol NF-A, Naranja Remazol RR-Gran y Rojo Remazol INT R-GB, a concentraciones de 10 mg/L, 50 mg/L y 100 mg/L en medio líquido a 21 días con un porcentaje de decoloración de 100%, 81% y 70% respectivamente.

De la misma forma estos colorantes mezclados en medio líquido a una concentración de 100 mg/l cada uno y se realizó a tres pH diferentes, los cuales fueron 4, 6.2 y 9, se obtuvo una decoloración del 91%, de esta mezcla de colorantes para los casos del pH 4 y 6.2 a los 30 días de la cinética, sin embargo, a pH alcalino no decoloro de manera significativa con una máxima de 10% de decoloración al mismo tiempo de incubación (Guzmán-Hernández., 2017)

Sin embargo, poco se sabe hasta el momento sobre degradación de mezclas de colorantes, y solo se han encontrado trabajos como el de Guzmán-Hernández (2017), quien realizó la decoloración de una mezcla de colorantes Negro Remazol NF-A, Rojo Remazol INT R-GB y Naranja Remazol RR-GRAN, por el hongo *Bjerkandera adusta*, que es un hongo de la pudrición blanca, en dicho trabajo logro decoloraciones de la mezcla de colorantes de hasta del 93% del total de los colorantes en un periodo de 21 días en condiciones estacionarias.

Por otra parte, Álvarez *et al.*, (2013) probó a *Anoxybacillus flavithermus* frente a la mezcla de los colorantes Negro Reactivo 5 y negro Ácido 48, donde se alcanzó un porcentaje de decoloración del medio del 68% en tan solo 12 horas de incubación en condiciones aerobias.

Por lo anterior mencionado, es importante hacer notar, que, aunque los trabajos con colorantes individuales aportan información muy valiosa en los efluentes textiles no se encuentran colorantes individuales, si no mezclas de los mismos, por lo tanto, la aportación de un trabajo de decoloración microbiana de mezclas de colorantes, es prometedor para futuros procesos de biorremediación.

De acuerdo a Lade. *et al.*, (2012), encontraron que existe una mayor eficiencia en la de la remoción de los colorantes, utilizando el consorcio consorcio micobacteriano de *Aspergillus ochraceus* y *Pseudomonas sp*, en este experimento observaron que la decoloración del colorante Azo Rubina GLF, fue de 95 % en experimentos *in vitro* de 30 horas, y de un 98% en experimentos de 35 horas, en ninguno de los casos hubo formación de aminas aromáticas que son sustancias carcinogénicas. Además, resalta que se obtuvo una decoloración más rápida en consorcio con respecto a experimentos con organismos individuales.

Por otra parte, Kurade. *et al.*, (2011), lograron remover el colorante Escarlata RR Disperso, con un consorcio micobacteriano, en el cual la parte bacteriana fue la cepa *Brevibacillus laterosporus* MTCC 2298, y la parte fúngica fue *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360. Con dicho consorcio lograron remover el colorante que se encontraba a una concentración de 50 mg/L en 18 horas con un porcentaje de remoción del 98%. Por lo tanto, la utilización de consorcios para la decoloración los cuales se presenta como una estrategia biotecnológica para remover colorantes textiles en efluentes con mezclas de colorantes.

## **7. MARCO TEÓRICO**

### **COLORANTES TEXTILES**

Los colorantes textiles son moléculas compuestas por un cromoforo que es el grupo funcional que se encarga de dar color, este puede ser dobles o triples enlaces entre átomos de carbono y carbono o carbono y nitrógeno. y un auxocromo que son los

grupos funcionales de la molécula de la molécula de colorante, que se encarga de la fijación de la molécula con respecto a la fibra textil. Algunas de ellas son de origen natural, pero otras son de origen sintético. En el caso de los colorantes de interés para el presente trabajo, son de origen artificial, estas molecular al ser sintetizadas no se encuentran en el ambiente, por lo tanto, al ser de origen artificial muy pocos microorganismos son capaces de degradarlos (Walters *et al.*, 2005). Algunos de los ejemplos en cuanto a su clasificación se describen a continuación.

### **COLORANTES DIRECTOS**

Son moléculas largas y planas, que se pueden alinear con las macromoléculas que se fijan en la fibra, por fuerzas de Van der Waals y por puentes de hidrogeno. El 75% de estos colorantes se destina al tintado de las fibras de celulosa (Walters *et al.*, 2005).

### **COLORANTES SULFUROSOS**

Estos colorantes otorgan tonalidades oscuras, son bastante baratos y tiene un amplio uso en la industria textil. Funcionan formando compuestos solubles en agua cuando reaccionan con grupos amino y grupos carboxílicos. Muchos colorantes contienen azufre en su estructura, pero solo pertenecen a este grupo aquellos que se vuelven solubles en agua tras la reacción con sulfuro de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) en pH alcalino (Walters *et al.*, 2005).

### **COLORANTES AZO REACTIVOS**

Un tercio de los colorantes utilizados para teñir las fibras de celulosa o algodón, son los colorantes reactivos; éstos poseen grupos químicos que se unen por medio de enlaces covalentes a la tela. En el caso de la celulosa, los grupos químicos que ayudan a que se unan los colorantes a la fibra son los grupos hidroxilos. El tintado de algodón por esta técnica requiere de un pH de 9.5 a 11, el cual se consigue agregando  $\text{NaOH}$  o  $\text{NaCO}_3$  (Walters *et al.*, 2005). Más de la mitad de los colorantes que comúnmente se utilizan en la actualidad son colorantes azo. Se distinguen por su método de fijación ya que el nexo azoico se sintetiza sobre la tela formando una molécula insoluble de colorante a partir de dos fragmentos solubles en agua: un compuesto de naftol y un compuesto diazotizado. (Walters *et al.*, 2005). Es decir,



de acuerdo con esta clasificación el grupo azo está caracterizado por el doble enlace nitrógeno-nitrógeno es el producto de una reacción química durante la tinción, los colorantes utilizados en este trabajo pertenecen a esta clasificación de colorantes, tal como lo muestra la figura 1, donde se nos muestra la estructura de ambos colorantes utilizados en este trabajo.

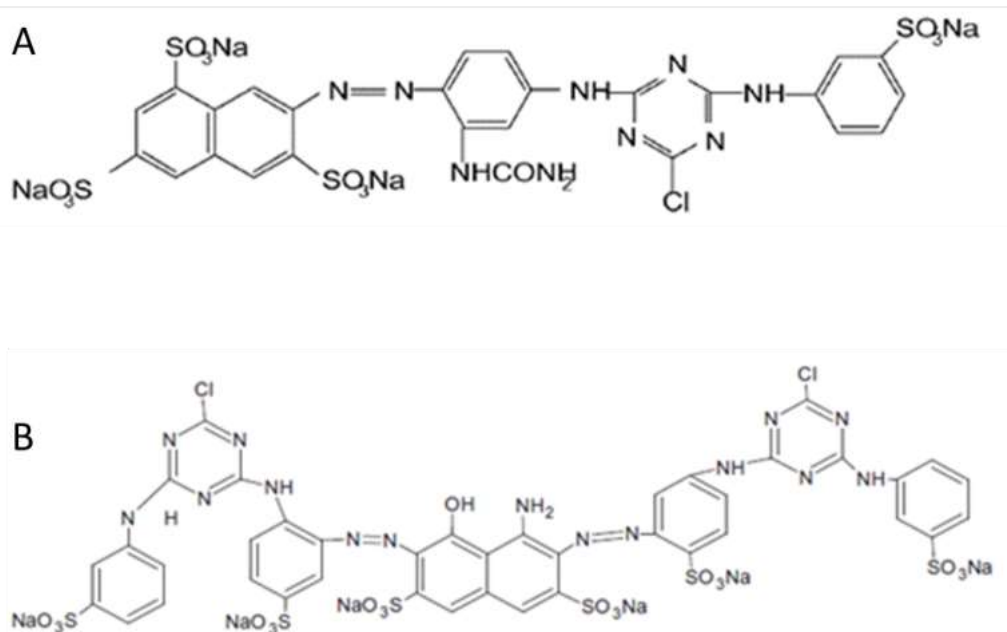


Figura 1. A) colorante Procion® Amarillo H-E4R (Kim *et al.*, 2004). B) colorante Procion® Azul H-ERD (Bansal *et al.*, 2011).

## REMOCIÓN DE COLORANTES TEXTILES EN AGUAS RESIDUALES

Debido a los problemas ambientales asociados a la emisión de colorantes en aguas residuales, se han desarrollado diversos métodos para degradar, eliminar o decolorar estas moléculas en los efluentes textiles. Las tecnologías de remoción diseñadas han considerado operaciones físicas, químicas y biológicas, tales como la concentración del color en lodos, la adsorción del mismo en columnas, o la biodegradación de la molécula.

De acuerdo con Zille *et al.*, (2005), el método empleado dependerá de las características del efluente y de las moléculas, es decir, son específicos de acuerdo con la calidad que tenga el agua. Sin embargo, para este estudio nos interesa saber

específicamente sobre métodos de decoloración biológica, realizada por consorcios de hongos y bacterias.

### **Biodegradación microbiana**

Es un proceso que consiste en la utilización de microorganismos tales como hongos o bacterias, que tienen complejos enzimáticos no muy específicos capaces de reconocer y metabolizar ciertas partes de los compuestos xenobióticos (en este caso los colorantes). Existen reportes de organismos de una sola especie o de asociaciones en consorcios mixtos, en sistemas tanto aerobios como anaerobios, con inmovilización en algún sustrato o libres. Sus costos de operación de estos procesos son relativamente bajos y degrada una gran gama de colorantes utilizados en la tinción de fibras textiles, sin embargo, los procesos requieren una larga fase de aclimatación y puede presentarse resistencia a compuestos recalcitrantes (Nigam *et al.*, 1995, McMullan *et al.*, 2001); por ello se requiere más investigación genética y metabólica.

Los hongos y bacterias son capaces de decolorar este tipo de compuestos, gracias a la degradación enzimática, ésta se basa principalmente en la utilización de complejos enzimáticos. Las enzimas más comúnmente utilizadas para este tipo de procesos son las lacasas y las peroxidasas.

### **Biodegradación de colorantes por consorcios hongo/bacteria**

Los hongos y bacterias son de los principales organismos que se encargan de llevar a cabo procesos de degradación de compuestos recalcitrantes, ya sean naturales o xenobióticos, estos últimos son compuestos que no se encuentran en la naturaleza y son sintetizados de manera artificial, entre este tipo de compuestos tenemos los colorantes azo reactivos que se presentan en este trabajo.

Se sabe mucho de la actividad decolorativa de los hongos frente a los colorantes textiles, un grupo importante de hongo estudiados con este tipo de actividad son los hongos de la pudrición blanca, los cuales, se sabe que secretan enzimas como la peroxidasa dependiente de manganeso (MnP), la lignina peroxidasa (LiP), la Lacasa (Lac), la Tirosinasa (Try), la N-desmetilasa y la celobiosa deshidrogenasa

(Solis *et al.*, 2012). Son enzimas extracelulares, que se sintetizan durante el metabolismo secundario y dependiendo de la especie de hongo, éste puede producir una, dos o las tres (Wesenberg *et al.*, 2003). Se sabe que las peroxidadasas fúngicas (MnP y LiP) son glicoproteínas, con un grupo hemo de protoporfirina, que utilizan hidroperóxidos (como el  $H_2O_2$ ) como dadores de electrones para catalizar un gran número de reacciones oxidativas. En el caso de la MnP, ésta oxida solo grupos fenólicos del sustrato, mientras que la LiP cataliza la oxidación de fenoles e hidrocarburos aromáticos policíclicos (figura 2) (Wesenberg *et al.*, 2003).

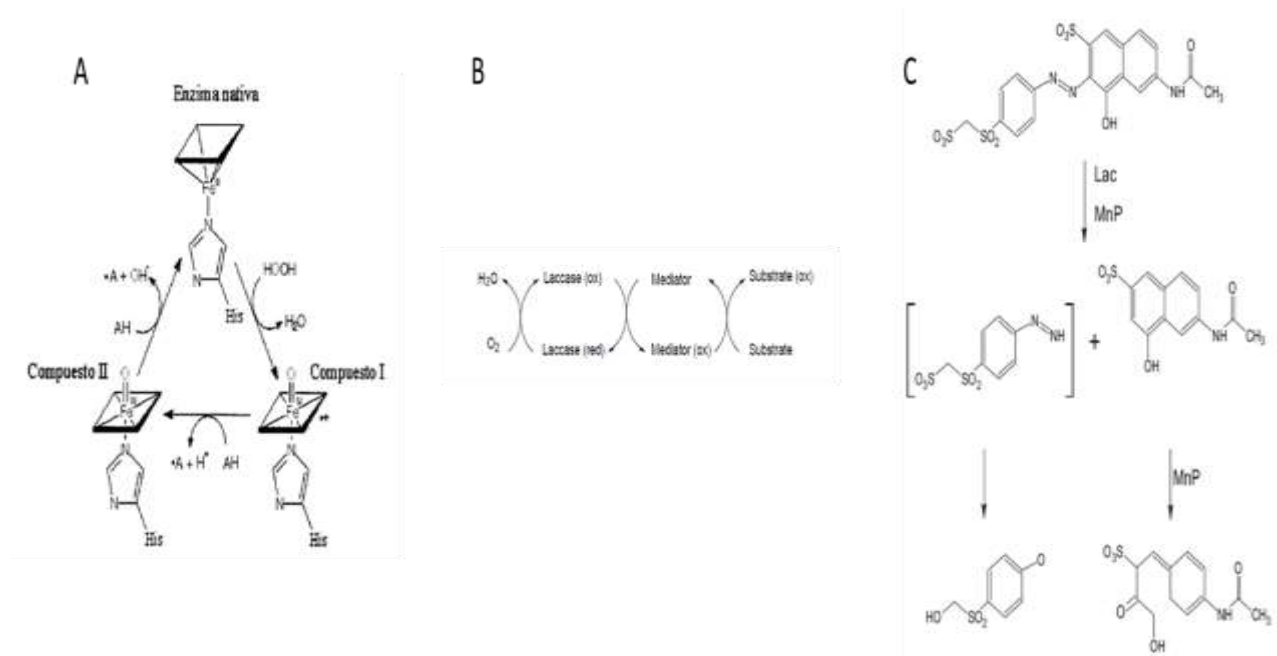


Figura 2. A) Ruta metabólica de las peroxidadasas(Ruiz-Dueñas *et al.*, 1998), B) Ruta metabólica de las lacasas (Zille *et al.*, 2005), C) Ruta metabólica de las peroxidadasas dependientes de manganeso sobre colorante naranja reactivo 16 (Solis *et al.*, 2012) .

En comparación con la decoloración que es llevada a cabo por los hongos, la decoloración por medio de bacterias es más rápida, se sabe también que las bacterias degradan los colorantes azo en condiciones anaerobias, formando aminas aromáticas, esta degradación parcial del colorante se da por enzimas de tipo peroxidadasas, homologas a las de las hongos, dándose las mismas rutas metabólicas que hacen que el medio se decolore, sin embargo la formación de estas aminas aromáticas es un problema severo, ya que son altamente cancerígenas, y este tipo de moléculas solo se forman en condiciones anaerobias, por lo que es importante

que en el tratamiento se contemple una fase aerobia después de una fase anaerobia para que las bacterias puedan llevar a cabo la degradación de las aminas aromáticas a compuestos menos peligrosos o incluso a una completa mineralización (Ali, 2010).

### **Consortios de hongos y bacterias utilizados en decoloración de efluentes textiles**

En la naturaleza es imposible encontrar cultivos puros de microorganismos, se suelen encontrar los microorganismos en coexistencia, en competencia por los nutrientes disponibles en el ambiente. Sin embargo, en el medio ambiente se encuentran también en forma de consorcios, un tipo relación mutualista en donde ambos organismos salen beneficiados. Este tipo de relación puede darse entre hongos (filamentosos y levaduras), bacterias y microalgas, ya que suele favorecer la sobrevivencia ante múltiples factores ambientales. Con base en ese comportamiento natural se han ideado para ser utilizados en muchos procesos de biorremediación de ambientes contaminados con compuestos orgánicos persistentes, tales como hidrocarburos aromáticos y moléculas de colorantes como las utilizadas en la tinción de fibras de algodón que es el tema central de esta investigación (Ali, 2010).

Se sabe que la utilización de consorcios de hongos y bacterias e incluso microalgas, optimiza la decoloración del medio contaminado con colorantes, ya que la acción en conjunto mejora la decoloración, dado a la diversidad metabólica del consorcio es aún mayor, ya que, mediante dicha asociación, los hongos bacterias y microalgas, y se secretan al medio enzimas capaces de degradar los grupos funcionales de los colorantes. estas enzimas pueden atacar diferentes partes del contaminante y proporcionar una estabilidad enzimática, debido a que provienen de varias especies, pueden soportar variaciones fisicoquímicas del medio, como lo son pH, temperatura, salinidad, entre otras. Este tipo de asociación es muy eficiente y tiene un gran potencial para ser aplicado en procesos de depuración de efluentes textiles ya que estas asociaciones en algunas ocasiones llegan a lograr una mineralización completa del contaminante en cuestión (Ali, 2010).

Este tipo de consorcios pueden darse en dos tipos de estructuras, ya sea la formación de una biopelícula (figura 3A) sobre algún material sintético o natural, o la formación de flóculos (figura 3B) (Loera-Muro *et al.*, 2012).

En ambos casos la formación de estas estructuras implica la adhesión de las células entre sí mismas, el armazón o esqueleto del floculo o biopelícula puede encontrarse formado ya sea por hongos filamentosos o bacterias filamentosas, y en ellas se adhieren las bacterias que se encuentran en el ambiente, por medio de sustancias adhesivas como lo son los EPS (sustancias poliméricas extracelulares, por sus siglas en ingles), lo cual confiere al floculo o biopelícula fuerza y funcionalidad frente a condiciones como lo son bajas concentraciones de oxígeno o corrientes hidráulicas fuertes y ataque de protozoos y rotíferos (sin embargo por estas mismas variables se ve modificado su tamaño), sin embargo estos consorcios son el tipo de formas que podemos encontrar tanto en la naturaleza como en procesos de tratamientos de aguas residuales (Loera-Muro *et al.*, 2012).

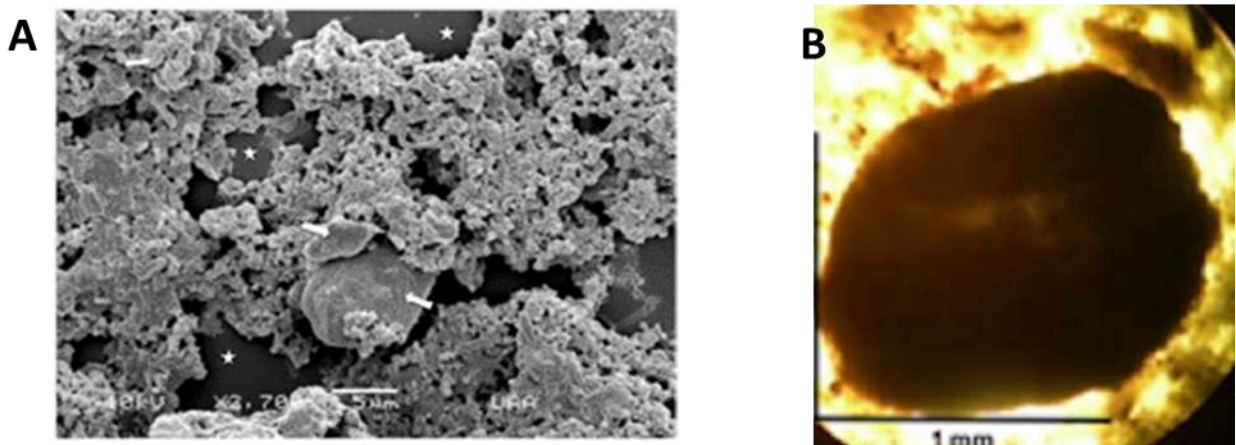


Figura 3. A) biopelícula formada por microorganismos en consorcio, B) floculo formado por microorganismos en consorcio (Loera-Muro *et al.*, 2012).

Otra propiedad importante de los consorcios en la biodegradación y decoloración de los colorantes textiles, es que gracias a las rutas metabólicas de varios organismos que participan en el proceso de decoloración, no generan o generan muy pocas cantidades de compuestos que son nocivos para la salud ambiental y humana. Un ejemplo de la formación de estos compuestos dañinos son las aminas aromáticas, las cuales tienen propiedades altamente cancerígenas y estas aminas

aromáticas se generan en procesos de decoloración anaerobia por parte de las bacterias (Solís *et al.*,2012).

Se sabe además que los hongos y las propias bacterias son capaces de eliminar este tipo de compuestos a otros sin un impacto tan grande en el ambiente, tales como lo son alcoholes y amidas, que son de fácil degradación en el medio. Debe hacerse notar que por lo general este tipo de eliminación de subproductos metabólicos nocivos se origina también en condiciones aerobias, y se eficientiza más con el empleo de consorcios, ya que tanto lo flóculos y biopelículas, en las que se presentan estos consorcios son más resistentes al cambio de concentraciones de oxígeno disuelto en el medio. Por lo cual la utilización de consorcios favorece la eliminación de compuestos tóxicos, en este caso de colorantes textiles tipo azo reactivos (Solís *et al.*, 2012).

Un ejemplo de un cultivo mixto o consorcio exitoso que han sido reportados es el de *Apergillus ocraceus* y la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, que son capaces de llevar a cabo una decoloración del 98% en tan solo 24 horas en sistema tipo Bach. La propuesta de los autores consiste en alternar una fase anaerobia que se extiende por 12 horas y una aerobia que dura alrededor de 4 horas, y que permiten oxidar los productos tóxicos como lo son las aminas aromáticas y algunos compuestos fenólicos. De esta manera el proceso es más eficiente e inocuo para el cuerpo de agua receptor (Solís *et al.*, 2012).

## **8. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **COLORANTES**

Los colorantes textiles que fueron utilizados en esta investigación, pertenecen a la marca DyStar™ y sirven para teñir algodón, dichos colorantes son: colorante Procion® Amarillo H-E4R, colorante Procion® Azul H-ERD, estos colorantes son los que principalmente se utilizan en la industria textil en Michoacán para el teñido de fibras de algodón, y los que podemos encontrar, de manera mayoritaria en los efluentes de aguas residuales de dicha industria.



Figura 4. A) Procion® Amarillo H-E4R, B) colorante Procion® Azul H-ERD.

### **Material Biológico**

El aislado bacteriano AGA8 fue proporcionado por el laboratorio de investigaciones y servicios en microbiología acuática (LISMAC) perteneciente a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Dicho aislado, proviene de un efluente textil del municipio de Zinapécuaro Michoacán. También se utilizaron aislados que están previamente identificados uno de ellos fue *Trametes versicolor* el cual es un hongo basidiomiceto de la pudrición blanca, y una bacteria llamada *Burkholderia xenovorans* LB4000, la cual fue proporcionada por el laboratorio del doctor Carlos Cervantes Vega profesor investigador en el Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas.

### **Medios de cultivo**

#### **Medio agar dextrosa papa (PDA)**

Se empleó este medio de cultivo para el mantenimiento del hongo. Su preparación se describe en el Anexo I.

#### **Medio Agar nutritivo (AN)**

Este medio se empleó para el crecimiento y mantenimiento de la bacteria, este medio es un medio general utilizado para el crecimiento de microorganismos poco exigentes en cuanto a fuente de carbono, este medio se disolvió con la ayuda de un termoagitador y temperatura hasta fundir completamente todos los componentes, y después de sometió a un proceso de esterilización en calor húmedo a 121°C por 15 minutos, y posteriormente se dispuso en cajas Petri estériles.

### **Medio de cultivo líquido mínimo (Xiao-ling Hea *et al.*, 2018)**

Este medio se utilizó para realizar las cinéticas en medio líquido que permitirán evaluar tanto el crecimiento como la decoloración. Este medio se utilizó principalmente para comprobar si los colorantes Procion Blue y Procion Yellow serían utilizados como fuente de carbono y energía al ser estos la fuente mayoritaria de carbono del medio además que se sabe que tiene como fuente de nitrógeno el nitrato de amonio el cual además estimula la producción de las lacasas por parte de los hongos de la pudrición blanca. La preparación del medio mínimo para hongos y bacterias se nos muestra más a detalle en el Anexo. El diseño experimental consideró tres repeticiones.

### **CINÉTICA DE DECOLORACIÓN**

#### **Mantenimiento en medio PDA (Cohelo-Moreira *et al.*, 2013)**

Con la finalidad de almacenar, sembrar y manejar la cepa de *Trametes versicolor*, ésta se mantuvo en medio PDA. A partir del cultivo inicial, y con un sacabocados de 1 cm de diámetro, se perforó el medio que contenía al micelio y se inoculó en una caja Petri con medio PDA estéril. Se selló con cinta parafilm y se incubó a una temperatura de 23°C en condiciones de oscuridad por 12 días. Durante el proceso de siembra y resiembra se deben de mantener las condiciones estériles con mechero.

#### **Mantenimiento en medio agar nutritivo**

Con la finalidad de almacenar y manejar y reproducir la bacteria, esta se cultivó en medio agar nutritivo, la inoculación se realizó tomando una muestra de la colonia bacteriana de interés, con un asa bacteriológica, y se procedió a hacer un estriado en forma de cuadrante sobre una placa de medio de agar nutritivo estéril, se selló con parafilm, y se incubó a una temperatura de 25° C durante 24 horas.



### **Cinética de crecimiento y decoloración en medio líquido mínimo selectivo para hongos y bacterias (Xiao-ling Hea et- al., 20018)**

En el caso de la cinética de decoloración de las bacterias se llevó a cabo por un ciclo de 24 horas, se colocó 1 ml de preinóculo diluido a una concentración de  $1 \times 10^3$  UFC, y se colocó en matraces Erlenmeyer de 125ml, con 50 ml con el medio líquido mínimo a 25°C y a 60 rpm, a concentraciones de 300 mg/L y 500 mg/L, a dos pH, uno de 5.2 y otro de 8.6, cada uno de los tratamientos se realizó por triplicado, haciendo medición de decoloración por medio de espectrofotometría de luz visible, a una longitud de onda de 411nm para el colorante Proción Yellow y una longitud de onda de 620nm para el colorante Proción Blue, de crecimiento se midió por espectrofotometría a una longitud de onda de 600nm, ambas mediciones se realizaron cada 2 horas.

Para el caso de la cinética de decoloración y crecimiento de *T.versicolor* , se extrajeron 7 discos de 1 cm de diámetro, provenientes de una placa inoculada con el hongo, y se colocan en matraces Erlenmeyer de 125ml, con 50 ml del medio líquido mínimo, dicha cinética se llevó a cabo por un ciclo de 5 días, las condiciones de la cinética fueron a una temperatura de 25°C y a 60 rpm, los tratamientos fueron a dos concentraciones de 300 mg/L y 500mg/L, a dos pH diferentes en cada una de las concentraciones, los cuales fueron de 5.2 y de 8.6, cada uno de estos tratamientos se realizó por triplicado, el crecimiento se midió por medio de peso seco, para esto se utilizó un papel filtro Whatman del # 8, de peso conocido y se separó la biomasa del sobrenadante, y se colocó el papel con la biomasa en una mufla a 40°C por 24 horas hasta secar y alcanzar peso estable y se procedió a medir el peso del papel con biomasa y sacar la diferencia de peso del papel con biomasa menos el peso del papel sin biomasa. Para el caso de la medición de la decoloración se realizó por medio de espectrofotometría de luz visible, en la cual se midió la absorbancia del sobrenadante a una longitud de 411 nm para el colorante Proción Yellow, y una longitud de onda de 620 nm para el colorante Proción Blue.

En el caso de la cinética para los consorcios, los tratamientos fueron los mismos que para los casos de las cinéticas de crecimiento y decoloración, de los hongos y las

bacterias, se realizaron a las concentraciones y los pH anteriormente citados, sin embargo para este experimento también se coloro 1 ml de cultivo de preinóculo, de las bacterias una dilución de  $1 \times 10^{-3}$ , y 7 discos de 1 cm de diámetro del hongo y se colocan en matraces Erlenmeyer de 125 ml, con 50 ml con el medio líquido mínimo, a 25 °C y a 60 rpm, en este experimento para la medición de la biomasa fúngica se realizó por peso seco explicada en el párrafo anterior, y la medición de la biomasa bacteriana se realizó de manera diaria a una longitud de onda de 600 nm, como se explicó anteriormente, en el caso de la cinética de decoloración se midió de igual forma a las longitudes de onda de 410 nm para el Proción Yellow, y de 620 nm para el Proción Blue.

### **ELABORACIÓN DE CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA LOS COLORANTES**

Se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis, marca Hach modelo DR6000. Con el programa de barrido de longitud de onda, se colocaron soluciones con concentraciones conocidas de los colorantes, que iban de 10 mg/L a 100mg/L, y se programó un barrido de longitudes de onda desde los 400 nm, hasta los 700 nm, haciendo mediciones cada nanómetro. Con las absorbancias máximas se obtuvo un promedio de todas las absorbancias máximas para así determinar la longitud de onda que se usaría en cada colorante. La misma información ayudo a obtener la curva de calibración cuya regresión lineal aportó la ecuación para transformar la absorbancia máxima de cada concentración a mg/L.

### **Diseño experimental**

Como variables se utilizaron las concentraciones de 300 mg/L y 500 mg/L. Además, se incluyó la variable de pH con dos valores de pH uno ácido y uno alcalino. Con lo cual se realizó una factorial de 2x2 para cada de los organismos individuales y consorcios. Contemplando a los microorganismos de forma individual y en consorcio, se obtuvo un diseño de 10 tratamientos para cada una de las concentraciones analizadas.

Tabla 2. Diseño factorial.

	300 mg/L	500 mg/L
pH 5.2	<i>T.versicolor</i>	<i>T.versicolor</i>
pH 8.6	<i>T.versicolor</i>	<i>T.versicolor</i>
pH 5.2	<i>T.versicolor</i> + <i>B.xenovorans</i>	<i>T.versicolor</i> + <i>B.xenovorans</i>
pH 8.6	<i>T.versicolor</i> + <i>B.xenovorans</i>	<i>T.versicolor</i> + <i>B.xenovorans</i>
pH 5.2	<i>T.versicolor</i> + AGA8	<i>T.versicolor</i> + AGA8
pH 8.6	<i>T.versicolor</i> + AGA8	<i>T.versicolor</i> + AGA8
pH 5.2	<i>B.xenovorans</i>	<i>B.xenovorans</i>
pH 8.6	<i>B.xenovorans</i>	<i>B.xenovorans</i>
pH 5.2	AGA8	AGA8
pH 8.6	AGA8	AGA8

## 9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) en el programa estadístico Statistica 7.1, y una prueba de Tukey, con la finalidad de comparar las capacidades de decoloración entre consorcios y los organismos de manera individual y determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre las capacidades de decoloración de cada consorcio.

## 10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### CINÉTICAS DE CRECIMIENTO

#### Crecimiento Bacteriano a diferentes pH y concentraciones de colorantes

Para cumplir el objetivo del presente trabajo, el cual fue determinar si los colorantes Procion Blue y Procion Yellow, eran utilizados como fuente de carbono y energía y además decolorados, fue necesario la medición del crecimiento bacteriano de *B. xenovorans* y el aislado AGA8 a un pH ácido de 5.2 y un alcalino de 8.6, y a concentraciones de mezcla de colorantes de 300 mg/L y 500 mg/L.

En el caso del crecimiento de *B. xenovorans*, tal como se observa en la figura 5, hubo un mayor crecimiento en el control positivo donde *B. xenovorans* crece en medio caldo nutritivo donde la bacteria tiene los requerimientos necesarios para su metabolismo y división celular, sin embargo, al compararlo con los tratamientos con las mezclas de colorantes encontramos diferencias estadísticamente significativas, observándose menor crecimiento en los tratamientos con mezclas de colorantes, con respecto a este control.

Por otra parte en la misma figura 5, se observa que en el caso de tratamiento de *B. xenovorans* en medio mínimo sin colorantes (control experimental), no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ese tratamiento y los tratamientos pH 5.2, donde se observa que las curvas tienen el crecimiento parecido, sin embargo en los tratamientos a pH 8.6 si se observaron diferencias estadísticamente significativas, por lo tanto se puede decir que *B. xenovorans* al presentar crecimiento parecido en el tratamiento de medio sin colorantes (control experimental) y los tratamientos de pH 5.2, no utiliza los colorantes como fuente de carbono y energía, y la poca decoloración presentada del medio se puede deber a fenómenos fisicoquímicos de las bacterias. Sin embargo, estos mecanismos tan específicos no fueron el tema central de este trabajo.

Por otra parte, el tratamiento sin colorantes en comparación con los tratamientos a pH alcalino de 8.6 se observó un mayor crecimiento en el primero, esto se puede

deber a que el pH influye en el poco crecimiento de la bacteria y no es la presencia y ausencia de los colorantes en el medio lo que determina el resultado.

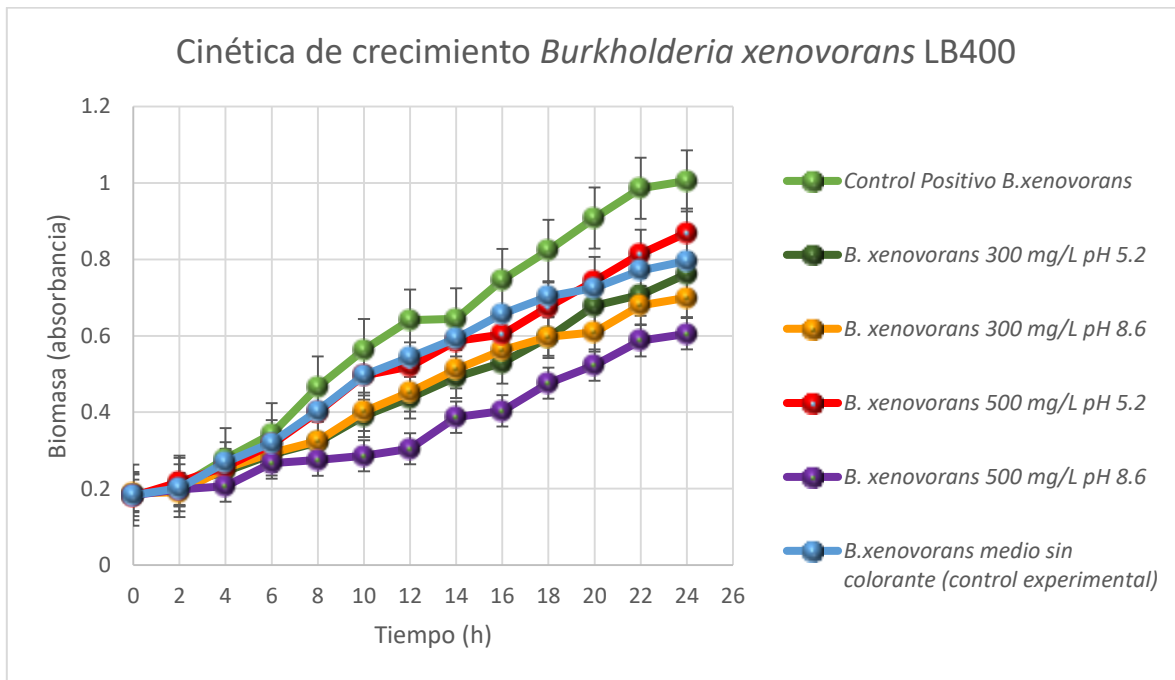


Figura 5. Cinética de crecimiento bacteriano, de *B. xenovorans* en condiciones de pH de 5.2 y 8.6, a concentraciones de una mezcla de colorantes de 300 mg/L y 500 mg/L, durante un periodo de incubación de 24 horas a 25°C.

En el caso de la cinética de crecimiento del aislado AGA8 presentado en la figura 6, se observa que AGA8 tuvo mejor crecimiento en el tratamiento control positivo, el cual fue el tratamiento donde AGA8 tenía todos los requerimientos nutricionales para su desarrollo, el cual fue inoculados en caldo nutritivo y se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el control positivo con respecto a los tratamientos en medio mínimo con mezcla de colorantes y el tratamiento en medio mínimo sin colorantes (control experimental).

Por otra parte, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento en medio de mínimo sin colorantes (control experimental) y el medio mínimo con mezcla de colorantes encontrándose un mayor crecimiento en el medio sin colorantes, por lo tanto, el aislado AGA8 no parece utilizar los colorantes como

fuentes de carbono y energía, y la presencia de los mismos, como se observa en la figura 6, inhibe el crecimiento de AGA8.

De igual modo, se observa que el aislado AGA8 tiene un mayor crecimiento a pH 5.2 que a 8.6 y se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre estos tratamientos, tal como se observa en la figura 6, por lo tanto, el pH ácido favorece el crecimiento de este aislado bacteriano.

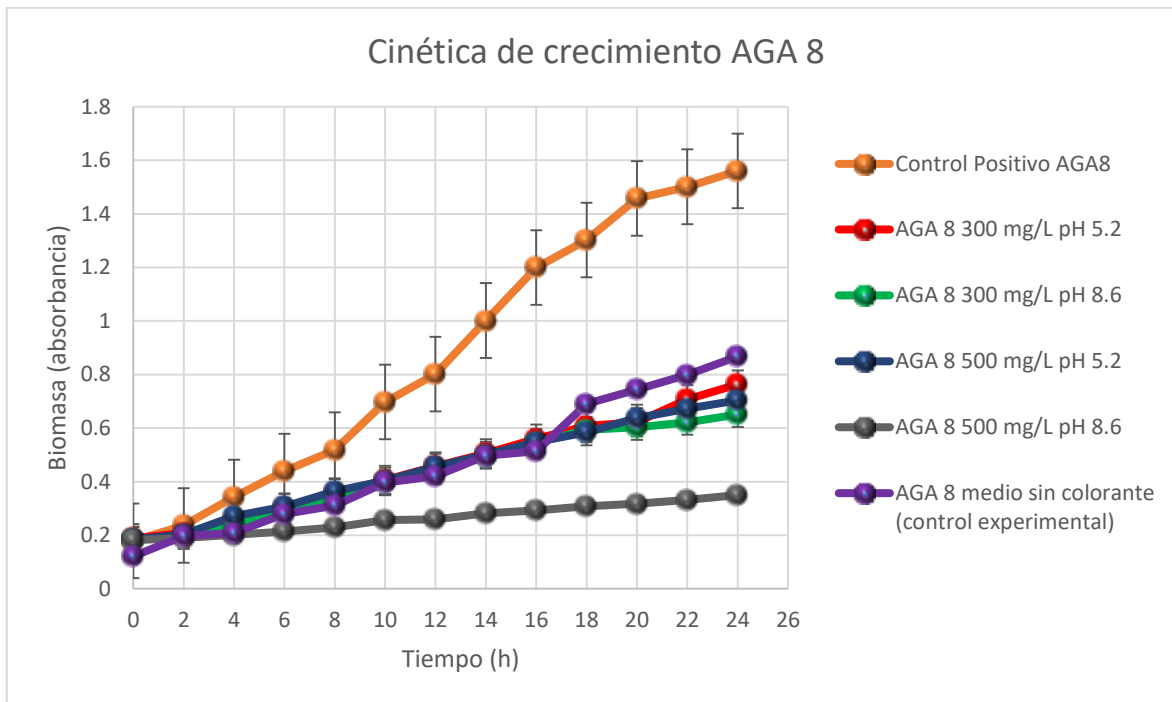


Figura 6. Cinética de crecimiento bacteriano, de AGA8 en condiciones de pH de 5.2 y 8.6, a concentraciones de una mezcla de colorantes de 300 mg/L y 500 mg/L, durante un periodo de incubación de 24 horas a 25°C.

A manera de discusión en el caso de las cinéticas de crecimiento de las bacterias, el por qué se utilizaron los pH 5.2 y 8.6, el primero fue dado a que el pH del medio mínimo más las mezclas de colorantes dio como resultado en promedio 5.2. El pH 8.6 de acuerdo a Guadarrama-Cárdenas. J. en 2018 encontró que el pH del efluente T-ANNA está entre los valores de 8.6 y 9, por eso se determinó la utilización del pH 8.6.

El pH fue determinante en el crecimiento bacteriano pero más aún determinante fue la concentración del sustrato aprovechable como fuente de carbono y energía, y como se observó en ninguno de los tratamientos las bacterias mostraron evidencia de utilizar los colorantes como fuente de carbono, y se observó que prefieren sustratos de más fácil oxidación como lo es la glucosa ya que se observó que en los tratamientos con medio mínimo, que tiene el 1% de glucosa, las bacterias tienen un crecimiento mayor, pero no igual al tratamiento en caldo nutritivo, donde es un medio general que tiene los requerimientos nutricionales para las bacterias.

Otra cuestión que debe resaltarse en las figuras 5 y 6, es que en la concentración de la mezcla de colorantes no afectó el crecimiento bacteriano ya que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre cada uno de los tratamientos de diferente concentración. Por lo cual el pH fue determinante en el crecimiento bacteriano que fue donde sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos a diferentes pH.

En resumen, *AGA8* y *B. xenovorans* no son capaces de utilizar los colorantes Procion Blue y Procion Yellow como fuente de carbono y de energía, pues el medio mínimo es específico para comprobar uso de fuente de carbono y energía, de acuerdo a Xiao-Ling Hea *et al.*, (2018).

## **CRECIMIENTO FÚNGICO**

Uno de los objetivos de este trabajo fue determinar la curva de crecimiento de *T. versicolor*, para posteriormente poder comparar su capacidad para utilizar los colorantes como fuente de carbono y energía. De acuerdo a Ketty A *et al.*, (2012), y a Solís y colaboradores en 2013, *T. versicolor* es un hongo de la pudrición blanca capaz de decolorar y mineralizar compuestos aromáticos, debido a que puede producir enzimas de tipo lacasas. Estas últimas utilizan el oxígeno del medio para oxidar los grupos aromáticos, de los colorantes textiles y promueven la formación ácidos carboxílicos, los cuales son metabolizados en la mitocondria por la  $\beta$  oxidación, donde incluso pueden ser mineralizados hasta agua y dióxido de carbono.

## Crecimiento fúngico en general

Los resultados se muestran en las figuras 7 y 8. Puede apreciarse que el pH tiene influencia en el crecimiento de *T. versicolor*, ya que existieron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos a pH 5.2 y 8.6.

En el caso particular de la figura 7 donde se presentan las cinéticas en medio ácido, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la curva control que fue donde *T. versicolor* se encontraba crecimiento en caldo papa dextrosa, con respecto a las curvas en los tratamientos de 300 mg/L y 500 mg/L a pH 6, observándose un mayor crecimiento en el caldo papa dextrosa (Control positivo), que es donde *T. versicolor* tenía a su disposición fuentes de carbono como glucosa y almidón de papa, las cuales son más fácilmente aprovechables por el hongo, dado que no requiere síntesis de enzimas especiales como las lacasas, y por lo tanto incorpora de manera más fácil dichos carbohidratos al catabolismo para obtener carbono y energía.

Por otra parte, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de *T. versicolor*, *T. versicolor* + *B. xenovorans* y *T. versicolor* + AGA8 a concentraciones de mezcla de colorantes de 300 mg/L y 500 mg/L, con respecto a la curva de crecimiento de *T. versicolor* en control experimental (medio sin colorantes).

Por lo tanto, dado a este resultado, se sabe que *T. versicolor* tanto en los tratamientos en cultivo mixto con las bacterias *B. xenovorans* y AGA8, fue capaz de utilizar los colorantes Proción Blue y Proción Yellow como fuente de carbono y energía, ya que su crecimiento en presencia de la mezcla de colorantes fue mayor que en ausencia de los mismos.

De acuerdo también a la variable del pH. A un pH 5.2, dado que este pH de acuerdo a los resultados obtenidos es donde la biomasa fúngica se vio aumentada con respecto a los tratamientos en pH alcalino de 8.6.



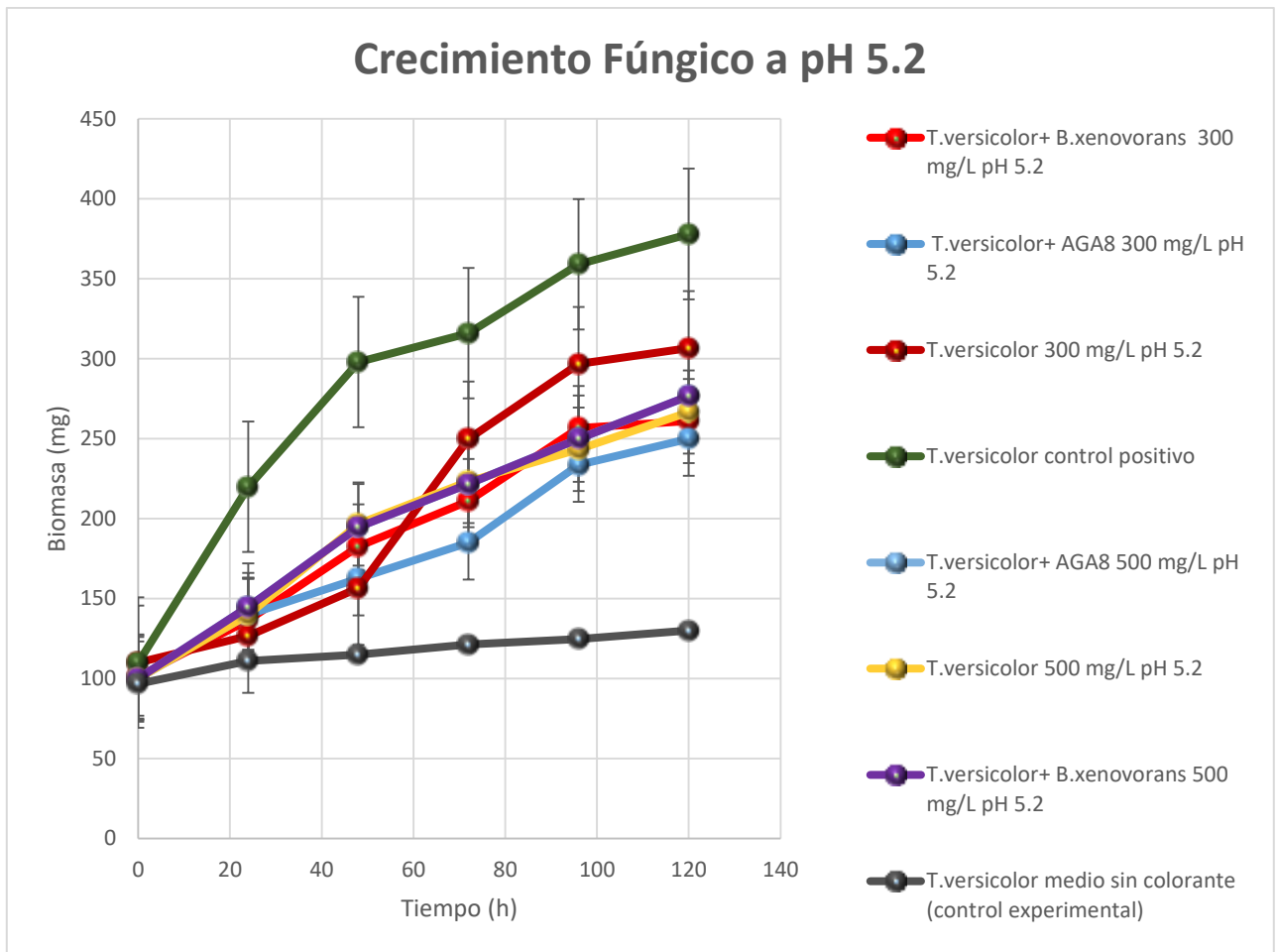


Figura 7. Cinética de crecimiento fúngico de manera individual de *T. versicolor*, crecimiento de biomasa fúngica en consorcios de *T. versicolor* + *AGA8* y *T. versicolor* + *B. xenovorans*, en condiciones de pH 5.2 a concentraciones de 300 mg/L y 500 mg/L, por un tiempo de incubación de 120 horas a 25°C.

En el caso del crecimiento fúngico (figura 8), se observó que a un pH 8.6, había diferencias estadísticamente significativas de los tratamientos con colorantes en medio mínimo con respecto al control positivo, ya antes mencionado, observándose un mayor crecimiento en la curva del control positivo que en los tratamientos con colorantes. Por otra parte, en el caso del tratamiento sin colorantes (control experimental) no se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los tratamientos de 300 mg/L y 500 mg/L a un pH 8.6, por lo tanto, bajo estas condiciones *T. versicolor* no es capaz de utilizar a los colorantes como fuente de carbono y energía, siendo el pH alcalino un limitante en el aumento de la biomasa fúngica en el medio (Fig. 8)

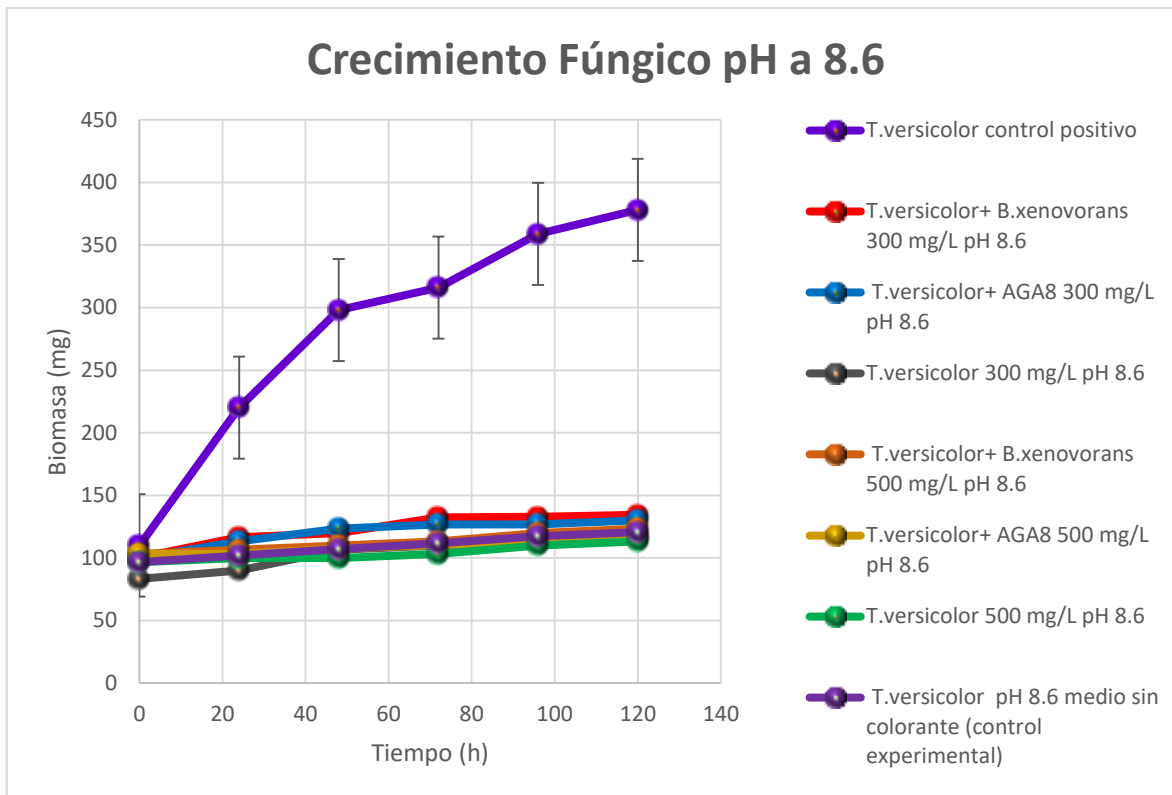


Figura 8. Cinética de crecimiento fúngico de manera individual de *T. versicolor*, crecimiento de biomasa fúngica en consorcios de *T. versicolor* + AGA8 y *T. versicolor* + *B. xenovorans*, en condiciones de pH 8.6 a concentraciones de 300mg/L y 500mg/L, por un tiempo de incubación de 120 horas a 25°C.

Como parte de la discusión, de acuerdo a Xiao-ling Hea et al., (2018), ellos comprobaron que para que el hongo *Trichoderma tomentosum*, pudiera crecer y decolorar el medio de cultivo debería de tener una fuente de carbono de rápida oxidación como lo es la glucosa al 1%. ya que esta serviría como arranque para que el hongo produjera las enzimas necesarias para la oxidación de los xenobióticos.

También observaron que el nitrato de amonio además de ser una fuente de nitrógeno, este compuesto podría estimular la producción de las lacasas que son las enzimas encargadas de la oxidación de los compuestos aromáticos hasta ácidos orgánicos.

Otro punto a resaltar, se observó también consecuente a el resultado detallado en el párrafo anterior, *T. versicolor* tanto en los tratamientos en cultivo puro y en consorcios con las bacterias, se observó que *T. versicolor* no tuvo mayor crecimiento en biomasa (figuras 7 y 8).

### **Crecimiento en consorcio**

los consorcios hongo bacteria, son un elemento importante en la decoloración de los colorantes textiles, ya que son los que proporcionan una diversidad metabólica, al liberar al medio enzimas extracelulares por ejemplo las lacasas, en este trabajo se utilizó AGA8 que es un aislado bacteriano que se obtuvo del efluente textil de la empresa T-ANNA y que hasta el momento se sabe que es un bacilo Gram positivo que forma endosporas, que mostro capacidad de decoloración del colorante Procion Blue a los 42 días. La otra bacteria utilizada fue *Burkholderia xenovorans* LB400, que es un bacilo Gram negativo, que tiene capacidad de absorción de metales pesados (Guadarrama–Cárdenas. 2017)

Los consorcios son la parte medular del presente trabajo, ya que se utilizaron 2 consorcios lo cuales fueron *T. versicolor* + *B. xenovorans*, y *T. versicolor* + AGA8. Estos consorcios se utilizaron para determinar si se mejoraba la decoloración de la mezcla de colorantes, estos se sometieron a dos pH que fueron el 5.2 y el 8.6, a estas condiciones de pH ya que 5.2 es el pH del medio sin modificar, y 8.6 pH del efluente textil. y a dos concentraciones que fueron 300 mg/L y 500mg/L que son por lo regular las concentraciones de colorantes en los efluentes textiles.

El control positivo fue el medio Caldo nutritivo, que fue donde las bacterias crecieron de manera normal al tener los requerimientos nutricionales necesarios, y el control experimental fue el experimento donde no se le siniestraron los colorantes como fuente de carbono a las bacterias.

En el caso de la curva de crecimiento bacteriano en consorcio se observó de acuerdo a la figura 9. Que en el caso de las curvas control positivo, donde hubo mayor crecimiento de las bacterias *B. xenovorans* y AGA8 que con respecto a los

tratamientos, observándose diferencias estadísticamente significativas entre las curvas control positivo con respecto a los tratamientos.

Sin embargo, al observar el crecimiento individual de las bacterias en las figuras 5 y 6, y comparar los datos de crecimiento bacteriano con la figura 9, se observa que en el caso del cultivo mixto o consorcio hongo bacteria se vio ralentizado el crecimiento bacteriano.

Lo anterior es un indicio de que el crecimiento bacteriano puede verse afectado por la presencia del hongo en el medio, ya que el hongo además de establecer una competencia por los nutrientes del medio, puede secretar algunas sustancias que inhiban o ralenticen el crecimiento de la bacteria, se sabe que históricamente los hongos se conocen por su capacidad de producción de sustancias antimicrobianas, y *T. versicolor* no es la excepción ya que Ketty. A *et al.*, (2012) menciona que *T.versicolor* es capaz de sintetizar diversos productos del metabolismo secundario, desde sustancias antimicrobianas y antivirales hasta gamma-interferón e interleucina 2, y es un producto muy apreciado en Japón dado a su utilización biotecnológica y medicinal, sin embargo el objetivo de este trabajo no es determinar la capacidad antimicrobiana de *T.versicolor*, sin embargo es un indicio para trabajos posteriores donde se pueda determinar y detallar la supuesta capacidad antimicrobiana frente a estas cepas y frente cepas modelo.

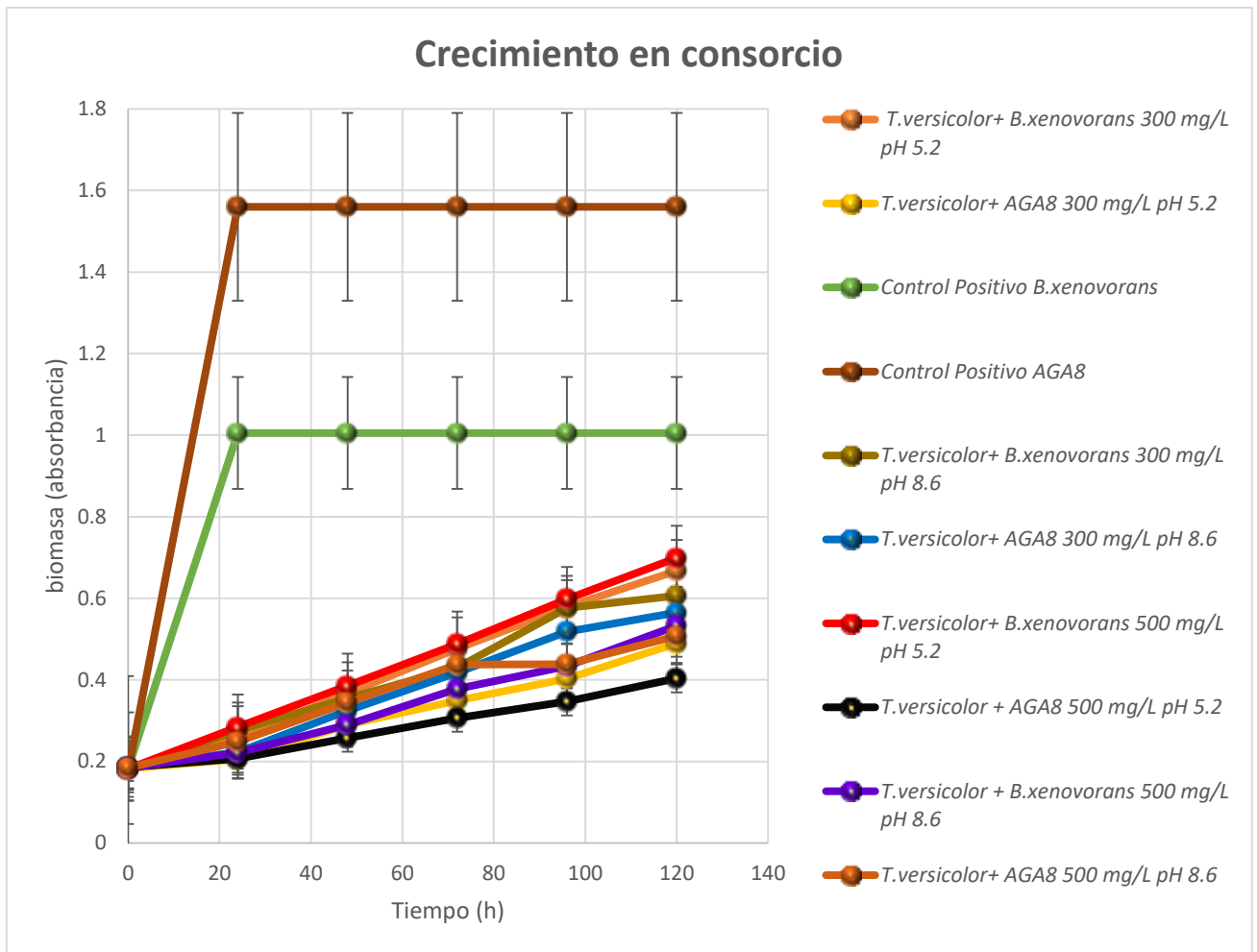


Figura 9. Crecimiento bacteriano de *B. xenovorans*+ *T. versicolor* y AGA8 + *T. versicolor*, en condiciones de pH de 5.2 y 8.6 a concentraciones de colorante de 300 mg/L y 500mg/L, durante un periodo de incubación de 120 horas a 25°C.

## CINÉTICAS DE DECOLORACIÓN

El principal objetivo de este trabajo fue determinar si los organismos por separado y en consorcio o cultivo mixto eran capaces de llevar a cabo la decoloración de los colorantes Procion Blue y Proción Yellow. Se sabe que *T. versicolor* tiene la capacidad de producir enzimas de tipo lacasas y peroxidases las cuales utiliza en la naturaleza para la degradación de la lignina la cual tiene grupos aromáticos en su estructura, que son muy parecidos a porciones estructurales de los colorantes azo (Solís *et al.*, 2013). Por otra parte, de acuerdo a Guadarrama-Cárdenas. 2019) encontró que la bacteria AGA8 tiene la capacidad de llevar a cabo la decoloración del Procion Blue, al igual que *B. xenovorans*.

Las cinéticas que se reportan en la parte siguiente fue registrada fotográficamente como se muestra en el Anexo II.

### **Decoloración bacteriana**

En este trabajo se trató de observar si existía la capacidad de decoloración del medio de cultivo cuando las bacterias se encontraban en creciendo en dicho medio. Las variables que se evalúan son la concentración y el pH. En la Figura 10 puede observarse que a una concentración de 300 mg/L y a un pH de 5.2, hay una clara diferencia estadística entre la capacidad de decoloración de los colorantes Procion Blue y Procion Yellow. Se aprecia un mayor porcentaje de decoloración del colorante Procion Blue con respecto al Procion Yellow, en un valor de 9.05% y 23.68% para los tratamientos con AGA8 y *B. xenovorans* respectivamente. Existen diferencias estadísticamente significativas entre la capacidad de decoloración del Procion Blue entre ambas bacterias. Ya que *B. xenovorans* decolora en mayor proporción.

En el caso de la decoloración del Procion Yellow, se obtuvieron porcentajes de decoloración 4.7% y 5.29% para las cepas AGA8 y *B. xenovorans*, y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la decoloración del Procion Yellow para estos dos tratamientos (figura 10).

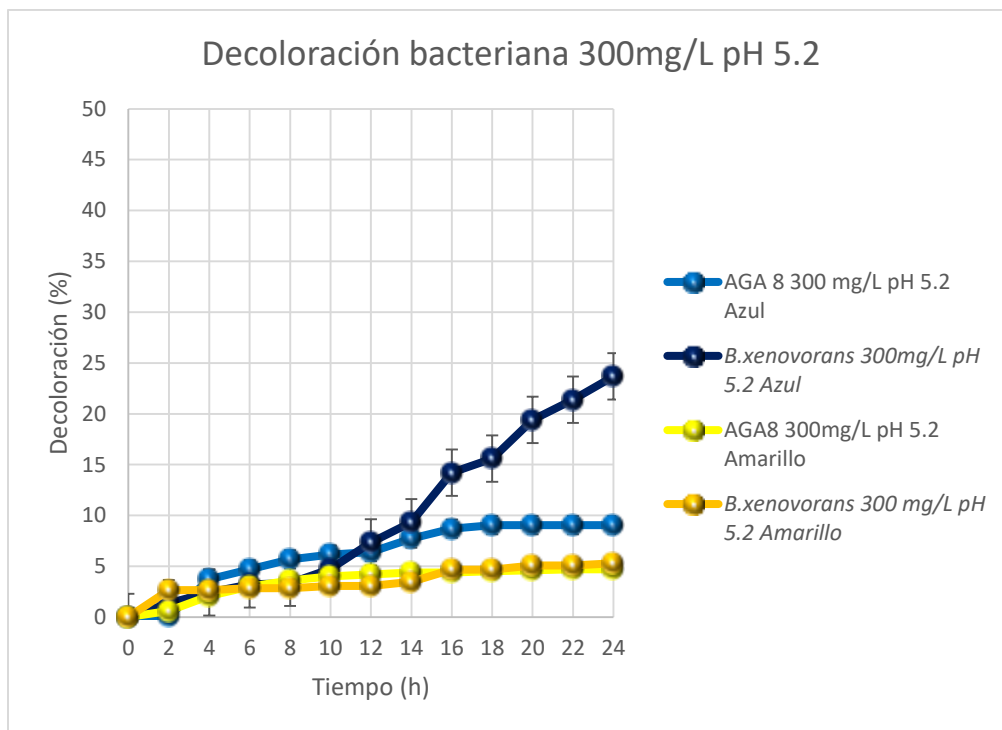


Figura 10. Cinética de decoloración de medio mínimo a un pH de 5.2 y una concentración de colorantes de 300 mg/L de Procion Blue y Procion Yellow en proporción 50/50 por *B. xenovorans* y AGA8.

En el caso de la cinética de decoloración a pH 8.6 a la concentración de 300 mg/L, podemos observar que *B. xenovorans* en el caso de la decoloración del colorante Procion Blue tuvo una decoloración del 23.65% por lo cual se observaron diferencias estadísticamente significativas entre este tratamiento con respecto a la capacidad de decoloración de AGA8 con el mismo colorante la cual fue del 4.54%, Procion Yellow observándose capacidades de decoloración del 3.23% y 3.58% para AGA8 y *B. xenovorans* respectivamente (figura 11)

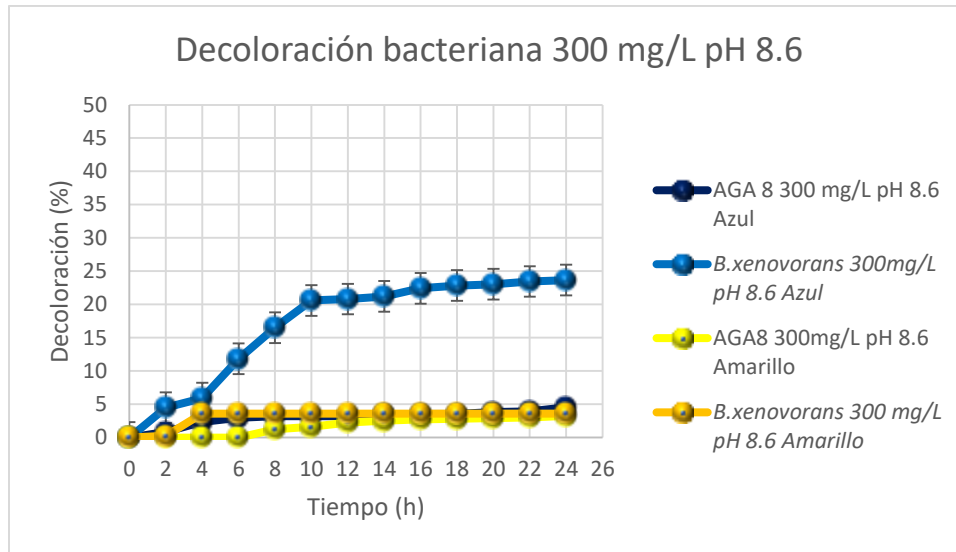


Figura 11. Cinética de decoloración de medio mínimo a un pH de 8.6 y una concentración de colorantes de 300 mg/L de Procion Blue y Procion Yellow en proporción 50/50 por *B. xenovorans* y AGA8.

Para el caso de la cinética de decoloración a un pH de 5.2 y una concentración de mezcla de colorantes de 500 mg/L se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la capacidad de decoloración del colorante Procion Blue, teniendo capacidades de decoloración de 15.72% y 25.44% para AGA8 y *B. xenovorans*. es notablemente mayor la capacidad de decoloración del Procion Blue en el tratamiento con *B. xenovorans*. En el caso de estos dos tratamientos hubo diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la decoloración del colorante Procion Blue respecto al colorante Procion Yellow, siendo mayor la capacidad de decoloración del Procion Blue. En el caso de la capacidad de decoloración del Procion Yellow no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la capacidad de decoloración de dicho colorante con los tratamientos de AGA8 y *B. xenovorans*, los cuales tuvieron una capacidad de decoloración del 1.52% y de 6.65% respectivamente (figura 12).



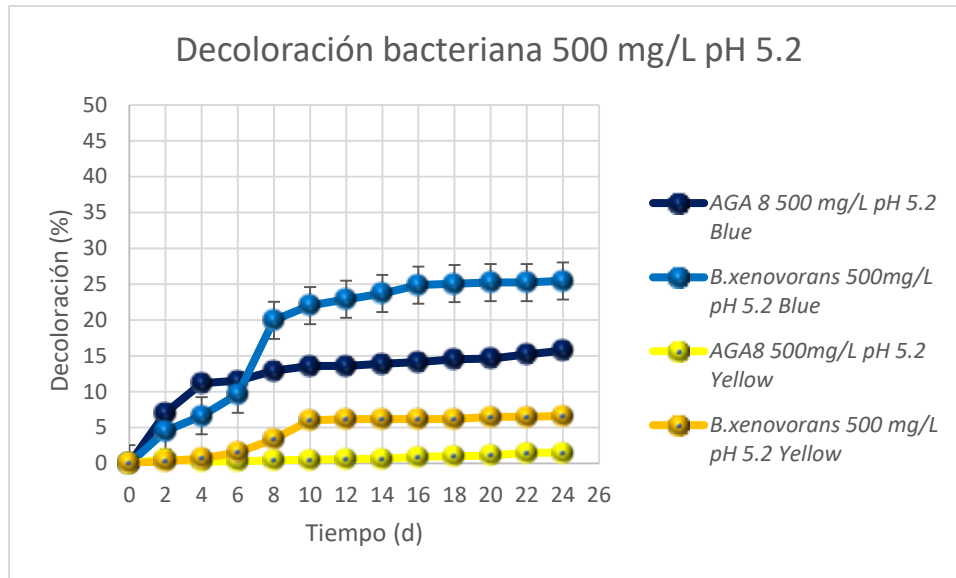


Figura 12. Cinética de decoloración de medio mínimo a un pH de 5.2 y una concentración de colorantes de 500 mg/L de Proción Blue y Proción Yellow en proporción 50/50 por *B. xenovorans* y AGA8.

En el caso de la cinética de decoloración que se muestra en la figura 13, ésta corresponde a la cinética de decoloración de la mezcla de colorantes a una concentración de 500 mg/L y pH 8.6. Ahí se parecían diferencias estadísticamente significativas que muestran que el colorante azul es mayormente decolorado por las bacterias estudiadas, en el caso específico de la decoloración del colorante Proción Blue podemos se observan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos *B. xenovorans* y AGA8 fueron del 25.44% y del 3.16% respectivamente, obteniéndose una mayor decoloración en el caso del Tratamiento con *B. xenovorans*. En el caso de la decoloración del colorante Proción Yellow no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de *B. xenovorans* y AGA8 teniendo estas capacidades de decoloración del 6.65% y de 5.25% respectivamente.

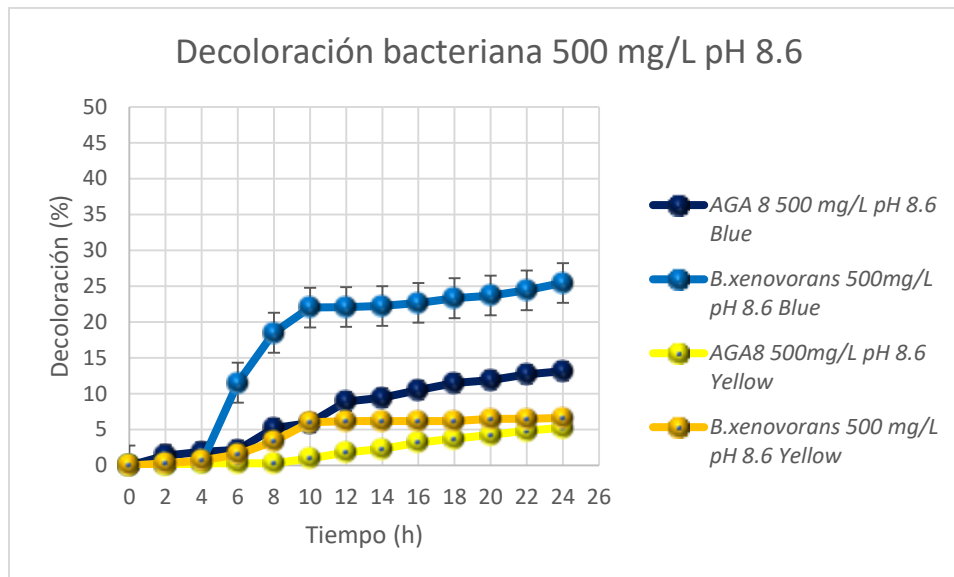


Figura 13 Cinética de decoloración de medio mínimo a un pH de 8.6 y una concentración de colorantes de 500mg/L de Procion Blue y Procion Yellow en proporción 50/50 por *B.xenovorans* y AGA8.

A manera de discusión. Muchas bacterias tienen enzimas de tipo lacasas que son capaces de llevar a cabo la decoloración y degradación de algunos compuestos xenobióticos que en su estructura química posean grupos aromáticos, sin embargo otro de los procesos por los cuales se lleva a cabo la decoloración del medio por parte de las bacterias son procesos de bioabsorción donde la bacteria introduce el colorante al citoplasma, donde es almacenado lo cual genera que el medio tenga una menor cantidad de colorante, otro proceso conocido es la bioadsorción que es un proceso por el cual el colorante se une a la pared celular bacteriana, donde los colorantes pueden llevar a cabo la fisioadsorción (cuando el colorante se adhiere por fuerzas de atracción electrostáticas) o quimiadsorción donde los colorantes se unen químicamente por medio de un enlace covalente al peptidoglicano (Solís *et al.*, 2013).

Un comportamiento muy común en las cinéticas de decoloración fue que el colorante Procion Blue, fue más fácilmente decolorado que el colorante amarillo, esto puede deberse a que el colorante Procion Blue es más afín a alguna enzima o estructura celular de las dos bacterias utilizadas, sin embargo, el mecanismo por el

cual las bacterias decoloran en mayor manera el Procion Blue con respecto al Procion Yellow, sale de los objetivos del presente trabajo.

Por otra parte a pesar de que en el presente trabajo no se obtuvieron los porcentajes de decoloración deseados, y que no se comprobó que *B.xenovorans* y AGA8, de manera individual no fueron capaces de llevar a cabo una decoloración mayor al 25% y 15%, no significa que las bacterias no tengan esta capacidad de decolorar los colorantes textiles, ya que en trabajos como el de Álvarez et al., (2013) probó a *Anoxybacillus flavithermus* frente a la mezcla de los colorantes Negro Reactivo 5 y negro Ácido 48, donde se alcanzó un porcentaje de decoloración del medio del 68% en tan solo 12 horas de incubación en condiciones aerobias.

También el trabajo realizado por Unnikrishnan. et al., (2019). Comprueban que la bacteria *Acinetobacter baumannii*, decolora el 96.20% del colorante Rojo Reactivo 198, después de 72 horas a una temperatura de incubación de 37°C y una concentración de 500 mg/L. por lo cual para estudios posteriores sería conveniente probar con alguno de estos géneros que dieron buenos resultados en cuando a decoloración bacteriana de colorantes Azo Reactivos.

### **Decoloración fúngica**

En el caso de la decoloración fúngica, como se puede observar en la figura 14, el colorante más fácilmente fue decolorado fue el colorante Procion Blue en comparación con el colorante Procion Yellow. En los tratamientos donde hubo mayor decoloración del colorante Procion Blue fue en el pH 5.2 a las concentraciones de 300 mg/L y 500 mg/L. entre dichos tratamientos en la decoloración del Procion Blue no se observaron diferencias entre estos tratamientos en cuanto a decoloración, pero si se observaron diferencias estadísticamente significativas entre estos dos tratamientos y los tratamientos a las mismas concentraciones, pero a un pH 8.6. en los tratamientos pH 5.2 se obtuvieron porcentajes de decoloración de 84.6% y de 89.5% para la concentración de 300mg/L y 500mg/L respectivamente, en cambio los tratamientos de 300 mg/L y 500 mg/L a pH 8.6 se observaron que fue menor la decoloración de dicho colorante en la mezcla, llegando a porcentajes máximos de 15.74% y de 22.36%

respectivamente, encontrándose que *T. versicolor* tiene mayor capacidad de decoloración en medio ácido a pH 5.2 que a un pH 8.6, esto se debe a que *T. versicolor* al ser un hongo este tiene predilección por medio ácidos.

Por otra parte, en el caso de la decoloración del colorante Procion Yellow, se observa que *T. versicolor* posee muy poca capacidad de decoloración de dicho colorante y obteniéndose una mayor decoloración en los tratamientos a pH 5.2 donde para 300mg/L fue de 21.6% y para 500 mg/L fue de 17.9% y entre estos tratamientos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas que nos indiquen que *T. versicolor* decolora de mayor manera en alguna de estas concentraciones.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento a pH 8.6 a una concentraciones 300 mg/L con respecto a los anteriores en este último fue donde hubo el porcentaje de decoloración más bajo siendo este de 9.49%, estos porcentajes bajos nos indican que *T.versicolor* es poco eficaz en la decoloración del colorante Procion Yellow, a comparación de la decoloración del Procion Blue que se obtuvo una decoloración de hasta el 89.5%, esto puede deberse a que la estructura química del colorante azul puede ser una ventaja para ello, ya que el colorante Procion Blue es un colorante diazo (Bansal et-al., 2011), a comparación del colorante Procion Yellow (Kim et-al., 2004), que es un colorante Monoazo, sin embargo es conveniente realizar una cinética enzimática en la cual podamos probar de manera separada y en mezcla los colorantes sin embargo ese sería un punto de partida para estudios más finos y específicos. Todas estas curvas de decoloración pueden observarse a detalle en la figura 14.

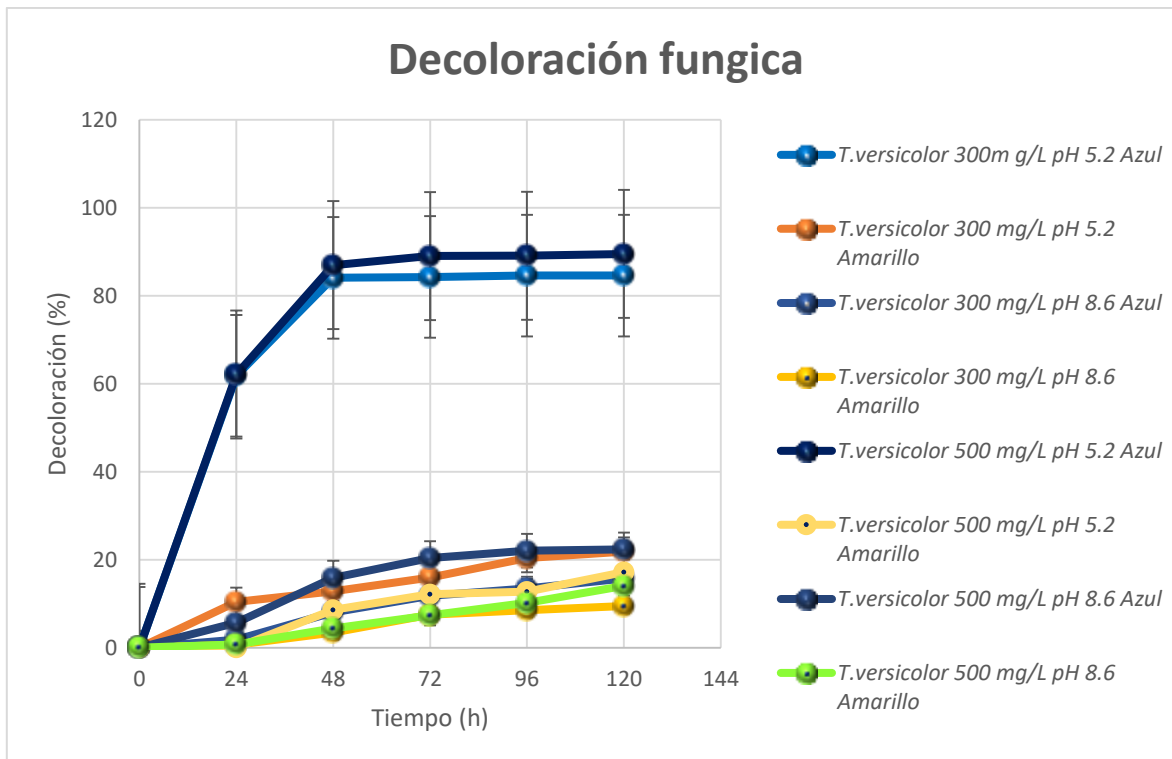


Figura 14. Cinética de decoloración de una mezcla de colorantes Procion Blue y Procion Yellow en proporción 50/50, a concentraciones de 300 mg/L y 500mg/L y a pH de 5.2 y 8.6, por *T.versicolor*

### Decoloración en consorcio

De acuerdo a Solís. et al., (2013), el efecto de un consorcio hongo-bacteria, hongo-hongo y bacteria-bacteria tienen un mayor rendimiento en la decoloración, dado que la diversidad enzimática aumenta en un consorcio y esto a su vez favorece la decoloración o incluso la completa mineralización de los colorantes. Sin embargo, no todos los consorcios son funcionales, ya que en los consorcios son relaciones biológicas y muchas de ellas pueden ser positivas como la simbiosis, negativas como la depredación, parasitismo y competencia o bien neutras donde ninguno de los organismos se vea afectado. En este trabajo se realizaron cultivos mixtos donde el consorcio hongo-bacteria se probó para determinar si existía una mayor capacidad de decoloración de la mezcla de colorantes, por lo cual se probaron los consorcios de *T. versicolor* +*B. xenovorans*, donde *B. xenovorans* es una bacteria Gram negativa. Amabas poseen la capacidad de llevar a cabo la decoloración del medio donde se le presentaron estos colorantes por separado además se logró que *B.*

*xenovorans* es capaz de crecer en concentraciones de hasta 4000 mg/L de estos colorantes. En relación al aislado AGA8, el mismo trabajo obtuvo la siguiente información:

1.- A la misma concentración de colorantes y tuvo una respuesta similar a la toxicidad de los colorantes.

2.- Es un bacilo Gram positivo formador de endosporas,

3.- De acuerdo a Guadarrama-Cárdenas presentó capacidad de decoloración del colorante Procion Blue a los 42 días en placa.

Dado a la capacidad que poseían estas dos bacterias fueron seleccionadas para participar en el consorcios con *T. versicolor*, dado que *T.versicolor* es un hongo de la pudrición blanca el cual posee capacidad decolorativa tal como se mostró en la figura 14. Para efectos de este estudio se observaron la capacidad de decoloración a concentraciones de 300mg/L y 500mg/L de mezcla de colorantes a los pH de 5.2 y 8.3.

Se utilizó como referencia *Trametes versicolor*, para comparar si los consorcios superaban la capacidad de decoloración de *T. versicolor*, ya que en la cinética individual se observó que *T. versicolor* tuvo mayor decoloración con respecto al comportamiento individual de las bacterias.

La cinética de decoloración en consorcio a un pH de 5.2 en una concentración de 300 mg/L de mezcla de colorantes, mostró que existieron diferencias estadísticamente significativas entre la decoloración del colorante Procion Blue y Procion Yellow, donde se muestra que el colorante Procion Blue fue decolorado en mayor medida que respecto al porcentaje de decoloración del Procion Yellow. En el caso particular de la decoloración del Procion Blue, entre los tratamientos de *T. versicolor* + *B. xenovorans* y *T. versicolor* + AGA8, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la capacidad de decoloración del colorante Proción Blue obteniéndose porcentajes de decoloración de, 94.4% y 83.66%. sin embargo, a pesar de no observarse diferencias estadísticamente significativas, el consorcio de *T. versicolor*+ *B. xenovorans* muestran un mayor porcentaje de

decoloración del colorante azul, lo cual puede ser un indicio de que de que este consorcio pudiera estudiarse en el futuro frente a otras condiciones y otros colorantes textiles.

En el caso de la decoloración del colorante Procion Yellow se observó que el porcentaje de decoloración para los tratamientos de *T. versicolor* + *B. xenovorans* y *T. versicolor*+ AGA8 fueron de 26% y 4.45%, respectivamente. Es decir, se encuentra un mayor porcentaje de decoloración en los tratamientos con y *T. versicolor* + *B. xenovorans*, con respecto al *T. versicolor*+ AGA8.

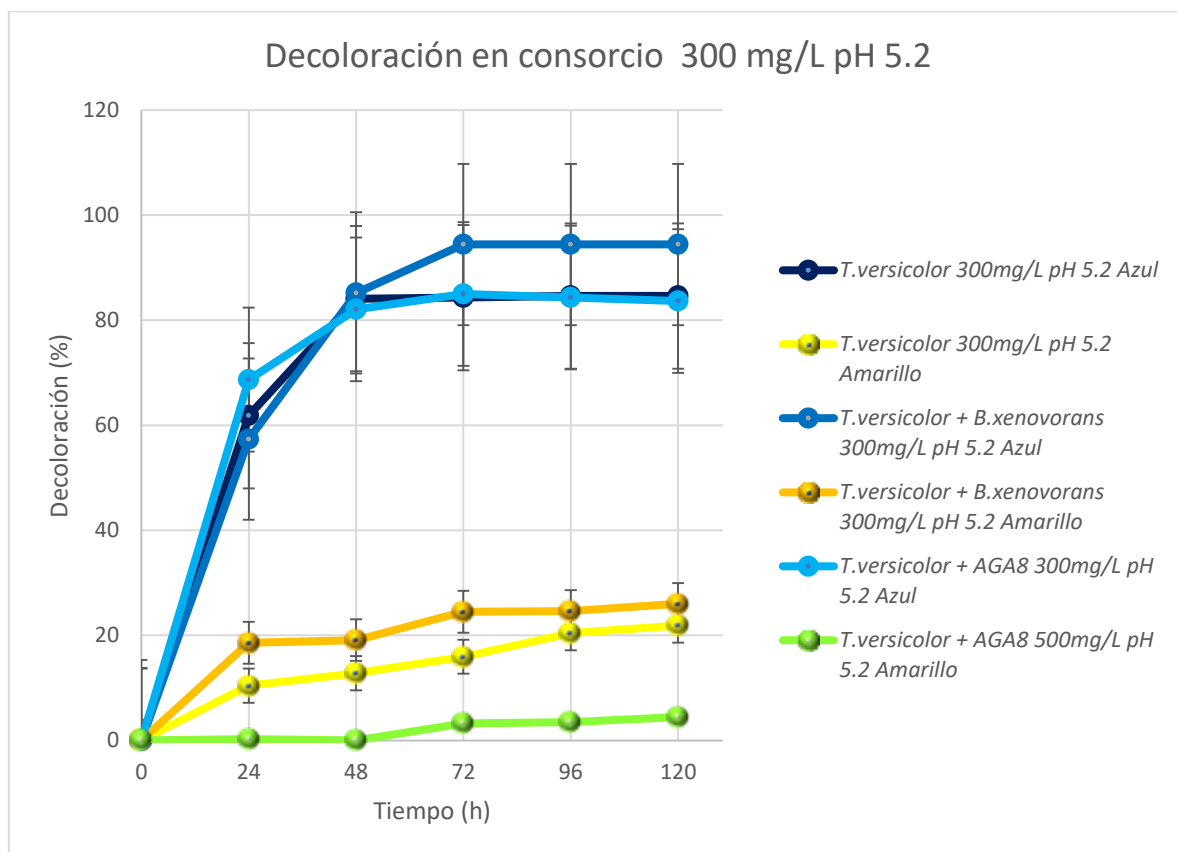


Figura 15. Cinética de decoloración de una mezcla de colorantes Procion Blue y Procion Yellow en proporción 50/50, a una concentración de 300 mg/L y un pH de 5.2, por los consorcios *T.versicolor*+ *B.xenovorans*, *T.versicolor* + AGA8, y haciendo una comparación con la capacidad decolorativa de *T.versicolor* en cultivo puro.

En el caso del experimento a una concentración de 300 mg/L, pero a un pH de 8.6, la decoloración del Procion Blue disminuyó con respecto al tratamiento anterior. En el caso de la decoloración del Procion Blue el porcentaje de decoloración fue de 15.77%, 24.76% y 16.80% para los tratamientos de *T. versicolor*, *T. versicolor* + *B. xenovorans* y *T. versicolor* + AGA8, respectivamente, y se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento *T. versicolor* + *B. xenovorans* con respecto a los tratamientos de *T. versicolor* y *T. versicolor* + AGA8, observándose mayor porcentaje de decoloración del Procion Blue en el tratamiento de *T. versicolor* + *B. xenovorans*.

En el caso de la curva de decoloración correspondiente al Procion Yellow, se observaron los porcentajes de decoloración 9.49%, 9.98% y 5.80% para los tratamientos de *T. versicolor*, *T. versicolor* + *B. xenovorans* y *T. versicolor* + AGA8 respectivamente, y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los ninguno de estos tratamientos para el Procion Yellow. Estas curvas pueden observarse de mejor manera en la figura 16.



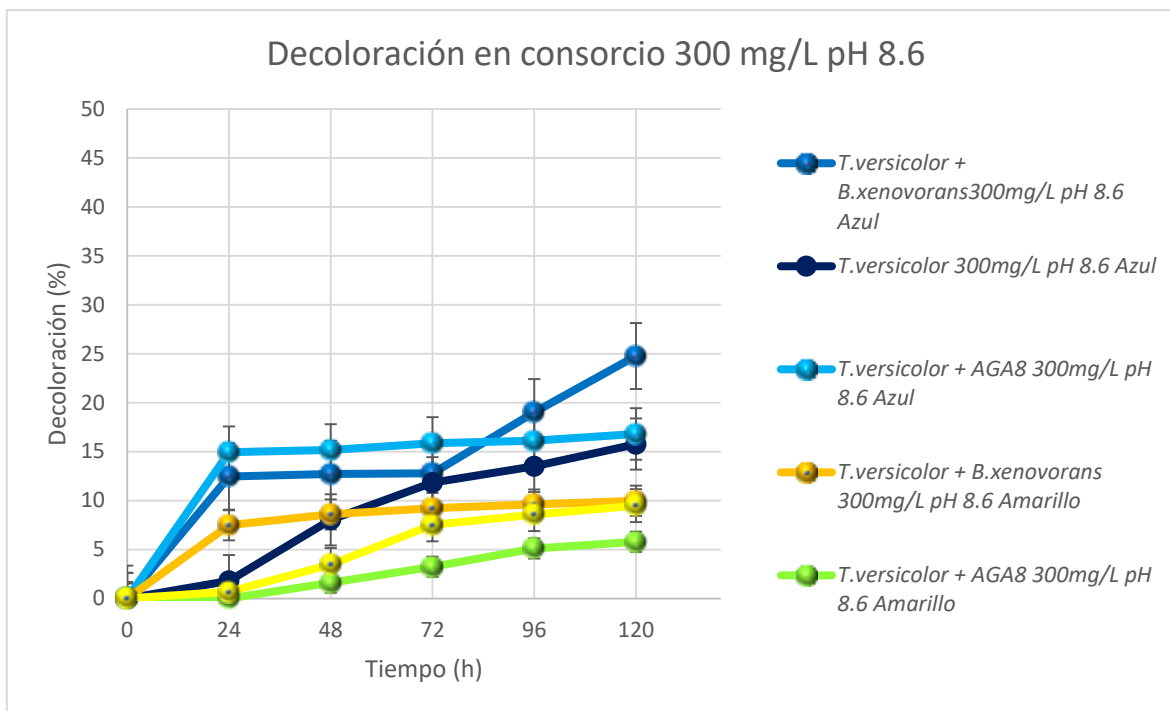


Figura 16. Cinética de decoloración de una mezcla de colorantes Procion Blue y Procion Yellow en proporción 50/50, a una concentración de 300 mg/L y un pH de 8.6, por los consorcios *T. versicolor*+ *B. xenovorans*, *T. versicolor*+ AGA8, y haciendo una comparación con la capacidad decolorativa de *T. versicolor* en cultivo puro.

En el caso del experimento a una concentración de 500 mg/L y a un pH de 5.2 (figura 17), se observa que para los tratamientos de *T. versicolor*, *T. versicolor* + *B. xenovorans* y *T. versicolor* + AGA8, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de decoloración del colorante Procion Blue y Procion Yellow, observándose mayores porcentajes e decoloración del colorante Procion Blue. En el caso de la decoloración del Procion Blue la decoloración de fue del 89.53%, 99.12% y 88.96% para los tratamientos de *T. versicolor*, *T. versicolor* + *B. xenovorans* y *T. versicolor* + AGA8, respectivamente, sin embargo no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre estos porcentajes de decoloración del medio, sin embargo cabe destacar el tratamiento de *T.versicolor* + *B.xenovorans* fue el que mayor porcentaje de decoloración presentó, a pesar de no presentar diferencias estadísticamente significativas, debe considerare este consorcio para investigaciones futuras ya que puede ser que presente una mejor capacidad de decoloración para otro tipo de colorante y frente a otras condiciones cinéticas.

Para el caso de los porcentajes de decoloración del Proción Yellow, para los tratamientos de *T. versicolor*, *T. versicolor* + *B. xenovorans* y *T. versicolor* + AGA8, los porcentajes de decoloración fueron de 17.19%, 9.28% y 5.38%, respectivamente, observándose diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento de *T. versicolor* con respecto a los tratamientos de *T. versicolor* + *B. xenovorans* y *T. versicolor* + AGA8, observándose un mayor porcentaje de decoloración en el tratamiento de *T. versicolor*.

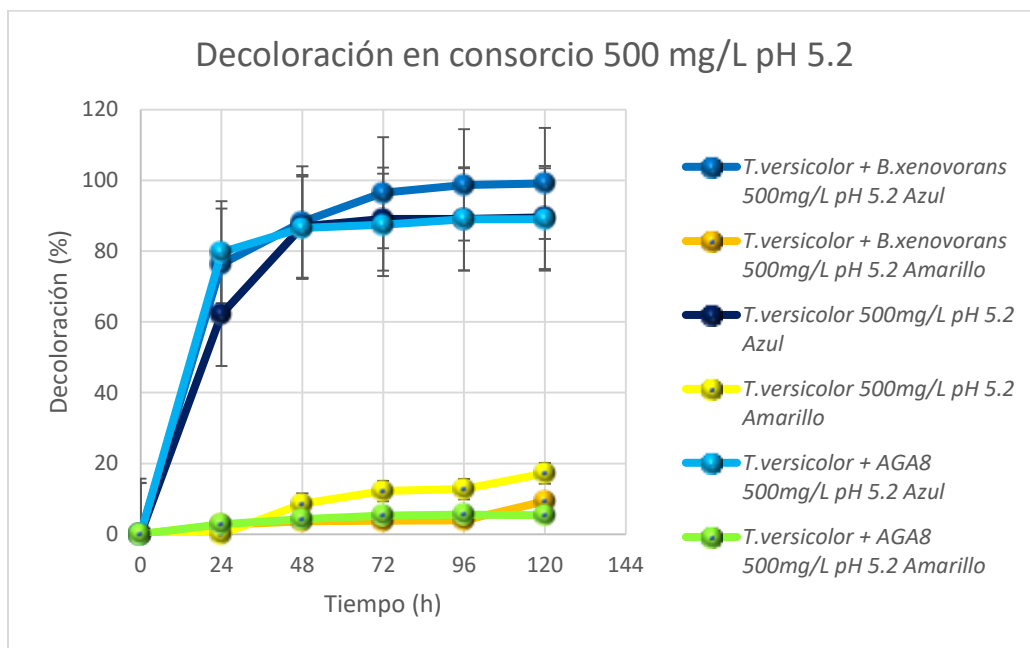


Figura 17. Cinética de decoloración de una mezcla de colorantes Procion Blue y Procion Yellow en proporción 50/50, a una concentración de 500 mg/L y un pH de 5.2, por los consorcios *T. versicolor*+ *B. xenovorans*, *T. versicolor* + AGA8, y haciendo una comparación con la capacidad decolorativa de *T.versicolor* en cultivo puro.

En el caso del experimento a 500 mg/L y a un pH de 8.6, el patrón de resultados fue diferente, ya que el máximo valor de decoloración fue para el tratamiento de *T. versicolor*, en el cual se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los demás tratamientos siendo su porcentaje de decoloración del 22.36% para el colorante Proción Blue, en el caso de los tratamientos de *T. versicolor* + *B. xenovorans* y *T. versicolor* + AGA8 los porcentaje de decoloración fueron de 3.46% y 8.07%, respectivamente, bajo estas condiciones los tratamientos de los

consorcios la capacidad de decoloración se vio disminuida, esto puede deberse a que tanto el hongo como las bacterias trabajan mejor a un pH ácido que a un pH alcalino y la mayor decoloración para el Procion Blue se obtuvo en el caso donde *T. versicolor* se inoculó en cultivo puro, por lo tanto para estas condiciones ambos consorcios no son funcionales.

En el caso de la decoloración del Procion Yellow los porcentajes de decoloración fueron de 14.08%, 1.73% y 3.93% para los tratamientos de *T. versicolor*, *T. versicolor* + *B. xenovorans* y *T. versicolor* + AGA8, observándose diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento de *T. versicolor* con respecto a los tratamientos de *T. versicolor* + *B. xenovorans* y *T. versicolor* + AGA8, en este experimento podemos observar el mismo comportamiento que en caso de Procion Blue, donde en el caso del cultivo puro de *T. versicolor* fue mayor la decoloración que en los tratamientos con el consorcio, de esta manera se observa que el consorcio de igual manera bajo estas condiciones no es funcional (figura 18).

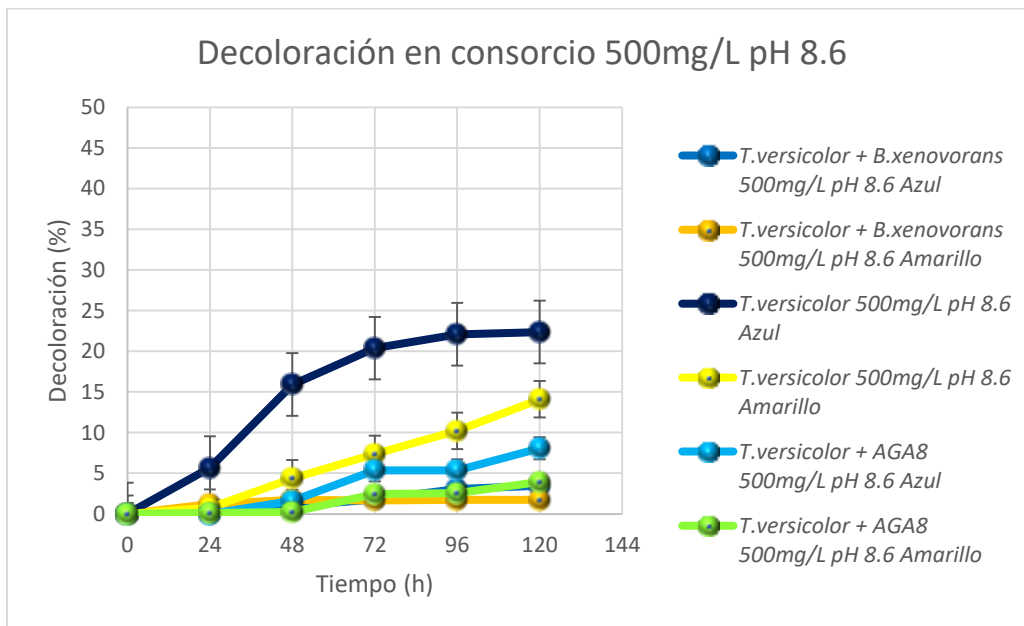


Figura 18. Cinética de decoloración de una mezcla de colorantes Procion Blue y Procion Yellow en proporción 50/50, a una concentración de 500 mg/L y un pH de 8.6, por los consorcios *T. versicolor*+ *B. xenovorans*, *T. versicolor*+ AGA8, y haciendo una comparación con la capacidad decolorativa de *T. versicolor* en cultivo puro.

Como parte final de este trabajo se puede observar que la hipótesis de este trabajo no se cumplió, ya que los consorcios hongo bacteria, *T. versicolor* + *B. xenovorans* y *T. versicolor* + AGA8 no fueron capaces de llevar a cabo la decoloración de manera más eficiente que los organismos por separado. Al comparar estos consorcios con los tratamientos individuales el hallazgo es que no existen diferencias estadísticamente significativas que nos indiquen que los consorcios decoloran de una manera más eficiente la mezcla de colorantes que *T. versicolor* cultivado de manera pura. Por lo tanto, podemos afirmar que la decoloración de los colorantes Procion Blue y Procion Yellow son llevadas a cabo por *T. versicolor* y no por *B. xenovorans* ni por AGA8.

Al observar las cinéticas de decoloración bacteriana se percibe que las bacterias no están llevando a cabo la decoloración del Procion Blue de hasta el 25.44% para *B. xenovorans* a 500 mg/L y un pH de 5.2, tal como se nos muestra en la figura 10, se puede afirmar que la bacteria muy posiblemente no esté utilizando un mecanismo enzimático para la decoloración, ya que su crecimiento se observa disminuido con respecto al control. Dicho fenómeno ocurre también para el aislado AGA8. En el caso de no existir actividad enzimática, Entonces éstos no serían utilizados como fuente de carbono y energía. Ahora bien, cabe la posibilidad de que la poca decoloración que se obtuvo podría estar originada a fenómenos de superficie como lo es la bioadsorción, en la cual las moléculas de colorante se adhieran físicoquímicamente a estructuras celulares como lo son la pared celular (Solís *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos podrían ser el punto de partida para determinar los mecanismos por los cuales el hongo y las bacterias de los consorcios aquí presentados decoloraron a Procion Blue y Procion Yellow.

En el caso de la presente investigación los consorcios resultaron no ser funcionales. Pero ello no indica que otros consorcios no sean exitosos, Kurade. M. B. *et al.*, (2012) observaron que un consorcio hongo-bacteria compuesto por *Brevibacillus laterosporus* y *Galactomyces geotrichum*, era capaz de llevar a cabo la decoloración en 48 horas del 89%, 60%, y 69%, de los colorantes Rojo Remazol, Café 3 REL, Escarlata RR, dichos colorantes que se encontraban presentes en agua de un

efluente, por lo tanto si copáramos nuestros resultados con los de Kurade, observamos que para nuestros experimentos no aplica que el consorcio mejore la capacidad de decoloración, sin embargo en ambas investigaciones podemos observar que ni los microorganismos ni los colorantes son los mismos, pudiera deberse principalmente a esas condiciones que nuestros consorcios no son funcionales. Otro estudio de Kurade y colaboradores en 2016, usaron el mismo consorcio de *Brevibacillus laterosporus* y *Galactomyces geotrichum*, pero ahora frente a los colorantes azo RTE-1, RTE-2 y SEE, en dicho consorcio se observaron también capacidades de decoloración del 80%. 69% u 60% respectivamente, cabe mencionar que en ambos trabajos de Kurade se observan resultados muy prometedores por parte del consorcio *Brevibacillus laterosporus* y *Galactomyces geotrichum*, por lo cual sería una opción para investigaciones posteriores probar este consorcio con los colorantes Procion Blue y Procion Yellow.

Por otra parte, el trabajo de Krishnan (2017), mostró que los consorcios bacterianos aislados de lodos activados de plantas de tratamiento de agua residual, si ejercían actividad decolorativa frente a los colorantes azo RBRX-3B, DB-6 y DB19, con porcentajes de decoloración de 31.2%, 71.5% y 87.6 respectivamente.

Comparando lo encontrado por Krishnan (2017), en el caso de los consorcios del presente trabajo, se lograron capacidades de decoloración de hasta el 99.44%, pero no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con consorcio y en el tratamiento con *T. versicolor* de manera individual.

## 11. CONCLUSIONES

- La hipótesis que establece que los consorcios formados por *Trametes versicolor*+ *Burkholderia xenovorans* y *Trametes versicolor* + AGA8 tendrían mayor capacidad de decoloración in vitro que los mismos microorganismos, presentados de manera individual, en un medio de cultivo mínimo que consta de una mezcla en una proporción 50/50 de los colorantes Procion® Azul H-ERD y Procion® Amarillo H-E4R, es nula, ya que no hubo evidencia que compruebe que los consorcios mejoren la decoloración del medio con respecto a los microorganismos individuales.

- Se acepta la hipótesis alterna, que establece que para las condiciones experimentales de este trabajo los consorcios no mejoran la decoloración de los colorantes, Procion® Azul H-ERD y Procion® Amarillo H-E4R con respecto los microorganismos presentados de manera individual.

## **12. PERSPECTIVAS FUTURAS**

- Este trabajo puede aportar las bases para el diseño de un proceso de tratamiento del efluente textil de T-ANNA, dado que cumple con los tiempos de retención hidráulica de un reactor de lodos activados que corresponde a 5 días.
- El proceso puede mejorarse utilizando algún método de degradación química o fotodegradación, como estrategia para oxidar y mineralizar el colorante Procion Yellow que es el más persistente en el medio, esto con la finalidad de hacer más eficiente el proceso.
- Escalar a un reactor tipo Bach que trate el volumen generado de agua residual de T-ANNA.

## **ANEXO I**

### **PREPARACIÓN Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE MEDIOS DE CULTIVO MEDIOS DE CULTIVO**

#### **Medio agar dextrosa papa (PDA)**

Se pesan 39 g del medio por cada litro, en agua destilada. El medio se esteriliza en una autoclave a 121°C y 1 atm durante 15 minutos, para posteriormente vaciarlo en cajas de Petri estériles colocando 25 ml de medio de cultivo en cada una, a la flama del mechero y cerrando posteriormente para dejar solidificar. A las 24 horas se revisa su esterilidad.

#### **Medio de cultivo líquido mínimo (Xiao-ling Hea *et- al.*, 20018)**

Es un medio de cultivo en el cual tiene los requerimientos mínimos necesarios para el crecimiento de los hongos y bacterias, este medio contiene 1% de glucosa y concentraciones de 300 mg/L y 500 mg/L como fuentes de carbono, y 0. 4% de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como fuente de nitrógeno, y sales minerales como lo son el KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> al

0.2%. El medio se vacía en frascos de 50 ml y posteriormente se esteriliza en la autoclave a 121°C a 1 atm durante 15 minutos.

## ANEXO II

### FOTOGRAFÍAS DE CINÉTICAS DE DECOLORACIÓN

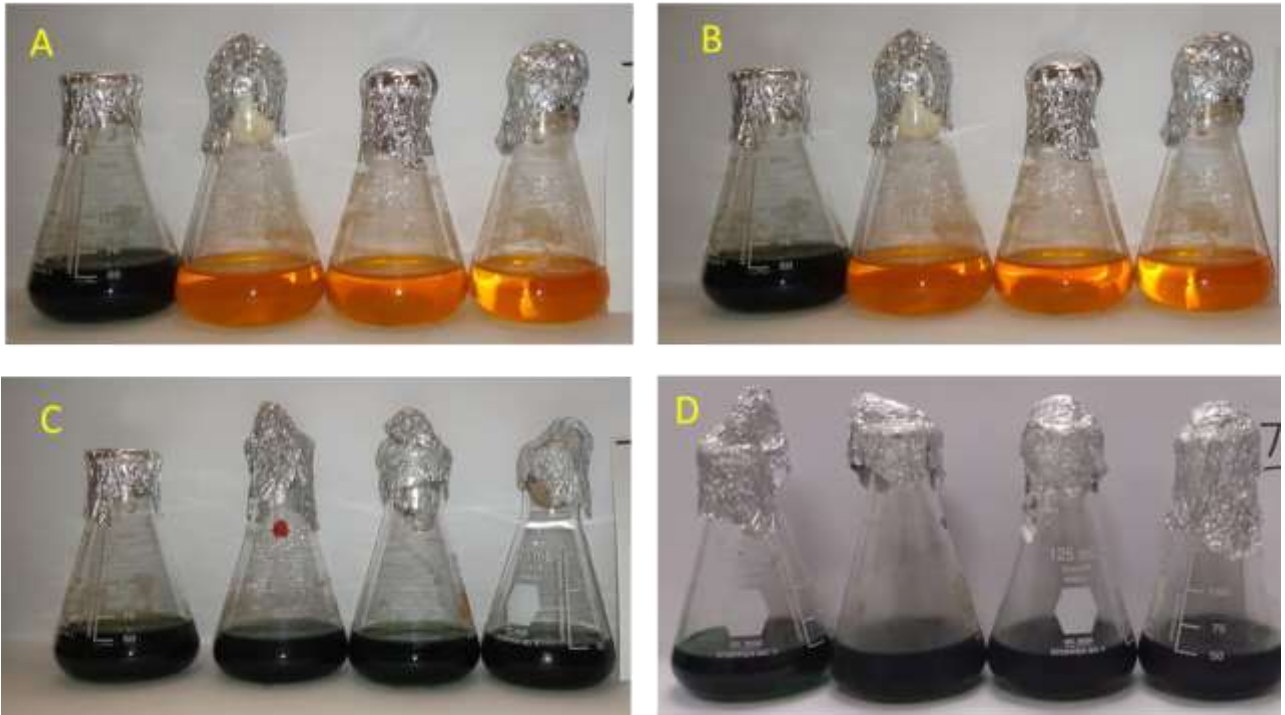


Foto 1. Cinética de Decoloración y crecimiento *T.versicolor*. A) 300 mg/L pH 5.2, B) 500 mg/L pH 5.2. C) 300 mg/L pH 8.6, D) 500 mg/L pH 8.6.

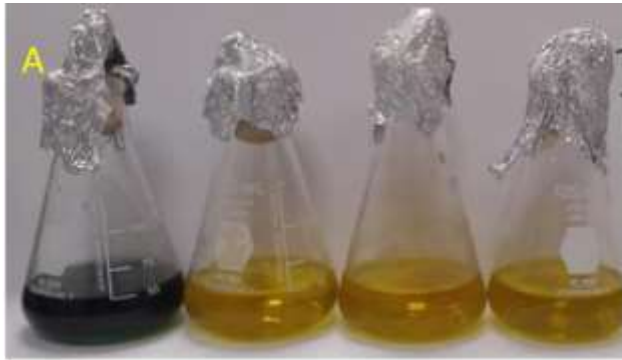


Foto 2. Cinética de decoloración *T. versicolor* + *B. xenovorans*. A) 300 mg/L pH 5.2, B) 500 mg/L pH 5.2, C). 300 mg/L pH 8.6, D) 500 mg/L pH 8.6



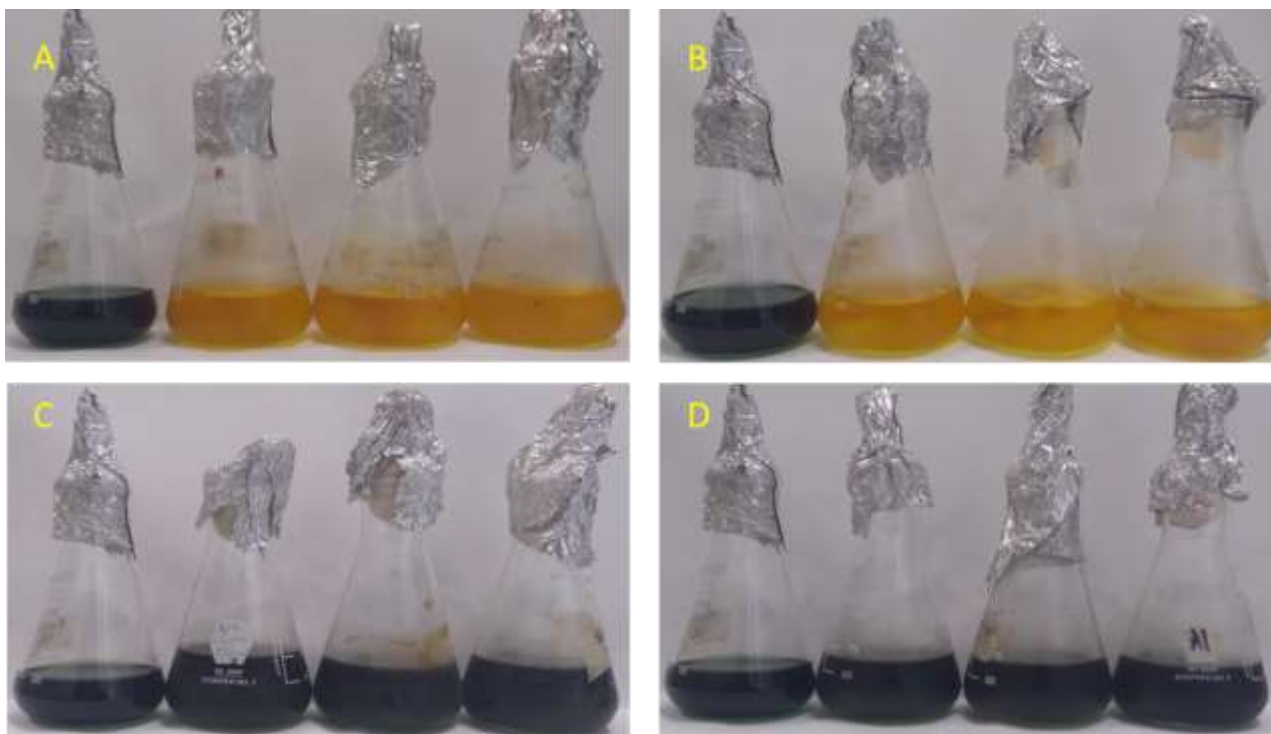


Foto 3. Cinética de decoloración *T. versicolor* + AGA8, A) 300 mg/L pH 5.2, B) 500 mg/L pH 5.2, C). 300 mg/L pH 8.6, D) 500 mg/L pH 8.6

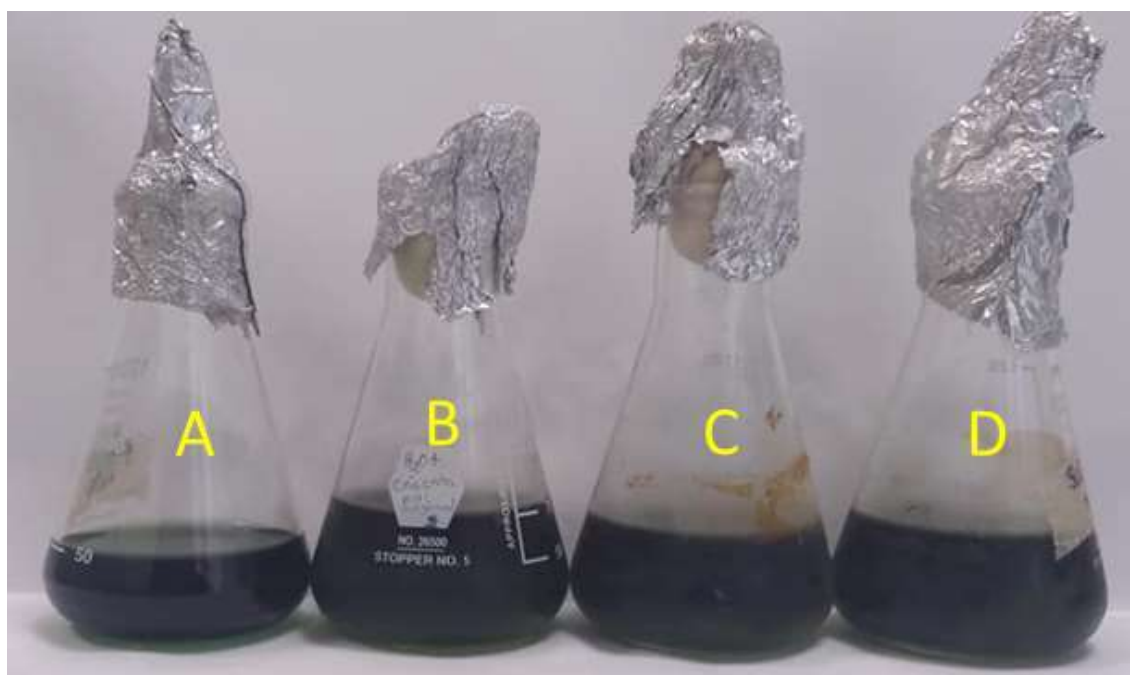


Foto 4. Cinética de decoloración *B. xenovorans*. A) 300 mg/L pH5.2, B) 300 mg/L pH 8.6, C) 500 mg/L pH 5.2 D) 500 mg/L pH 8.6.



Foto 5. Cinética de decoloración de AGA8. A) 300 mg/L pH5.2, B) 300 mg/L pH 8.6, C) 500 mg/L pH 5.2 D) 500 mg/L pH 8.6.

### 13. LITERATURA CITADA

Ali. H. 2010. Biodegradation of Synthetic Dyes—A Review. *Water Air Soil Pollut* 213:251–273.

Álvarez. M. S., Moscoso. F., Rodríguez. A., Sanromán. M. A. and Deive. F. J. 2013. Novel physico-biological treatment for the remediation of textile dyes containing industrial effluents. *Bioresource Technology*. 146. pp689–695..

Anjaneyulu. Y., Chary. N. S., and Raj. D. S. S. 2005. Decolourization of industrial effluents – available methods and emerging technologies – a review. *Environmental Science and Bio/Technology* 4:245–273.

Bauman. H. P. and Fletcher. J. M. (1966). *Textile Dyeing*. Pensilvania, United States of America: international correspondence schools.

Chung-Chuan. H., Bor-Yann. C. and Chia-Yi. Y. 2009. Understanding effects of chemical structure on azo dye decolorization characteristics by *Aeromonas hydrophyla*. *Journal of Hazardous Materials*. 167: 995-1001.

Choi. Y. S., Seo. J. Y. Lee. H., Yoo. J., Jung. J., Kim. J. J. and Kim. G. H. 2014. Decolorization and Detoxification of Wastewater Containing Industrial Dyes by *Bjerkandera adusta* KUC9065. *Water Air Soil Pollut* 225 (1801): 1-10.

Coelho-Moreira. J.S., Bracht. A., de Sousa. A. C. S., Ferreira. O. R., de Sa-Nakanishi. A. B., Marquez. S. C. G. and Peralta. R. M. 2013. Degradation of diuron by *Phanerochaete chrysosporium*: role of lignolytic enzymes and cytochrome P450. *Biomed Research international*. 2013: 1- 9.

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.

Flores. T. G. E. 2004. Evaluación de la contaminación generada por el vertido de aguas residuales de la industria textil en Zinapécuaro Michoacán. Escuela superior de ingeniería Textil, programa de ciencias en ingeniería textil. Instituto Politecnico Nacional. México. pp 93.

Guadarrama- Cárdenas. J. 2018. Evaluación de la toxicidad que representan los colorantes textiles azo Procion Blue H-ERD y Procion Yellow H-E4R, a dos aislados bacterianos provenientes de agua residual textil. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. pp 52.

Heinfling. A., Bergbauer. M. and Szewzyk. U. 1997. Biodegradation of azo and phthalocyanine dyes by *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta*. *Appl Microbial Biotechnol*. 48: 261-266.

Heinfling. A., Martínez. M. J., Martínez. A. T., Bergbauer. M. and Szewzyk. U. 1998. Purification and characterization of peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta*. *FEMS Microbiology Letters*. 165: 43-50.

Krishnan. J., Kishore. A. A., Suresh. A. Madhumeetha. B. and Prakash. D. G. 2016. Effect of pH, inoculum dose and initial dye concentration on the removal of azo dyes mixture under aerobic conditions. *International Biodeterioration and Biodegradation* 119 (2017): 16-27.

Kulkarnia. A. N., Watharkarb. A. D., Ranec. N. R., Jeond. B. H. and Govindwarb. S. P. 2017. Decolorization and detoxification of dye mixture and textile effluent by lichen *Dermatocarpon vellereceum* in fixed bed upflow bioreactor with subsequent oxidative stress study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 148 (2018) 17–25.

Kumara. M. A., Vigneshwarana. G., Priyad. M. E., Seenuvasana. M., Kumarb. V. V., Anuradhac. D. and Sivanesand. S. 2017. Concocted bacterial consortium for the detoxification and mineralization of azoic-cum-sulfonic textile mill effluent. *Journal of Water Process Engineering*. 16. (2017): 199–205

Kuradea. M. B., Waghmodeb. T. R., Kagalkarb. A. N. and Govindwarb. S. P. 2012. Decolorization of textile industry effluent containing disperse dye Scarlet RR by a newly developed bacterial-yeast consortium BL-GG. *Chemical Engineering Journal*. 184. (2011): 33– 41.

Kuradea. M. B., Waghmodeb. T. R., Patil. S. M. Jeon. B. H. and Govindwar. S. P. 2016. Monitoring the gradual biodegradation of azo dyes in simulate textile effluent and development of a novel triple layered fixed bed reactor using a bacterium- yeast consortium. *Chemical engineering journal*. 307 (2017): 1026-1036.

Lade. H. S., Waghmode. T. R., Kadam. A. A. and Govindwar. S. P. 2012. Enhanced biodegradation and detoxification of disperse azo dye Rubine GFL and textile industry effluent by defined fungal-bacterial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 72. (2012): 94-107.

Li. H., Tan. L. Ning. S. and He. M, 2015. Reactor performance and microbial community dynamics during aerobic degradation and detoxification of Acid Red B with activated sludge bioaugmented by yeast *Candida tropicalis* TL-F1 in BRM. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 104 (2015): 149.156.

Loera-Muro. A., Ramírez-Castillo. F. Y., Avelar-González. F. J. y Guerrero Barrera. A. L. 2012. Biopelículas multi-especie: asociarse para sobrevivir. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes* 54: 49-56.

Mester.T. and Field. J. A. 1998. Characterization of a Novel Manganese Peroxidase-Lignin Peroxidase Hybrid Isozyme Produced by *Bjerkandera* Species Strain BOS55 in the Absence of Manganese. The journal of biological chemistry 273 (25): 15412–15417.

McMullan. G., Meehan. C., Conneely. A., Kirby. N., Robinson. T., Nigam. P., Banat I. M., Marchant. R. and Smyth. W. F. 2001. Microbial decolourisation and degradation of textile dyes. Appl Microbial Biotechnol. 56: 81-87.

Nigamn. P., Bonant. I. M., Singh.D., y Marchant. R. 1995. Microbial process for the decolorization of textile effluents containing azo, diazo and reactive dyes. Process biochemistry. 5 (31): 435-442.

Oneil. C., Hawkes. R. T., Hawkes. L.D., Laurence. D. N., Pinheiro. M. H. and Delée. W. 1999. Color in textile effluents- sources measurement, discharge consents and simulation: a review. Journal of chemical technology and biotechnology 74: 1009-1019.

Padmavathy. S., Sandhya. S., Swaminathan. K., Subrahmanyam. Y. V., Chakrabarti. T., and Kaul. S. N. 2003. Aerobic Decolorization of Reactive Azo Dyes in Presence of Various Cosubstrates. Chem. Biochem.Eng. Q. 17 (2): 147-151.

Pereira. C. E. and Durrant. L. R. 2001. Decolorization of azo dyes by *Phanerocheate chrysosporium* and *Pleurotus Sajorcaju*. Enzyme and Microbial Technology 29: 473-477.

Pereira. L. and Alves. M. 2012. Environmental Protection Strategies for Sustainable Development, Braga Portugal. Springer Science.

Piña. M. S. 2007. Decoloración biológica del colorante Azul Directo 2 en un filtro anaerobio/aerobio. Instituto de ingeniería de la UNAM, programa de maestría y doctorado en ingeniería. Universidad nacional autónoma de México. México. pp 98.

Plácido. J., Chanagá. X., Ortiz-Monsalve. S. Yepes. M. and Mora. A. 2016. Degradation and detoxification of synthetic dyes and textile industry effluents

by newly isolated *Leptosphaerulina* sp. from Colombia. I. Bioresour. Bioprocess Springer Open Journal 3 (6): 1-14.

Puvaneswari. N., Multhukrishnan. J. and Gunasekaran.p. 2006. Toxicity assessment and microbial degradation of azo dyes. Indian Journal of experimental Biology 44: 618-626.

Rodriguez-Couta. S. 2013. Treatment of Textile Wastewater by White-rot Fungi: Still a Far Away Reality?. Textiles and Light Industrial Science and Technology (TLIST) 3 (2): 1-7

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

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

Sousa. M. M., Melo. M. J., Parola. A. J., Morris. P. J. T., Rzepa. H. S. and Seixas de Melo. J. S. 2008. A Study in Mauve: Unveiling Perkin's Dye in Historic Samples. Chemistry a Europe journal 14: 8507– 8513.

Sudha. M., Saranya. A., Selvakumar. G. and Sivakumar. N. 2014. Microbial degradation of Azo Dyes: A review. International journal of current microbiology and applied sciences 3(2): 670-690.

Unnikrishnan. S., Khan. H. M. and Ramalingam. K. 2019. Dye- tolerant marine *Acinetobacter baumannii*- mediated biodegradation of reactive red. Water Science and Engineering 11 (4): 265-275.

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

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

Yanga. Q., Li. C., Li. H., Li. Y. and Yub. N. 2009. Degradation of synthetic reactive azo dyes and treatment of textile wastewater by a fungi consortium reactor. *Biochemical Engineering Journal* 43: 225–230.

Zille. A. 2005. *Laccase Reactions for Textile Applications*. Universidade do Minho, Escola de Engenharia. Italia. pp 151