



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la Vida

EVALUACIÓN DE HONGOS ENDÓFITOS CON POTENCIAL USO
EN LA DEGRADACIÓN DE TINTES INDUSTRIALES

INFORME DE PROYECTO INTEGRADOR

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGO

MARÍA VANESSA SÁNCHEZ CROW

JESÚS ANTONIO DELGADO RODRÍGUEZ

GUAYAQUIL – ECUADOR

2018

AGRADECIMIENTO

Queremos agradecer a nuestro tutor el Dr. Milton Barcos por darnos la oportunidad de trabajar en el proyecto y por orientarnos a ser profesionales categoría, a nuestro cotutor Mg. Javier Oviedo por su paciencia, su predisposición a enseñarnos y motivarnos a trabajar bajo presión. A la Dra. Daynet Sosa del Castillo directora del CIBE, por abrirnos las puertas y darnos la oportunidad de realizar nuestro proyecto de grado, al área de fitopatología por acogernos de una manera positiva y por enseñarnos las normas y las buenas prácticas de laboratorio. A nuestro director de materia integradora Diego Gallardo por sus enseñanzas, sus consejos, por apoyarnos y confiar en nosotros en la realización de nuestros proyectos.

DEDICATORIA

Quiero dedicar mi proyecto a mis padres Marcos Sánchez y Alicia Crow, por apoyarme en cada etapa de mi vida, por motivarme siempre a salir adelante y en especial por siempre confiar en mí, a mis hermanos por darme fuerzas y hacerme reír en mis momentos de estrés, a mis primas Karen y Pamela, por su apoyo incondicional, por darme fuerzas y aconsejarme tanto en lo personal como en lo académico, no sé qué hubiera hecho sin Uds., son un pilar fundamenta en mi vida, a mis compañeras de clases Lady, Gaby, Eve por hacer agradable y divertidas las horas de clases y por los buenos momentos que vivimos juntas y a mi compañero Jesús por estar siempre conmigo apoyándome a lo largo de toda mi vida universitaria y que siempre está conmigo en los buenos y malos momentos.

María Vanessa Sánchez Crow

Dedico este trabajo a la memoria de los niños que han sido víctimas de la guerra

Jesús Antonio Delgado Rodríguez

EVALUADOR DEL PROYECTO

.....
Milton Barcos Arias, Ph.D.

Tutor Proyecto Integrador

.....
Diego Gallardo Polit, Mg.

Profesor Materia Integradora

.....
Javier Oviedo Anchundia, Mg.

Cotutor Proyecto Integrador

DECLARACIÓN EXPRESA

"La responsabilidad y la autoría del contenido de este Trabajo de Titulación, me (nos) corresponde exclusivamente; y doy (damos) mi (nuestro) consentimiento para que la ESPOl realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual"

.....
Jesús Antonio Delgado Rodríguez

.....
María Vanessa Sánchez Crow

RESUMEN

La industria textil produce gran cantidad de aguas residuales, generando grasas, aceites, surfactantes, colorantes y tintes recalcitrantes, cuyos valores se encuentran alrededor de 80-200 m^3 por tonelada de producto. Aproximadamente del 15-20% de los tintes utilizados en esta industria no se unen a las fibras. En el Ecuador el 80% de las industrias textiles no utilizan un tratamiento de aguas residuales, por lo que este proyecto tiene la finalidad de demostrar que los tratamientos fúngicos pueden ser utilizados como potencial degradador de colorantes en la industria textil. Se evaluó los aislados de hongos C156 y HM proporcionado por el banco fúngico del Centro de Investigación Biotecnológica del Ecuador (CIBE), como potencial degradador del tinte novacron azul FN-R y novacron negro WN durante 9 días. Se evaluaron los aislados de hongos en medio sólido y medio líquido en distintos medios de cultivo: PDA, PDB y MM a 300 ppm. El aislado C156 mostró mayor efectividad para degradar en medio sólido utilizando medio de cultivo PDA para colorante novacron azul FN-R y novacron negro WN y con colorante azul para el medio mineral, el aislado C156 en medio de cultivo PDB y MM obtuvo una parcial decoloración para el colorante novacron azul FN-R en medio líquido.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTO	ii
DEDICATORIA	iii
EVALUADOR DEL PROYECTO	iv
RESUMEN	vi
ÍNDICE GENERAL	vii
ABREVIATURA	viii
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVO GENERAL	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
CAPITULO 1	5
1 MARCO TEORICO	5
1.1 INDUSTRIA TEXTIL EN EL ECUADOR	5
1.2 COLORANTES DE EFLUENTES INDUSTRIALES	5
1.2.1 Clasificación de los colorantes	7
1.2.2 Estructura de los colorantes	8
1.3 IMPACTO AMBIENTAL DE LOS TINTES.	9
1.4 LEGISLACIÓN AMBIENTAL	10
1.5 HONGOS ENDÓFITOS	10
1.5.1 Clasificación	10
1.5.2 Tratamiento fúngico	11
1.5.3 Procesos implicados en la decoloración	11
CAPITULO 2	12
2 MATERIALES Y MÉTODOS	12
2.1 MICROORGANISMOS	12
2.2 COLORANTES	12
2.3 EXPERIMENTACIÓN	12
2.4 PREPARACIÓN DEL MEDIO LÍQUIDO	13
2.4.1 Medio mineral	13

2.4.2	Medio PDB.....	13
2.4.3	Siembra.....	14
2.4.4	Determinación de biomasa	14
2.5	PREPARACIÓN DEL MEDIO SÓLIDO.....	14
2.5.1	Medio mineral con agar	14
2.5.2	Medio PDA.....	15
2.5.3	Siembra.....	15
2.5.4	Crecimiento y decoloración en medio sólido.....	15
CAPITULO 3	16
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
3.1	EVALUACIÓN DE CRECIMIENTO Y DECOLORACIÓN EN MEDIO SÓLIDO 16	
3.2	EVALUACIÓN DE PESOS EN MEDIO LÍQUIDO	19
3.3	EVALUACIÓN DE DECOLORACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO	21
	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	22
	BIBLIOGRAFÍA	23

ABREVIATURA

CIBE: Centro de Investigación Biotecnológica del Ecuador

DQO: Demanda química de oxígeno

SST: Sólidos suspendidos totales

DBO: Demanda bioquímica de oxígeno

PIB: Producto interno bruto

C.I.: Color Índice

AATC: Asociación Estadounidense de Químicos y Coloristas Textiles

SDC: Society of Dyers and Colourists

PDA: Agar papa dextrosa

PDB: Papa dextrosa Broth

AN: Agar nutritivo

MM: Medio mineral

PPM: Partes por millón

UV: Ultra violeta

ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1: Grado de fijación para varias combinaciones de fibra-colorante y perdida al efluente texto.....	6
Tabla 2: Porcentaje de tinte no fijado para diversos tipos de tinte y aplicaciones.....	7
Tabla 3: Composición del medio mineral.....	13
Tabla 4: Crecimiento y degradación del colorante azul FN-R en MM y PDA.....	30
Tabla 5: Crecimiento y degradación del colorante negro WN en MM y PDA.....	31

ÍNDICE DE ANEXOS

Figura 1: Crecimientos de los aislados C156 y HM en medios de cultivo PDA y MM a 300 ppm del colorante novacron azul FN-R	17
Figura 2: Degradación de los aislados C156 y HM en medios PDA y MM a 300 ppm del colorante novacron azul FN-R	18
Figura 3: Crecimientos de los aislados C156 y HM en medios de cultivo PDA y MM a 300 ppm del colorante novacron negro WN.	18
Figura 4: Degradación de los aislados C156 y HM en medios de cultivo PDA y MM a 300 ppm del colorante novacron negro WN.	19
Figura 5: Comparación de la biomasa húmeda en los aislados C156 y HM en medios de cultivo PDB y MM.	20
Figura 6: Comparación de biomasa seca en los aislados C156 y HM en medios de cultivo PDB y MM	20
Anexo 1: Preparación del medio mineral con colorante azul FN-R y negro WN.	27
Anexo 2: Filtración de aislamientos de hongos C156 y HM en medio líquido.	27
Anexo 3: Siembra de aislados de hongos C156 y HM en MM y PDA	27
Anexo 4: Medición de crecimiento y degradación del aislados de hongos C156 y HM.	28
Anexo 5: Aislado del hongo C156 en MM y PDB a 300 ppm, respectivamente.	28
Anexo 6: Aislado del hongo HM en MM y PDB a 300 ppm, respectivamente.	28
Anexo 7: Aislado de hongo C156 en MM y PDB a 300 ppm, respectivamente.	29
Anexo 8: Aislado de hongo HM en MM y PDB a 300 ppm, respectivamente.	29

INTRODUCCIÓN

La revolución industrial desde el siglo XVIII facilitó grandes pasos para la humanidad, iniciando con una producción artesanal y luego industrializada a gran escala; entre ellas se desarrolló la compañía textil, minero-metalúrgica, automotriz, química entre otras (Jimenez, 2009).

En la actualidad, una de las consecuencias de la industrialización es la contaminación, a pesar de que existen tratamientos para la reducción y eliminación de contaminantes residuales (Gutiérrez, 2006), esto ha ocasionado intranquilidad, debido a las actividades antropogénicas, que con el pasar del tiempo han ido perturbando el equilibrio ecológico y agotando los recursos naturales ocasionados por los desecho de la actividad industrial (Sandoval, 2008).

De igual manera, la industria textil produce una gran cantidad de aguas residuales contaminadas con, grasas, aceites, surfactantes, colorantes, tintes recalcitrantes, sodio y cloro; “estos valores se encuentran alrededor de 80-200 m^3 de efluentes líquidos residuales generados por tonelada de producto” (Cardona, 2009), debido a que en el proceso de teñido “alrededor del 15-20% de los tintes utilizados para colorear no se unen a las fibras y se pierden en el efluente” (Ngieng, 2013).

Las empresas textiles en el Ecuador tienen sus instalaciones en diferentes ciudades de nuestro país, siendo Pichincha, Guayas, Azuay, Tungurahua e Imbabura las provincias con mayor número de industrias textiles (AITE, 2017). En el Ecuador el 80% de la industria textil, no utilizan un tratamiento de aguas residuales (Macías, 2017).

Los pigmentos utilizados por la industria textil cuentan con una alta gama de tintes en diferentes colores y con alta estabilidad química, durante su procesamiento una parte de los tintes pasa a las aguas de enjuague para posteriormente ser volcadas a los efluentes anexos a las empresas textiles (Vera, 2012). La liberación de estos efluentes al medio ambiente es inadecuada debido a los graves problemas que causan los tintes y sus productos de degradación (Ozdemir, 2013).

Existen diversos procesos físicos, químicos y biológicos utilizados para la eliminación de colorantes, como la ozonización, procesos fotoquímicos, adsorción, membrana de filtración, intercambio iónico, procesos oxidativos, entre otras (Jimenez, 2009), pero cada método tiene sus limitaciones, como sus altos costos operacionales, contaminantes químicos que no son destruidos ni removidos de los efluentes y son relocalizados en otros sitios donde persisten (Robinson, 2000).

En la actualidad se están valorando métodos no convencionales, que permiten obtener una mayor decoloración y disminuir el impacto ambiental, sin embargo, los tratamientos biológicos se los ha considerado más efectivos para la eliminación de sustancias tóxicas producidas por la industria textil (Jimenez, 2009).

La degradación de los colorantes emitidos por las industrias textiles ha sido motivo de investigación, debido a los impactos ambientales a corto y largo plazo que estas generan al ecosistema.

Cardona (2009), utilizó diferentes cepas de hongos ligninolíticos para la degradación de distintos tintes, obteniendo un 86% de degradación del colorante rojo, azul y turquesa, (Suárez, 2015) obtuvo una degradación de 97,5% en tinte azul a través de un hongo basidiomiceto, (Agrawal, 2017) obtuvo degradación del 80 al 90% en tintes rojos, rosados y naranja. Estos estudios han emitido buenos resultados en los procesos de degradación de tintes a través de procesos biológicos.

Las aguas residuales volcadas por la industria textil en diferentes masas de agua presentan una variación en su coloración, debido a la acumulación de tintes, produciendo una baja penetración de luz solar ocasionada por la turbidez, por lo tanto, produce una disminución en la actividad fotosintética, oxígeno disuelto y la calidad del agua, ocasionando un efecto negativo en la flora y fauna acuática (Ngieng, 2013).

Para reducir este problema existen diferentes métodos, como los físicos, químicos y biológicos. Aunque aún existe la necesidad de desarrollar metodologías nuevas, más eficientes y económicas para degradar dichos componentes. Por eso se ha buscado diferentes tratamientos que reduzcan los efectos de contaminación ocasionados por la industria textil.

Con estos antecedentes se propuso en este proyecto evaluar hongos endófitos provenientes del cultivo de cacao en la degradación de tintes industriales.

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el uso potencial de los hongos endófitos del banco de microorganismos del CIBE para la degradación de tintes industriales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar los microorganismos capaces de degradar los colorantes novacron azul FN-R y negro WN.
- Evaluar los aislados de los hongos endófitos más eficientes en la degradación de tintes industriales.

CAPITULO 1

1 MARCO TEORICO

1.1 INDUSTRIA TEXTIL EN EL ECUADOR

Las primeras industrias en el Ecuador se dedicaron al procesamiento de la lana, luego a principios del siglo XX se introdujo el algodón, siendo la década de 1950 cuando se consolida la utilización de la fibra. En la actualidad la industria textil ecuatoriana fabrica productos derivados de todo tipo de fibra (algodón, poliéster, nylon, acrílicos, lana y seda). A lo largo del tiempo varias empresas dedicadas a la actividad textil se asentaron en diferentes ciudades de nuestro país.

Ecuador elabora una gran variedad de productos textiles, siendo el hilado y los tejidos sus principales productos de producción, sin embargo, cada vez es mayor la elaboración de confecciones textiles, como prendas de vestir y artículos para el hogar. Actualmente, “la Industria textil y la confección es la tercera más grande en el sector manufacturero, aportando más del 7% del PIB a nivel nacional” (AITE, 2017).

1.2 COLORANTES DE EFLUENTES INDUSTRIALES

Los colorantes son sustancias orgánicas fluorescente, que comparten coloración a una sustancia incolora o a un sustrato por absorción de luz, estos pigmentos son perseverantes en las aguas residuales, ocasionando problemas de contaminación, debido a fragmentos de residuos después del tratamiento, dichos tintes los podemos encontrar en descargas de empresas textiles y de curtido de ropa (Moeller, 2003).

Los tintes sintéticos tienen un amplio uso, por ejemplo, en la impresión de papeles, fotografía en color, industria farmacéutica, industria textil, alimentación,

cosméticos y otras industrias más. Los principales géneros de colorantes sintéticos envuelven los colorantes azo, antraquinona y triaril metano, mucho de estos son compuestos tóxicos y cancerígenos con largos tiempos de renovación (Padmavathy, 2003).

En la tabla 1 podemos apreciar que el proceso de teñido genera grandes cantidades de pigmentos, debido a la baja fijación que tienen los colorantes reactivos, dichos tintes generan mayor contaminación en las aguas residuales textiles, sin embargo, los colorantes básicos poseen un mayor grado de fijación, por otra parte, en la tabla 2 nos indica que la fibra de algodón tiene un mayor porcentaje de tinte sin fijar, esto nos indica que la mayor ración de efluentes coloreados son originados por la baja captación de color en el proceso de tinción.

Tabla 1: Grado de fijación para varias combinaciones de fibra-colorante y perdida al efluente texto.

Colorantes aplicados	fibra	Grado de fijación	% de residual en efluente textil
Acido	Poliamida	89-95	5-20
Básico	Acrílico	95-100	0-5
Directo	Celulosa	70-95	5-30
Disperso	Poliéster	90-100	0-10
Complejo metálico	Lana	90-98	2-10
Reactivo	Celulosa	50-90	10-50
De azufre	Celulosa	60-90	10-40
De tina	Celulosa	80-95	5-20

Fuente: (O'Neill, 1999)

Tabla 2: Porcentaje de tinte no fijado para diversos tipos de tinte y aplicaciones.

fibra	Tipo de tinte	Tinte sin fijar (%)
Lana y Nylon	Colorantes ácidos/colorantes reactivos para lana	7-20
	Tintes pre-metalizados	2-7
	Colorantes azoicos	5-10
Algodón y viscosa	Colorantes reactivos	20-50
	Tintes directos	5-20
	Pigmento	1
	Tintes de tina	5-20
	Tintes de azufre	30-40
Poliéster	Dispersar	8-20
Acrílico	Modificado básico	2-3

Fuente: (Standardcon, 2015).

1.2.1 Clasificación de los colorantes

La clasificación de los tintes textiles por su nombre genérico y su estructura química, fueron elaboradas por Color Index (C.I.), publicado por Society of Dyers and Colourists (SDC), (Reino Unido) y la Asociación Estadounidense de Químicos y Coloristas Textiles (AATC). Dichos colorantes se pueden agrupar por diferentes categorías para una mejor comprensión (Standardcon, 2015):

- Colorantes ácidos
- Tintes directos
- Colorantes azoicos
- Colorantes dispersos
- Tintes de azufre
- Colorantes reactivos
- Tintes básicos

- Tintes de oxidación
- Colorantes mordaces (tintes de cromo)
- Tintes de tina
- Abrillantador óptico/fluorescente
- Tintes solventes

Por conveniencia, todos los colorantes anteriores se pueden agrupar en tres categorías, a saber:

- Colorantes para fibras de celulosa
- Colorantes para fibras de proteínas
- Colorantes para fibras sintéticas

1.2.2 Estructura de los colorantes

El color de los tintes se debe a que absorben luz en el espectro visible (400-700 nm), poseen un sistema conjugado, es decir, que es una estructura con variación de enlaces dobles e individuales, mostrando resonancia de electrones, dicha fuerza estabiliza los compuestos orgánicos (Abrahart, 1977), el color surge como consecuencia de dos agrupaciones diferentes, los auxocromos y cromóforos, los cromóforos son encargado de dar la coloración y los auxocromos son ayudantes de color, y es utilizado cuando una de las características falta en su estructura molecular, y genera una pérdida de color.

La estructura del colorante Novacron negro WN está conformado por vinil sulfónico/Di cloro triazina y el colorante novacron azul FN-R de Fluor triazina/vinil sulfónico, dichos colorantes son utilizados por la empresa Pinto S.A. en Ecuador, los colorantes novacron contienen una alta reactividad y son utilizado por varias industrias textiles tanto a nivel nacional como internacional, debido a que son colorantes con buena resistencia de color (Teran, 2017).

1.3 IMPACTO AMBIENTAL DE LOS TINTES.

Las empresas textiles ocupan la cuarta posición a nivel global en relación con la cantidad de agua potable que se utiliza en las distintas etapas del proceso (Kunz, 2001). En la producción de la industria textil requieren una gran demanda de productos químicos, colorantes y agua, generando volúmenes significativos de residuos. Estos compuestos aparecen de las impurezas intrínsecas obtenidas de las fibras y productos químicos utilizados en el proceso que se separa del tejido al momento de teñir las prendas de vestir y se eliminan, dichos vertimientos difieren según el material; los componentes se dividen en tres grupos: algodón, lana y fibras sintéticas (Hernández, 2013).

Los volúmenes volcados de aguas residuales dependen de la estructura del colorante y aplicación del tinte en las empresas textiles, variando desde un 2% si es un colorante básico a un 50% cuando utilizan colorantes reactivos (Zaharia, 2014).

El color es el contaminante que se puede observar con notoriedad en el agua, concentraciones menores a un miligramo por litro (ppm) son vastamente observables, no obstante sus características químicas intrínsecas, lo convierten resistentes a la luz, al ataque microbiano y temperatura transformándolos en compuestos altamente recalcitrantes (Pereira, 2012).

La producción indirecta de estas masas de agua residual revela elevadas cargas de DQO, SST, DBO, colores diversos, pH variable y temperatura alta cuando se lleva a cabo el proceso de preparación y teñido y acabado. Estudios previos revelan que por cada kilogramo de producto de material textil se genera de 100 a 170 litros de agua residual. El agua residual volcada resulta originalmente del descruce que sirve para eliminar las impurezas naturales de las fibras y tejidos, el macerado genera 20%, siendo el proceso para darle brillo al algodón y del blanqueo, teñido y lavado 65% (EPA, 1997).

1.4 LEGISLACIÓN AMBIENTAL

Las aguas residuales producidas por la actividad industrial, y el tratamiento de aguas en los efluentes de las industrias textiles se analizan de manera muy específica debido al gran índice de contaminantes, sin embargo, las empresas deben regir sus producciones de descargas basados en las normativas de calidad ambiental del Ecuador; dicha normativa tiene como propósito la prevención y control de la contaminación ambiental, en relación con el recurso agua.

Según (TULSMA, 2015) indica la prohibición de descargas en un sistema público de alcantarillado sanitario, combinado o pluvial cualquier sustancia que pudiera bloquear los colectores o sus accesorios, formar vapores o gases tóxicos, explosivos o de mal olor, o que pudiera deteriorar los materiales de construcción en forma significativa; incluyendo en la lista los desechos líquidos de la industria textil.

1.5 HONGOS ENDÓFITOS

La palabra ‘endófito’ etimológicamente significa “dentro de la planta” (endon: dentro, phyton: planta), definiéndolos como microorganismos que pasan gran parte o todo su ciclo de vida colonizando tejidos de las plantas hospedadoras, sin causar daño evidente. “El ‘endofitismo’ se refiere a una asociación de costo-beneficio no obstructiva, asintomática y transitoria, cuyo término fue definido por la localización (no por función) y que se establece dentro de los tejidos vivos de la planta hospedadora”. Estos hongos se han encontrado en todas las plantas como pastos, algas, musgos y plantas vasculares (Fernández, 2013).

1.5.1 Clasificación

Estos hongos se dividen en 3 grupos, la micorriza, los balansiáceos y no balansiáceos. Las micorrizas forman relaciones simbióticas con las raíces de las plantas, y favorece la toma de nutrientes, los balansiáceos se

caracterizan por su desarrollo sistémico en tejidos de gramíneas y su transmisión vertical (semilla sexual) (Vanegas, 2013).

1.5.2 Tratamiento fúngico

El tratamiento fúngico tiene una increíble capacidad para degradar compuestos aromáticos, que es una propiedad intrínseca de los hongos. Gracias a esta capacidad los hongos, pueden degradar compuestos xenobióticos incluyendo colorantes que son usados en la industria textil; dicha función se debe a que los filamentos fúngicos son poco susceptibles a cambios de temperatura, aireación, nutrientes y pH (Pant, 2007).

1.5.3 Procesos implicados en la decoloración

Para la eliminación de colorantes, los hongos pueden degradar con diferentes mecanismos, estos estudios se pueden agrupar en biosorción, biodegradación y bioacumulación.

La biosorción es la unión de solutos a la biomasa mediante procesos que no implican energía metabólica o transporte, aunque tales procesos pueden ocurrir simultáneamente cuando se usa biomasa viva. Por lo tanto, puede ocurrir en biomasa viva o muerta, aquí se genera dos fases, la fase sólida que es el biosorbente y la fase líquida que es el solvente (Jimenez, 2009), la biodegradación es un proceso dependiente de energía y consiste en la descomponer el colorante en distintos subproductos mediante la ejecución de diferentes enzimas, varias enzimas implicadas en la decoloración de tinte son lacasa, manganeso peroxidasa (MNP), lignina peroxidasa (LIP), tirosinasa etc. y la bioacumulación es la acumulación de contaminantes a través el crecimiento activo de las células por metabolismo (Kaushik, 2008).

CAPITULO 2

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MICROORGANISMOS

Se utilizó dos aislados fúngicos HM y C156, que provenían de plantas de cacao. Estos microorganismos se encontraban conservados a -80 °C en tubo eppendorf en medio glicerina y agua.

2.2 COLORANTES

Se utilizó 2 tipos de colorantes industriales, novacron azul FN-R y Novacron negro WN, cuyos pigmentos son usados en la industria textil.

2.3 EXPERIMENTACIÓN

Los microorganismos fueron reactivados en papa agar dextrosa (PDA) y agar nutritivo (AN) a 32 °C en una incubadora por catorce días. Se evaluó el crecimiento de los aislados C156 y HM en medios papa dextrosa Broth (PDB), papa agar dextrosa (PDA) y medio mineral (MM) a estos medios se adicionó colorante negro WN y azul FN-R a 300 ppm.

Durante nueve días se evaluó el incremento de biomasa y decoloración en MM y PDB tanto en medio líquido como en sólido, con el objetivo de comprobar que aislado es más efectivo (Jimenez, 2009).

Tabla 3: Composición del medio mineral

Compuestos	Cantidades
K_2HPO_4	4.5 g/L
$MgSO_4 + 7H_2O$	0.2 g/L
NaCl	0.1 g/L
$CaCl_2$	0.1 g/L
$FeCl_3$	0.02 g/L
$(NH_4)_2SO_4$	1 g/L

Fuente: (Maiti, 2013); Modificado por: (Oviedo, 2017)

2.4 PREPARACIÓN DEL MEDIO LÍQUIDO

2.4.1 Medio mineral

En un erlenmeyer se añadió 1080 mL de medio mineral, luego se midió el pH y se bajó a 6.25 con ayuda de ácido sulfúrico, al instante se añadió 121.5 mg de los colorantes novacron azul FN-R y novacron negro WN y se autoclavaron los medios por quince minutos a 121 °C.

2.4.2 Medio PDB

En un matraz se colocó 366 mL de agua estructurada, luego se adicionó 109 mg de colorante negro y azul, asimismo, se añadió 26.4 g de PDB.

En 9 frascos de vidrio se adicionó 45 mL de PBD con tinte azul y negro respectivamente, a cada frasco se le colocó un tapón de algodón con gasa y se lo cubrió con papel aluminio. Una vez dispensados, se los autoclavó por 15 minutos a 121 °C (Tae-Soo, 2008).

2.4.3 Siembra

En una cámara de flujo laminar se introdujo los frascos y fueron esterilizados por 15 minutos con radiación UV, al instante con ayuda de un sacabocado de 5mm de diámetro, se extrajo una porción de agar que se insertó en los frascos de vidrio, finalmente se colocó los frascos en el shaker a 30 °C y 110 rpm durante 9 días (Tae-Soo, 2008).

2.4.4 Determinación de biomasa

Los frascos con PDB y MM fueron filtrados por medio del papel filtro watman, para determinar la biomasa inicial de los aislados C156 Y HM, para ello se obtuvo el peso inicial de la caja Petri y el papel donde fueron colocadas.

Para determinar el peso final de los aislados, se dejaron los microorganismos en la estufa hasta que marcaron un peso constante en la digital (Cardona, 2009).

2.5 PREPARACIÓN DEL MEDIO SÓLIDO

2.5.1 Medio mineral con agar

En un erlenmeyer se colocó 300 mL de medio mineral, donde se bajó el pH a 6.25 con ayuda de ácido sulfúrico; a continuación, en 100 mL de medio mineral se añadió 1.5 g de agar, para los colorantes negro WN y azul FN-R, luego se autoclavaron los medios por quince minutos a 121 °C.

2.5.2 Medio PDA

En un erlenmeyer con 100 mL de agua estructurada con colorante novacron azul FN-R y novacron negro WN se agregó 3.9 g de PDA, y se autoclavó por 15 minutos a 121 °C (Tae-Soo, 2008).

2.5.3 Siembra.

En una cámara de flujo laminar se colocaron 24 cajas Petri en UV durante 15 minutos, luego se dispensaron 12 cajas con colorante novacron negro WN y 12 cajas con colorante novacron azul FN-R, con ayuda de un sacabocado de 5 mm de diámetro se extrajo una porción de agar colonizados y se introdujo en el centro de la caja Petri para los aislados C 156 y HM, por último se incubaron a 32 °C por 9 días (Tae-Soo, 2008).

2.5.4 Crecimiento y decoloración en medio sólido.

Cada 24 horas se midió con una regla el crecimiento micelial de los aislados y el halo de degradación, en las cajas Petri. Este procedimiento se lo realizó por 9 días (Cardona, 2009).

CAPITULO 3

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluó el crecimiento de los aislados C156 y HM en los medios PDA y MM agar, con el objetivo de estimar la capacidad degradativa de estos organismos sobre los tintes novacron azul FN-R y novacron negro WN.

3.1 EVALUACIÓN DE CRECIMIENTO Y DECOLORACIÓN EN MEDIO SÓLIDO

Se evaluó el crecimiento de los aislados C156 Y HM a 300 ppm con colorante novacron azul FN-R, durante 9 días en PDA, por medio de la medición del diámetro de los aislados. El HM creció 1.65 cm hasta el noveno día, en tanto el C156 alcanzó su crecimiento total en la caja Petri antes del noveno día, (figura 1). Para el MM, el HM creció 0.85 cm hasta el noveno día, sin embargo, el C156 alcanzó su crecimiento máximo en el octavo día (figura 2).

Posteriormente, se evaluó el poder degradativo de los aislados C156 Y HM en presencia del colorante novacron azul FN-R, durante 9 días en PDA, mediante la medición del diámetro del halo de degradación provocada por los aislados. El C156 mostró gran efectividad para degradar el colorante, alcanzando la degradación total en el séptimo día en la caja Petri, mientras tanto, el aislado HM no exhibió degradación en este medio (tabla 4). En MM, el C156 mostró efectividad para degradar el colorante novacron azul FN-R, alcanzando al octavo día la máxima degradación, como se observa en la figura 2; en contraste, el HM no mostró degradación del colorante durante los nueve días.

Luego, se evaluó el crecimiento de ambos microorganismos con colorante novacron negro WN en medio PDA. El aislado C156 mostró gran efectividad para crecer en

medio PDA y medio mineral (MM), superando al HM; en MM ambos hongos crecieron, pero el C156, al igual que en el caso anterior, superó a HM (figura 3). Se obtuvo un mayor crecimiento en medio PDA, debido a que es un medio nutritivo, en contraste con MM, que es un medio empobrecido.

Después, se evaluó el poder de degradación que tienen los microorganismos HM y C156 sobre el colorante novacron negro WN, y se observó que ambas degradaron dicho colorante; el C156 fue más efectiva que HM (tabla 5), no obstante, en medio mineral, el HM degradó hasta el segundo día, mientras que el C156 no mostró ninguna evidencia de degradación (figura 4).

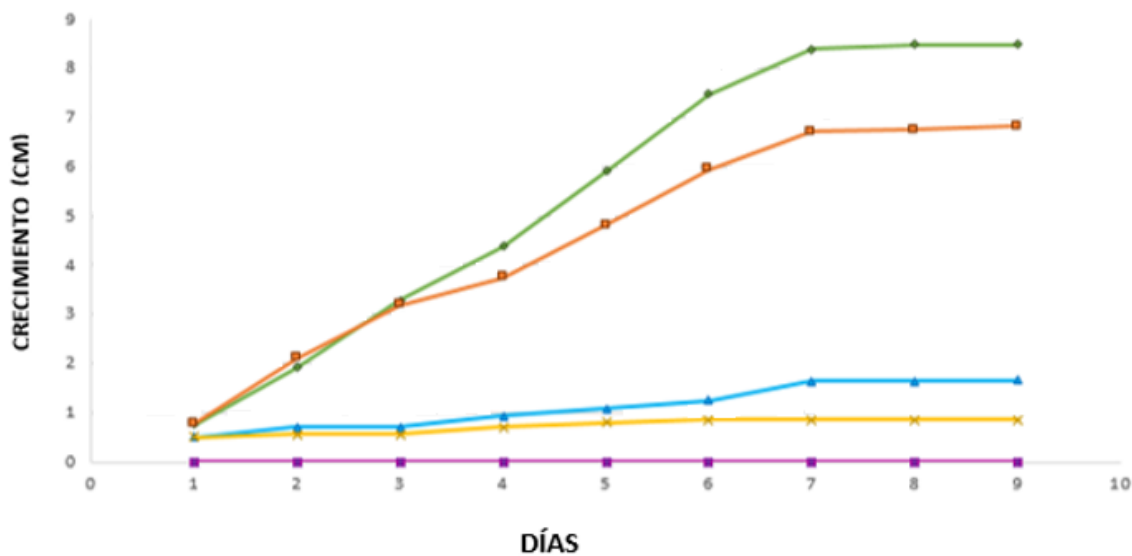


Figura 1: Crecimientos de los aislados C156 y HM en medios de cultivo PDA y MM a 300 ppm del colorante novacron azul FN-R

Símbolos: (▲) HM-PDA; (x) HM-MM; (◇) C156-PDA; (■) C156-MM, (X) Blanco

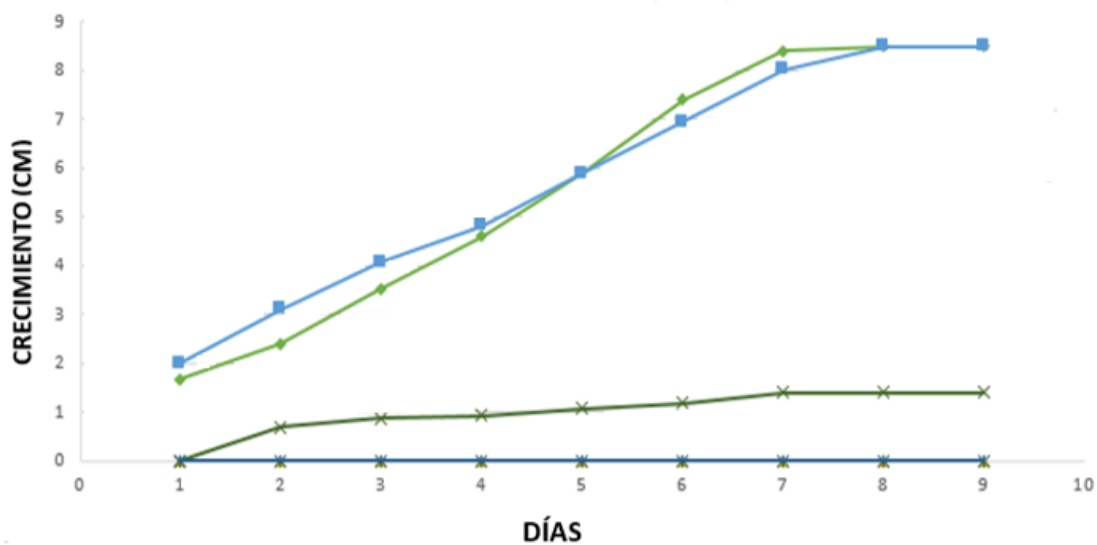


Figura 2: Degradación de los aislados C156 y HM en medios PDA y MM a 300 ppm del colorante novacron azul FN-R
 Símbolos: (▲) HM-PDA; (x) HM-MM; (◇) C156-PDA; (■) C156-MM, (X) Blanco

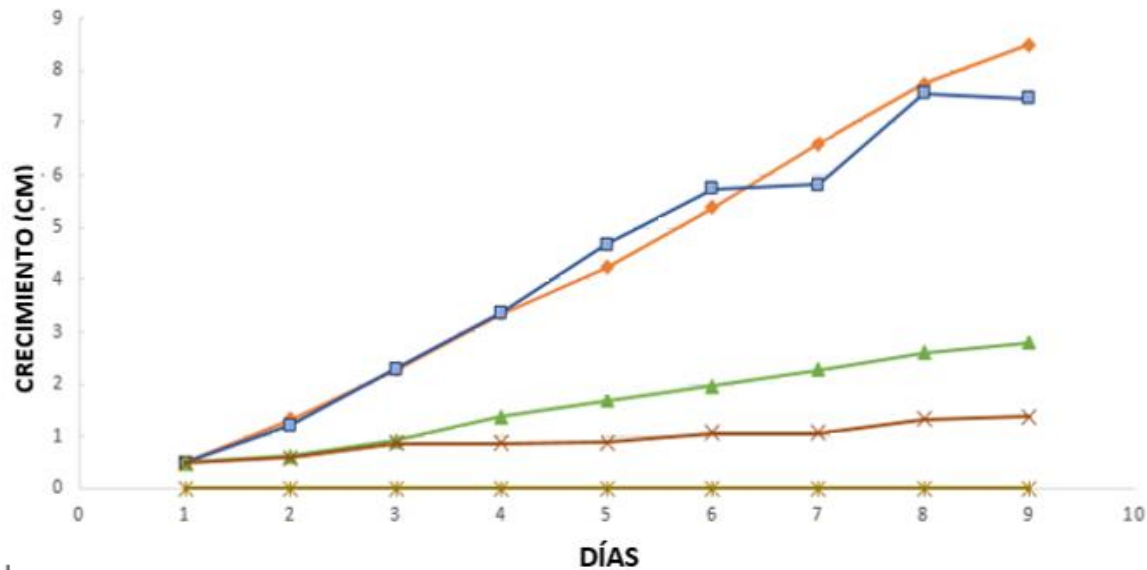


Figura 3: Crecimientos de los aislados C156 y HM en medios de cultivo PDA y MM a 300 ppm del colorante novacron negro WN.

Símbolos: (▲) HM-PDA; (x) HM-MM; (◇) C156-PDA; (■) C156-MM, (X) Blanco

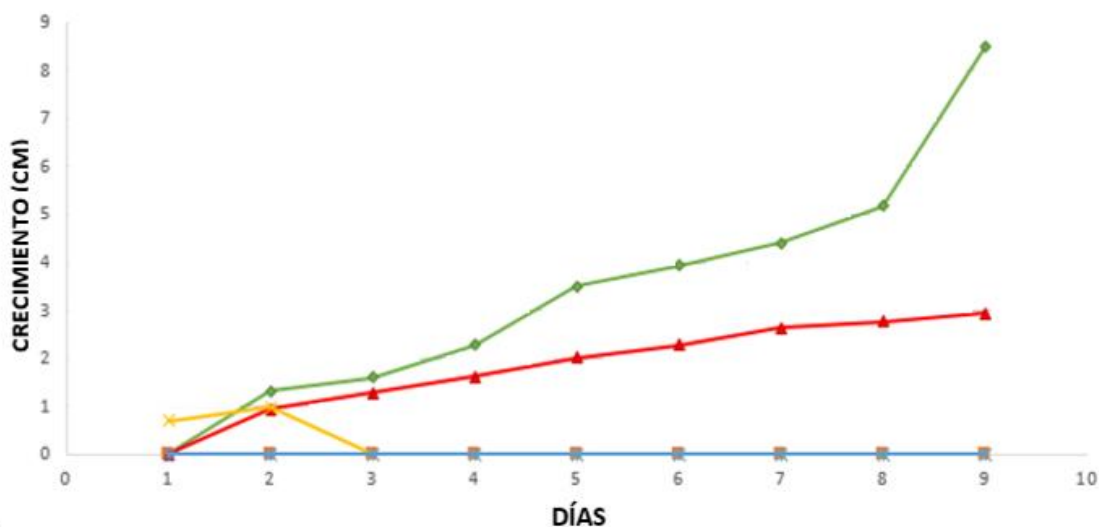


Figura 4: Degradación de los aislados C156 y HM en medios de cultivo PDA y MM a 300 ppm del colorante novacron negro WN.

Símbolos: (▲) HM-PDA; (x) HM-MM; (◇) C156-PDA; (■) C156-MM, (X) Blanco

3.2 EVALUACIÓN DE PESOS EN MEDIO LÍQUIDO

Se determinaron los pesos secos de los aislados C156 y HM en medio PDB y MM con colorante novacron azul FN-W. El peso del C156 en medio PDB fue de 1,6 g y el de HM fue de 12,7 g; la causa aparente de este excesivo incremento en biomasa en HM sería la toma de carbono del medio por parte de este aislado. En contraste, para MM, el C156 obtuvo un peso de 0,14 g y la HM de 0,21 g; estos valores bajos en biomasa se deben a que MM es un medio empobrecido.

Con colorante novacron negro WN y en PDB, el peso del aislado C156 fue de 2,39 g y el HM fue de 5,39 g; en medio MM, el peso del C156 fue de 0,07 g y el HM 0,04 g. Nuevamente, estas diferencias en biomasa entre los medios, se deben a que el PDB tiene mayor cantidad de nutrientes que el medio mineral.

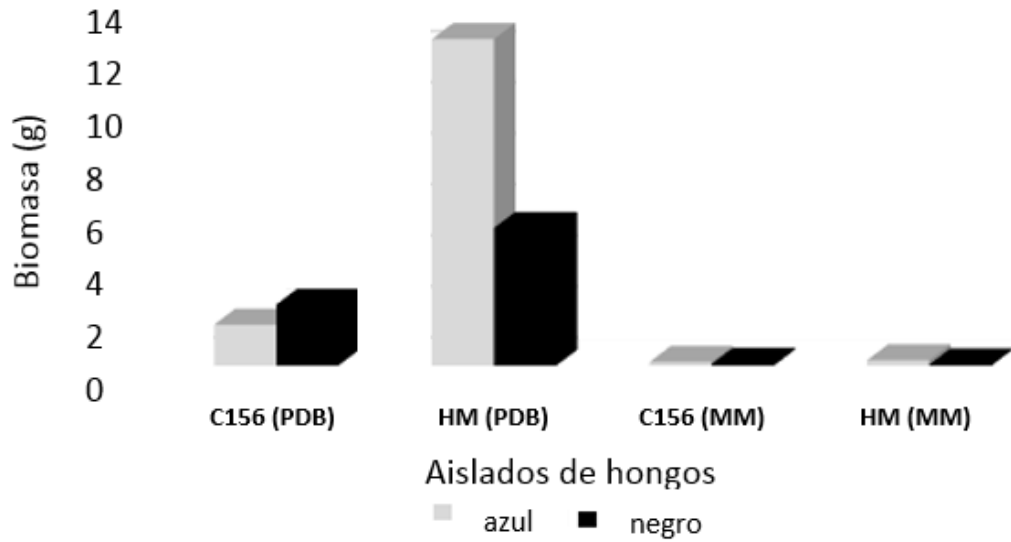


Figura 5: Comparación de la biomasa húmeda en los aislados C156 y HM en medios de cultivo PDB y MM

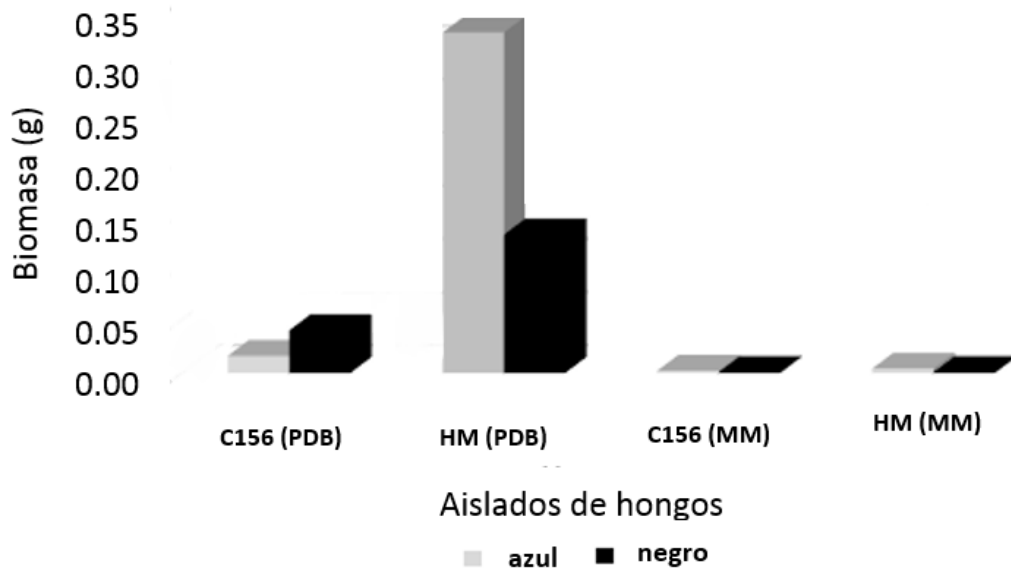


Figura 6: Comparación de biomasa seca en los aislados C156 y HM en medios de cultivo PDB y MM

3.3 EVALUACIÓN DE DECOLORACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO

A partir de las observaciones realizadas, se infirió que tanto en medio PDB como el MM (anexo 5), el aislado C156 tiene la capacidad de degradar el colorante novacron azul FN-R; sin embargo, al cuarto día se presentó una variación de color: una tonalidad amarilla, generada presuntamente a la formación de hidróxido de hierro (Neilands, 1986). Esto nos condujo a inferir que el C156 utiliza el método de bioacumulación para la degradación del colorante azul FN-R (figura 5). Por otra parte, el aislado HM no generó ninguna variación del colorante azul FN-R (anexo 6), no obstante, se evidenció un crecimiento excesivo, así como la absorción del líquido del frasco. Para el colorante novacron negro WN, tanto en PDB como en MM, ninguno de los microorganismos causó variación alguna en la coloración durante los nueve días del ensayo (anexo 7 y 8).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones:

1. El aislado C156 mostró gran efectividad para degradar el tinte novacron azul FN-R tanto en PDA y como en MM, en medio sólido; la decoloración máxima se alcanzó al octavo día. Mientras tanto, el HM no mostró capacidad para degradar el colorante novacron azul FN-R.
2. El aislado C156 mostró gran efectividad para degradar el tinte novacron negro WN en medio sólido, pero únicamente en PDA. Mientras que, el HM no degradó con efectividad el colorante novacron negro WN en PDA.
3. El aislado C156 encapsuló al tercer día al colorante novacron azul FN-R, tanto en PDB como en MM líquido, sin embargo, la tonalidad del líquido contenido en los frascos exhibió una tonalidad amarilla.
4. El aislado C156 y HM no fueron eficaces para degradar el colorante novacron negro WN en medio líquido.

Recomendaciones:

1. Se recomienda proseguir con la investigación para determinar cuáles son las rutas que utilizan estos aislados de hongos para la eliminación de los colorantes.
2. Se recomienda el uso de biorreactores para la producción masiva de microorganismos fúngicos que permitan la degradación de tintes en aguas residuales emitidas por las industrias textiles.

BIBLIOGRAFÍA

- Abrahart. (1977). *Dyes and their Intermediates*. New York: Chemical Publishing, pp. 1–12.
- Agrawal, S. C. (2017). Decolorization of textile dye by laccase from newly isolated endophytic fungus *Daldinia sp.* *ResearchGate*(48(1)), 1-10.
- AITE. (2017). Asociación de Industriales Textiles del Ecuador. Retrieved from Asociación de Industriales Textiles del Ecuador: <http://www.aite.com.ec/index.html#nosotros>
- Cardona, M. J. (2009). Degradación de colorantes industriales con hongos ligninolíticos. *Redalyc* (48. pp.), 1-12.
- EPA. (1997). United States Environmental Protection Agency. Retrieved from <https://clu-in.org/download/toolkit/textilsn.pdf%3E>
- Fernández, S. R. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16(2), 132-146.
- Gutiérrez, L. V. (2006, Instituto tecnologico de Celaya). Estudio de la degradación de un colorante azo rojo reactivo en un biorreactor anaerobio de flujo ascendente. Tesis doctoral, Instituto tecnologico de Celaya, Departamento de ingeniería química, Celaya.
- Hernández, E. M. (2013). "Procesos de estabilización de residuos generados en la industria textil en colombia mediante lodos activados. Bogotá: Universidad Militar Nueva Granada.
- Jimenez, R. C. (2009). Cinética de degradación de colorantes textiles de diferentes clases químicas por hongos y bacterias inmovilizados sobre fibra de Agave tequilana Webber var. azul. Tesis de grado , Pontificia Universidad Javeriana., Facultad de Ciencias, Bogotá D.C.

- K.V. Radha, I. R. (2005, 02 26). Decolorization studies of synthetic dyes using *Phanerochaete chrysosporium* and their kinetics. (P. B. 40, Ed.) ScienceDirect, 3337–3345.
- Kaushik, P. A. (2008). Fungal dye decolourization: Recent advances and future potential. ScienceDirect, 127-141.
- Kunz, A. V. (2001). Combined treatment of textile effluent using the sequence *Phanerochaete chrysosporium*–ozone. Chemosphere, 44, 281-287.
- Macías, H. G. (2017). Evaluación del uso de enzimas lignolíticas para la degradación de colorantes industriales. Tesis de pre-grado., Universidad Técnica de Manabí., Facultad de ciencias matemáticas, físicas y químicas., Portoviejo - Ecuador.
- Maiti. (2013). International Biodeterioration y Biodegradation .
- Moeller, G. y. (2003). Desarrollo de tecnologías no convencionales para el tratamiento de efluentes de la fabricación de colorantes del tipo azo. ResearchGate.
- Neilands, B. S. (1986). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores'. Analytical Biochemistry, 47-56.
- Ngieng, N. S. (2013). Decolourisation of Synthetic Dyes by Endophytic Fungal Flora Isolated from Senduduk Plant (*Melastoma malabathricum*). (S. P. W.A. Kues, Ed.) Hindawi, 2013, 1-7.
- O'Neill, C. F. (1999). Review Colour in textile effluents – sources, measurement, discharge consents and simulation: a review. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 1009-1018.
- Ozdemir, S. K. (2013). Treatment of azo dye containing synthetic textile dye effluent using sulfidogenic anaerobic baffled reactor. ScienceDirect, 135-143.
- Padmavathy, S. S. (2003). Aerobic decolorization of reactive azo dyes in presence of various cosubstrates. Chem. Biochem. Eng(Q. 17 (2)), 147-151.
- Pant, D. A. (2007). Biological approaches for treatment of distillery wastewater: A review. Elsevier, 2321 2334.

- Pereira, L. M. (2012). *Dyes-Environmental Impact and Remediation*. Braga, Portugal.
- Robinson, T. G. (2000). Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *ScienceDirect*, 77, 1-9.
- Sandoval, M. N. (2008). Evaluación de inductores metálicos y co-sustratos para la remoción de negro reactivo 5 empleado *Pleurotus ostreatus* inmovilizado en fique. Tesis de grado, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá, D.C.
- Standardcon. (2015). Types of Textile Dyes. Retrieved 2017, from <http://dyes-pigments.standardcon.com/textile-dyes.html>
- Suárez, D. R. (2015). Caracterización inicial de lacasas y peroxidasas producidas por biopelículas de hongos decoloradores de tintes azoicos. tesis de pre-grado, Universidad Nacional Agraria La Molina, Facultad de Ciencias, Lima - Perú.
- Tae-Soo, L. C.-S. (2008). Degradation of Three Aromatic Dyes by White Rot Fungi and the Production of Ligninolytic Enzymes. *Mycobiology*, 36(2), 114–120.
- Teran, L. E. (2017, 12 6). Análisis comparativo del proceso de tintura para Co100% con colorantes reactivos comunes y colorantes reactivos "AVITERA S.E.", contribuyendo al cuidado medioambiental en empresas PINTO S.A. tesis de pregrado, Universidad técnica del norte, Ibarra.
- TULSMA. (2015). Normas generales para descarga de efluentes al sistema de alcantarillado. In M. d. Ambiente, Acuerdo Ministerial No. 028 libro VI del texto unificado de legislación secundaria (p. 96). Quito.
- Vanegas, B. K. (2013). Identificación molecular de hongos aislados de tejidos de frijol con síntomas de antracnosis. *Acta biol. Colomb*, 19(2), 143-154.
- Vera, X. C. (2012). Hongos Nativos con Potencial Degradador de Tintes Industriales en el Valle de Aburrá, Colombia. 1-11.
- Zaharia, C. &. (2014). Textile Organic Dyes – Characteristics, Polluting Effects and Separation/Elimination Procedures from Industrial Effluents - A Critical Overview.

'Gheorghe Asachi' Technical University of Iasi, Faculty of Chemical Engineering and Environmental Protection, Romania.

ANEXOS



Anexo 1: Preparación del medio mineral con colorante azul FN-R y negro WN.



Anexo 2: Filtración de aislamientos de hongos C156 y HM en medio líquido.



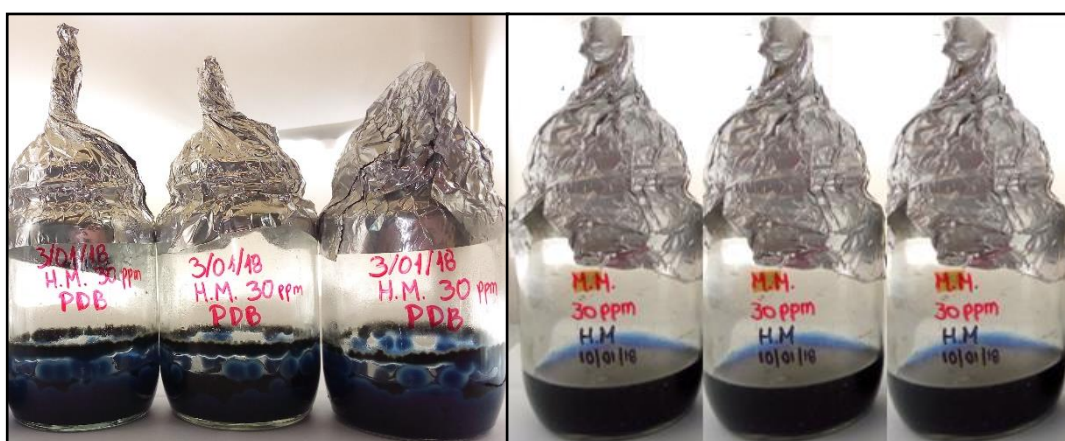
Anexo 3: Siembra de aislados de hongos C156 y HM en MM y PDA



Anexo 4: Medición de crecimiento y degradación de los aislados de hongos C156 y HM.



Anexo 5: Aislado del hongo C156 en MM y PDB a 300 ppm, respectivamente.



Anexo 6: Aislado del hongo HM en MM y PDB a 300 ppm, respectivamente.



Anexo 7: Aislado de hongo C156 en MM y PDB a 300 ppm, respectivamente.



Anexo 8: Aislado de hongo HM en MM y PDB a 300 ppm, respectivamente.

Tabla 4: Crecimiento y degradación del colorante azul FN-R en MM y PDA



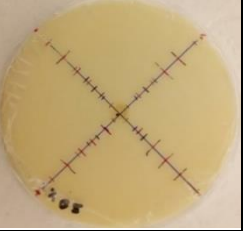
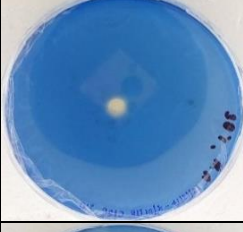
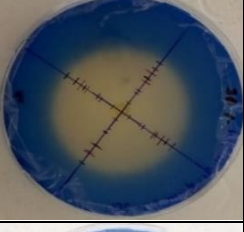
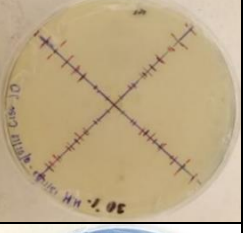
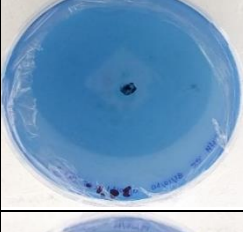
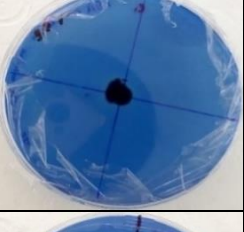
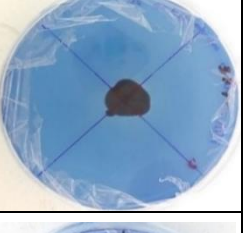

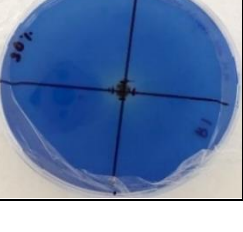
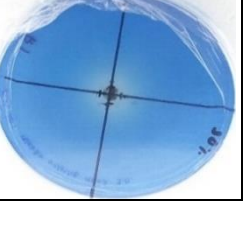
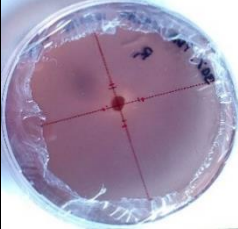
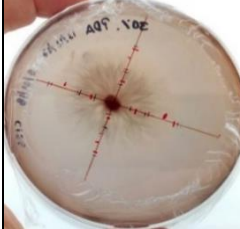
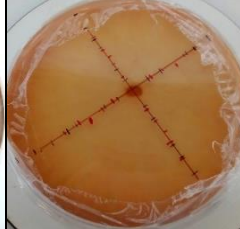
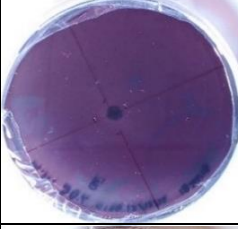
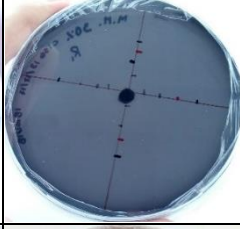
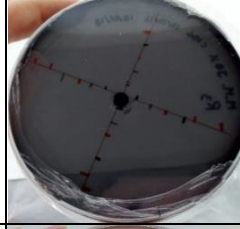
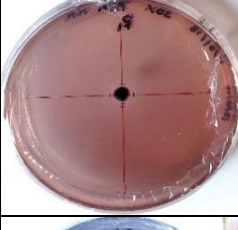
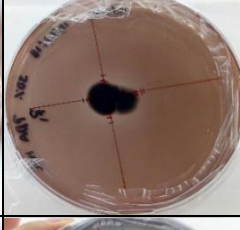
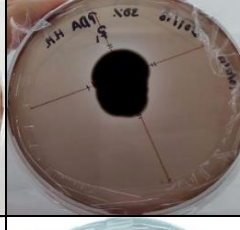
	Medios	DIA 1	DIA 5	DIA 9
 AISLADO DE HONGO C156	30% PDA			
	30% MM			
 AISLADO DE HONGO HM	30% PDA			
	30% MM			

Tabla 5: Crecimiento y degradación del colorante negro WN en MM y PDA

		DIA 1	DIA 5	DIA 9
AISLADO DE HONGO C156	30% PDA			
	30% MM			
AISLADO DE HONGO HM	30% PDA			
	30% MM	