



BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

“Degradación del colorante azoico violeta 51 por los hongos de la pudrición blanca: *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex Fr.) Kummer., *Psilocybe cubensis* (Singer) y *Psilocybe yungensis* (Singer & A.H. Sm.) (*Basidiomycota*)”

Tesis que para obtener el título de

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

Presenta:

EDGAR CABRERA ACATITLA

DIRECTOR: DR. MARCO ANTONIO MARÍN CASTRO



NOVIEMBRE 2022

AGRADECIMIENTOS

A Dios por brindarnos la vida y la oportunidad de cumplir nuestras metas en ella.

A mi madre y a mi abuela por darme su amor, apoyo y sabiduría incondicionalmente durante toda mi vida.

A mi tutor Marco Antonio Marín Castro por la guía, enseñanza y apoyo en la realización de este proyecto.

Al Centro de Investigación en Ciencias Agrícolas y a todo el personal por haber brindado su tiempo y su atención amablemente, así como las instalaciones y los reactivos para la realización de este proyecto.

A mis sinodales por la revisión y consejos durante la revisión de esta tesis.

A David Medina Enciso por su apoyo en el trabajo de laboratorio para realizar esta tesis.

A la Facultad de Ciencias Biológicas BUAP, a todos los profesores por la formación académica y las enseñanzas que dejaron depositadas en mí durante esta carrera y a todos mis amigos y compañeros que me acompañaron durante estos años.

DEDICATORIA

A mi madre y a mi abuela quienes son mi fuente de principal motivación y en quienes he encontrado el mejor ejemplo de amor, resiliencia, trabajo, perseverancia y altruismo.

A todos aquellos que creen que los hongos y la Micología puede ayudar a cambiar el mundo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1	Introducción	1
1.1	Planteamiento del problema.....	2
1.2	Antecedentes	3
2	Marco de referencia	7
2.1	Hongos: Sistemática y ecología	7
2.2	Hongos ligninolíticos y sus enzimas: efectos y aplicaciones.....	8
2.3	Lacasa (Fenol oxidasa)	10
2.4	Contaminación ambiental del agua por la industria textil en Puebla	13
2.5	Biorremediación y contaminantes	15
3	OBJETIVOS E HIPOTESIS	19
3.1	Objetivo general:	19
3.2	Objetivos específicos:	19
3.3	Hipótesis	19
4	Material y métodos	20
4.1	Especies estudiadas	20
4.2	Modelo de estudio y análisis experimental.....	24
4.2.1	Etapa I: Colecta, aislamiento y evaluación cualitativa de las cepas. .	24
4.2.2	Etapa II: Generación de micelio activado en medio Kirk.....	27
4.2.3	Etapa III: Contacto del micelio activado con el colorante y Pruebas cuantitativas de su degradación	27
4.2.4	Etapa IV: Análisis estadístico	29
4.3	Diagrama experimental	29
5	RESULTADOS	30
5.1	Aislamiento y purificación del micelio de los hongos experimentales	30
5.2	Determinación cualitativa de la presencia de enzima lacasa en las especies cultivadas en medio sólido PDA con los colorantes azoicos azul turquesa 86, rojo 23 y violeta 51.	31
5.3	Determinación cuantitativa de la capacidad de las cepas seleccionadas y sus enzimas para la degradación del colorante azoico violeta 51 en medios de cultivo líquido.	33

5.4	Comparación de la capacidad de degradación del colorante azoico violeta 51 en medio líquido con micelio activado y enzimas generadas de las distintas cepas mediante un ANOVA.	36
6	DISCUSIÓN.....	38
7	CONCLUSIONES.....	43
8	BIBLIOGRAFÍA.....	45
9	ANEXOS.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Modelo estructural de la lignina.....	9
Figura 2.2 Modelo 3D de Lacasa	11
Figura 2.3 Cromóforo tipo Azo	14
Figura 4.1 <i>Pleurotus ostreatus</i> P. Kumm, 1871	20
Figura 4.2 <i>Psilocybe cubensis</i> Singer 1948	21
Figura 4.3 <i>Psilocybe yungensis</i> Singer & A.H. 1958	22
Figura 4.4 Aislamiento de macromicetos	25
Figura 4.5 PDA-MCD LAB.....	25
Figura 4.6 Medios de cultivo.....	26
Figura 4.7 Micelio activado.....	27
Figura 4.8 Intercambio de medios líquidos.....	28
Figura 4.9 y 4.10 Materiales para espectrofotometría	28
Figuras 5.1, 5.2 y 5.3 Proceso de aislamiento y purificación de cepas	30
Figura 5.4 Prueba cualitativa.....	31
Figura 5.5 HPB desarrollándose en contaminante	32
Figura 5.6 Halo de decoloración causado por el micelio	32
Figuras 5.7, 5.8 y 5.9 Biodegradación del colorante Violeta 51.....	33
Figura 5.10 Curva de calibración.....	34
Figura 5.11 Histograma de degradación de las especies.....	36
Figura 5.12 Diagrama de cajas y bigotes	37
Figura 6.1 Pruebas TUKEY	40
Figuras 7.1 y 7.2 Colorante violeta a 100ppm con y sin contacto con HPB.	43

ÍNDICE DE TABLAS Y ANEXOS

Tabla 1. Municipios y localidades de los sitios de colecta de los macromicetos estudiados	24
Tabla 2. Sistemática de las especies estudiadas	26
Tabla 3. Valores de absorbancia y ppm registrados cada 24 horas para las especies <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Psilocybe cubensis</i> y <i>Psilocybe yungensis</i>	35
Anexo 1. Composición nutrimental (gr/L) de los medios de cultivo líquidos evaluados para la producción de enzimas lacasa.	52
Anexo 2. Formulas ocupadas.....	52

RESUMEN

Los hongos son organismos conocidos por su gran habilidad para degradar materia orgánica y reincorporarla en la naturaleza, incluso sustancias complejas como la lignina. Los hongos de la pudrición blanca se caracterizan por la producción de varios tipos de enzimas extracelulares, como las lacasas, cuya baja especificidad hacia los sustratos que contienen lignina les dan la capacidad a estas enzimas de ser utilizadas para degradar una gran cantidad de compuestos xenobióticos.

En este trabajo se colectaron, identificaron y aislaron las especies: *Psilocybe cubensis* y *Psilocybe yungensis*, para comparar su actividad enzimática con la de *Pleurotus ostreatus* cepa "G" del Centro de Investigación en Ciencias Agrícolas - BUAP. Se realizaron pruebas cualitativas para detectar la presencia de actividad enzimática lacasa mediante la degradación parcial de diferentes colorantes a 30 ppm en placas Petri con medio sólido PDA. Se generó micelio activado en matraces con 100 ml de medio Kirk modificado, después de incubar el micelio 10 días se cambió a un medio contaminado con el colorante a 100 ppm. Se realizaron pruebas cuantitativas para evaluar y comparar la degradación de 100 ml del colorante azoico violeta 51 a 100 ppm, se midió la concentración del colorante en los medios de cultivo cada 24 horas durante 120 horas, las mediciones se llevaron a cabo mediante alícuotas de 1 ml, con ayuda de celdas y de un espectrofotómetro a 520 nm.

Los resultados demuestran una alta actividad enzimática degradando el colorante azoico violeta 51 por las especies seleccionadas, habiendo presentado niveles altos de degradación en todos los casos, llevando el medio de cultivo de 100 ppm a niveles entre 15 y 2.91 ppm en 120 horas. Con los datos obtenidos se realizó un análisis estadístico con el programa SAS y se determinó que no existen diferencias significativas entre la degradación del colorante generada por las especies elegidas, por lo que las especies estudiadas podrían ser utilizadas para protocolos de biorremediación de suelos o aguas contaminadas con colorante azoico violeta 51 o similares de manera indistinta.

1 Introducción

El acelerado crecimiento demográfico y el desarrollo de industrias textiles, que pretenden mejorar la comodidad y calidad de vida del ser humano, generan paralelamente un agotamiento constante de los recursos naturales, al igual que materias primas en los procesos de producción.

El vertido de sustancias tóxicas contamina grandes masas de agua que no pueden volver a utilizarse. Actualmente se producen más de 7×10^5 toneladas de colorante al año y por tal motivo desde 1989 la industria textil fue catalogada entre las diez principales actividades generadoras de desechos líquidos tóxicos (EPA, 2013).

Los colorantes utilizados en los procesos de tinción que son liberados en los efluentes, representan un serio problema ambiental y una preocupación para la salud pública nacional, ya que desde el 2004 el volumen de descarga de aguas residuales de la industria textil representa aproximadamente el 0.28% del total de aguas residuales industriales del país, siendo mayor a 64,196 m³/día y habiéndose incrementado en un 21% del 2007 al 2016 según datos de CONAGUA. (SEMARNAT-CNA, 2004; 2005; 2017; 2019).

Aunque existen industrias que cuentan con plantas de tratamiento de aguas residuales, no son suficientes para evitar los efectos agresivos de algunos contaminantes empleados en los procesos textiles, principalmente debido a que la descarga final, continua con una alta concentración de colorantes que son vertidos, en los efluentes ocasionando un gran impacto ambiental negativo.

Una alternativa que se ha investigado es la degradación de colorantes textiles mediante la utilización de biomoléculas como la enzima lacasa la cual posee la propiedad de oxidar derivados de compuestos contaminantes ambientales altamente recalcitrantes, como los colorantes mencionados, los cuales en su estructura molecular, son similares a los compuestos ligninofenólicos de la madera, por lo que resulta útil en el tratamiento de agua contaminada proveniente de la industria textil (Toca-Herrera & Rodríguez, 2006).

Varias especies de hongos comestibles del género *Pleurotus*, causantes de la pudrición blanca de la madera, han sido utilizados en su mayoría experimentalmente para estos procesos de biorremediación debido a su capacidad para generar enzimas lacasas, estos hongos y sus enzimas han demostrado un gran potencial, sin que esto cierre las posibilidades de experimentar con otros géneros y especies de hongos que, debido a la naturaleza de los sustratos donde se desarrollan naturalmente y teniendo propiedades medicinales y farmacéuticas, también generan las enzimas lacasas, por lo que resulta prometedor e interesante comprobar su potencial enzimático para generar más propuestas de solución a la contaminación de agua y suelo por colorantes textiles.

Debido a esta problemática se propone comprobar que los hongos *Psilocybe cubensis* y *Psilocybe yungensis* generan enzimas lacasas, estas son biomoléculas de naturaleza proteica que aceleran la velocidad de reacción hasta alcanzar un equilibrio, actúan como catalizadores de reacciones químicas específicas en los seres vivos o sistemas biológicos y son una alternativa para la eliminación de los colorantes textiles (Ramírez-Ramírez & Ayala Aceves, 2014).

1.1 Planteamiento del problema

En México la industria maquiladora de exportación nace a mediados de la década de los sesenta como una respuesta económica al encarecimiento de la mano de obra que tuvo lugar en Japón y Estados Unidos, países altamente industrializados. El propósito central era que estas empresas se responsabilizaran de crear fuentes de empleo, fortalecer la balanza comercial del país a través de una mayor aportación neta de divisas, contribuir a la integración interindustrial al incrementar la competitividad y la capacitación de los trabajadores en la industria nacional e impulsar el desarrollo y la transferencia de tecnología en el país (Arturo & Castillo Tapia, 2001).

Actualmente según cifras de la Secretaría de Economía hay más de 3,750 plantas maquiladoras en el país (70% concentrado en la frontera norte) que han generado 17,500 millones de dólares en divisas. La industria de la confección genera 400,000

empleos en México, de los cuales 230,000 están vinculados a la confección de prendas de vestir para el exterior (bajo los programas de maquila), mientras que la producción del resto es para el mercado interno. En el estado de Puebla se encuentra la mayor parte de la maquila textil formal e informal; como consecuencia de ello, el corredor industrial Puebla-Tlaxcala es el cuarto en importancia del país (Juárez, 2003).

En la actualidad México enfrenta serios problemas ambientales, existe una gran preocupación e interés por los efectos nocivos de los residuos industriales, ya que una gran diversidad de compuestos inorgánicos tóxicos que se producen en la industria, se descarga sobre los recursos agua, suelo y aire. Tal es el caso de los tintes o colorantes empleados en la industria textil, cerca del 50% de estos son colorantes de tipo azoico, particularmente son transformados a compuestos carcinogénicos bajo condiciones anaeróbicas (Toca-Herrera & Rodríguez, 2006).

La mayor parte del color que pasa del proceso de producción a estos efluentes y más tarde al medio ambiente se origina en el proceso de lavado (o desgaste) y blanqueado de fibras naturales como el algodón, y también de las etapas de secado y terminado de las prendas en las lavanderías de las maquiladoras. Dada la variedad de fibras, colorantes y productos utilizados, estos procesos generan efluentes de gran diversidad y complejidad química, los cuales no se tratan adecuadamente en una planta de tratamiento de aguas residuales convencional. La composición química de los efluentes textiles cambia rápidamente como resultado de las diferentes preferencias de los consumidores y de la moda, lo cual hace más difícil el trabajo de remoción de los contaminantes (Flores-Torres & Guadalupe, 2004).

1.2 Antecedentes

Alrededor del mundo una nueva legislación ambiental para los productos textiles y restricciones más severas para las descargas de aguas residuales están forzando a las procesadoras textiles a reutilizar agua y químicos en sus procesos. Este desafío ha desatado una intensa búsqueda de nuevos avances en la tecnología de

tratamiento de aguas residuales. La remoción del color, sobre todo en los efluentes textiles, ha sido un gran desafío durante las décadas pasadas, y hasta ahora no hay ningún tratamiento económicamente atractivo que permita remover de un modo efectivo los tintes. En años pasados se hicieron notables avances en el empleo de aplicaciones biotecnológicas en los efluentes textiles no sólo para remover el color, sino también para la completa eliminación del colorante. Entre ellos se encuentran el mejoramiento de los tratamientos mediante filtración, oxidación química y técnicas especializadas de floculación, así como pretratamientos que incluyen digestión anaeróbica, biorreactores de película fija, reactivos de oxidación Fenton, electrólisis o flotación por espuma. Algunas de esas nuevas tecnologías son prometedoras en cuanto a su costo y presentación, pero todas ellas tienen limitaciones, por lo que requieren una investigación más a fondo y una mayor validación (Saldoval & Gordillo, 2009).

Una alternativa para recuperar estos cuerpos de agua contaminados es la biorremediación, la cual utiliza sistemas biológicos o sus derivados para catalizar la degradación o transformación de compuestos tóxicos a formas menos dañinas. Uno de los objetivos del uso de la biorremediación es aumentar y mejorar la biodegradación por organismos nativos (microflora), lo que se conoce como biorremediación intrínseca, o por medio de la adición de organismos (bioaugmentación) para llevar a cabo un cambio en ese ambiente (Rodríguez-Rosario, 2005). Se han encontrado diferentes microorganismos (bacterias aeróbicas y anaeróbicas) para catalizar la decoloración del tinte, y también se han obtenido algunos resultados prometedores para acelerar la decoloración añadiendo compuestos mediadores, cambiando las condiciones del proceso o aplicando altas temperaturas. Otro tipo de microorganismos que prometen ambientalmente en la decoloración de estos efluentes son los hongos y actinomicetos, dentro de estos, los hongos de la pudrición blanca, especialmente las especies del género *Pleurotus* han sido utilizadas para la degradación de compuestos monoaromáticos clorados, benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (BTEX). La biodegradación de tintes por hongos de la podredumbre blanca ofrece una ventaja sobre otros procesos debido

a su capacidad para mineralizar completamente distintos colorantes (Nithya & Ragunathan, 2011).

Las especies del género *Pleurotus*, los cuales son agaricales causantes de la pudrición blanca, han sido empleados para la degradación de varios contaminantes desde la década de los 80's, debido a su capacidad para degradar compuestos de estructura molecular compleja mediante un sistema enzimático oxidativo de carácter no específico, han brindado gran potencial para el tratamiento de efluentes contaminados con colorantes (Rodríguez *et al.*, 2006; Nithya y Ragunathan, 2011). Existen muchos antecedentes de hongos Basidiomicetos de la pudrición blanca y sus enzimas para el tratamiento de diferentes compuestos recalcitrantes como son los hidrocarburos, pesticidas, resinas, colorantes, etc., por lo que a continuación se citan algunos ejemplos de estudios que se han realizado:

González (2001) realizó investigaciones con el hongo *Trametes sp.* I-62, aplicando distintos compuestos aromáticos para inducir la síntesis de la enzima lacasa, obteniendo que isómeros del alcohol veratrílico, alcohol 2,5- dimetoxibencílico y alcohol 3,5- dimetoxibencílico, presentan diferentes capacidades de inducción de la actividad lacasa, así como que otros dos compuestos, el ácido *p*-metoxifenol y el guayacol, también producen un máximo de inducción; sin embargo, ésta varía según la fase de crecimiento del hongo.

Manzano *et al.*, (2004) estudiaron a las especies *Trametes membranacea* (B-1), *Lentinus hirtus* (B-8) y *Pleurotus djamor* (B-9) para determinar su capacidad de degradación sobre el colorante Violeta cristal, obteniendo porcentajes de degradación de 36.6%, 46% y 8.5 % respectivamente.

Posteriormente Gomes-Machado & Matheus-Dacido, (2006) reportaron el elevado potencial de *Pleurotus ostreatus* para producir un complejo lignocelulósico empleado para la biodegradación de contaminantes orgánicos y la decoloración del azul brillante de remazol.

Sánchez-Vázquez *et al.*, (2007) reportan la utilización de los hongos *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus djamor* y *Pleurotus pulmonarius* y sus enzimas para la

biodegradación de compuestos recalcitrantes presentes en suelo y agua que son de distinta naturaleza química, tales como hidrocarburos derivados del petróleo, bifenilos policlorados y el insecticida endosulfan, con resultados prometedores en todos los casos.

Fernández *et al.*, (2009) demostraron el potencial de los hongos de la podredumbre blanca *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete chrysosporium* para la decoloración del agua contaminada con el colorante Negro Reactivo 5 (NR5) y concluyeron que las especies *Trametes versicolor* y *Pleurotus ostreatus* son las mejores en la remoción del colorante.

Nithya y Ragunathan (2011) lograron establecer que es importante la acción que juegan los microorganismos para la remediación de metales pesados, ya que el hongo *Pleurotus sajor caju*, es capaz de realizar la decoloración de rojo congo con nanopartículas de plata presentes en el medio de cultivo.

Es importante investigar nuevos géneros de hongos ya sean lignocelulósicos o no, pero que puedan generar una alternativa de producción enzimática de las lacasas y comprobar sus efectos sobre los colorantes y contaminantes mencionados, especies tales como *Psilocybe cubensis* y *Psilocybe yungensis*, las cuales crecen sobre sustratos lignocelulósicos y que tienen amplios antecedentes en el aspecto medicinal y en estudios psicotrópicos son las utilizados en esta propuesta.

2 Marco de referencia

2.1 Hongos: Sistemática y ecología

Los hongos son organismos unicelulares o pluricelulares, provistos de núcleo, heterótrofos por absorción, aerobios o anaerobios. Cuentan con capacidad de reproducción sexual y asexual; pueden ser dimórficos presentándose como hifas o levaduras, se originan y dispersan a partir de esporas. Sus células somáticas o hifas pueden estar septadas o no, son filamentosas, ramificadas y crecen agrupadas como masas blancas y algodonosas llamadas micelio, su pared celular contiene quitina y glucano, sus sustancias de reserva son glicógeno y lípidos, no poseen sistema vascular, ni cloroplastos y son un grupo filogenéticamente más emparentado a los animales que a las plantas. (Pacioni 1982; Guzmán 1985; Sánchez-Vázquez et al., 2002; Herrera y Ulloa, 2004; Viramontes-Ramos et al., 2016).

Hay más de 150 000 especies de hongos identificadas en el mundo, aunque se calcula que hay de 1.5 a 5 millones de especies existentes, de las cuales se encuentran más de 200 000 especies dentro del territorio Mexicano, estos cuentan con una gran diversidad de tamaños, colores y formas, están presentes en todos los ecosistemas y pueden colonizar cualquier hábitat de los 0 a más de 4000 msnm en donde exista materia orgánica disponible, agua y una temperatura entre 4 y 60 °C, pueden tener distintos hábitos como saprotrofos, que utilizan materia orgánica en descomposición para obtener energía, parásitos que utilizan como alimento células de organismos vivos o simbioses que se asocian con otros organismos para intercambiar recursos. Los hongos tienen un papel muy importante en la naturaleza dentro de los ciclos del carbono, nitrógeno y azufre; estos organismos junto a las bacterias son los descomponedores clave para la reincorporación de materia orgánica en la formación del suelo (Sánchez-Vázquez et al., 2002; Herrera y Ulloa, 2004; Aguirre-Acosta et al., 2014; Viramontes-Ramos et al., 2016).

Los hongos son osmótrofos lo que significa que absorben su alimento del exterior y

para esto penetran los sustratos en los que se encuentran y secretan enzimas extracelulares para reducirlos a moléculas más simples y asimilables por sus hifas. Estas enzimas permiten a los hongos alimentarse de una gran variedad de componentes orgánicos como madera, caucho, celulosa, plumas o cabello que los hongos utilizan como fuente de energía y carbono (Sánchez-Vázquez *et al.*, 2002; Viramontes-Ramos *et al.*, 2016).

2.2 Hongos ligninolíticos y sus enzimas: efectos y aplicaciones

Los hongos ligninolíticos son un grupo artificial en el cual se encuentran organismos de los Phyllums: basidiomicetos y ascomicetos, los podemos encontrar en la naturaleza solo como saprofitos o como parásitos y entre estos se encuentran especies que tienen importancia alimenticia, medicinal o económica (García Rollan 1976; Herrera y Ulloa, 2004); La mayoría de los hongos ligninolíticos reportados pertenecen al phylum de los basidiomicetos el cual contiene alrededor de 30 000 especies descritas en el mundo las cuales se caracterizan por producir basidiocarpos de gran diversidad morfológica y poseer en su himenio una estructura unicelular llamada basidio en la cual se llevan a cabo la cariogamia y meiosis dando la consecuente producción de basidiósporas (Sánchez-Vázquez *et al.*, 2002; Viramontes-Ramos *et al.*, 2016).

Los hongos ligninolíticos se desarrollan sobre madera a la cual descomponen para alimentarse de ella. La madera tiene tres componentes principales los cuales son: Lignina, Celulosa y Hemicelulosa; La celulosa y la hemicelulosa son polímeros de glucosa mientras que la lignina es un polímero complejo compuesto de unidades fenólicas. (García Rollan 1976; Guzmán 1985; Herrera y Ulloa, 2004). La principal función de la lignina es dar rigidez y elasticidad a la madera y estructura de los árboles. Es un polímero aromático tridimensional y amorfo que se forma por polimerización a partir de monómeros llamados monolignoles los cuales son alcoholes aromáticos unidos por enlaces éter (Fig. 2.1). Es uno de los polímeros

más complejos y difíciles de degradar que existen en la naturaleza (Arana *et al.*, 2002).

Figura 2.1 Modelo estructural de la lignina

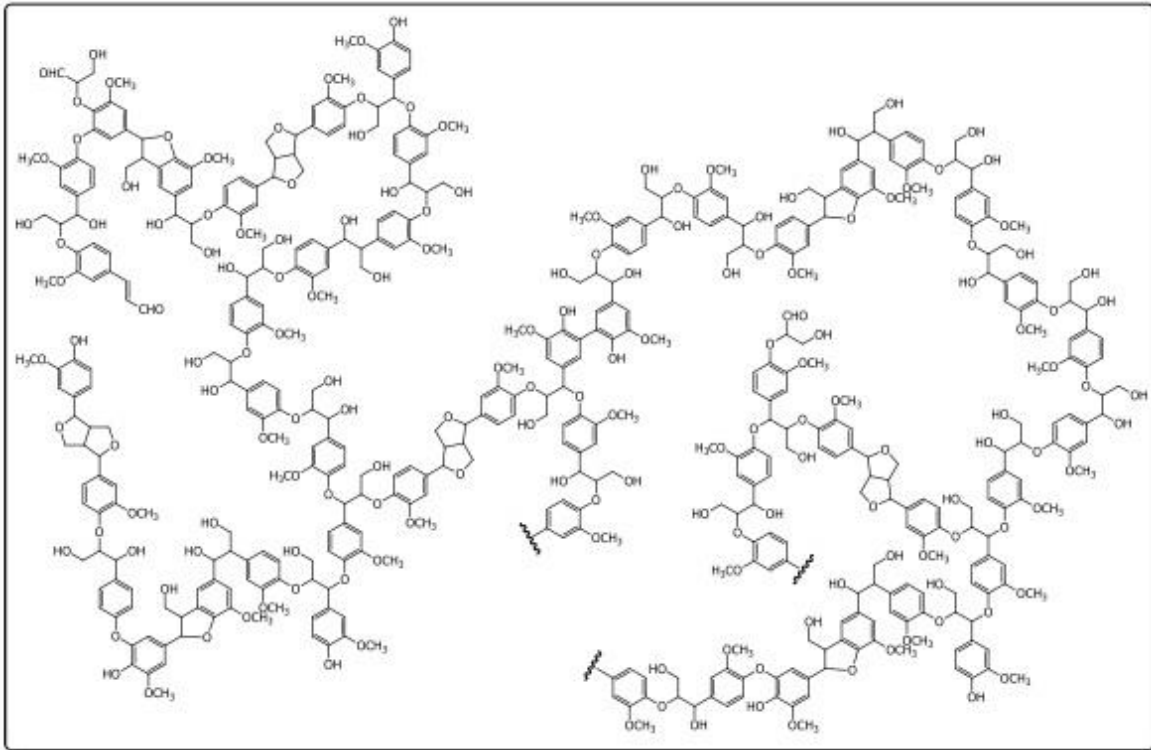


Figura 2.1 Estructura molecular de la lignina, donde se observa que es una molécula compleja formada por alcoholes aromáticos; tomado de Chávez-Sifontes, 2013.

La pudrición de la madera provocada por los hongos es benéfica en los ecosistemas ya que reintegra materia orgánica en ellos, pero a la vez puede provocar serios problemas ecológicos locales al volverse plaga de una población forestal, además genera un problema económico mundial a la industria maderera y se ha clasificado por su color y estructura aparente en tres categorías que son: podredumbre blanda, podredumbre café o parda y podredumbre blanca. La podredumbre blanda es producida principalmente por hongos ascomicetos que atacan la madera húmeda superficial, no pueden degradar lignina lo que produce un ablandamiento de la estructura alveolar de la madera. La podredumbre café es producida por hongos cuyas enzimas atacan y descomponen la celulosa formada por glucosa,

permaneciendo restos de lignina oscura, dándole un color rojizo a la madera y dejando grietas o zonas cuarteadas cubicas; a este grupo pertenecen el 7% de los hongos y dentro de estos el 70% son poliporos, comunes en coníferas caídas. La podredumbre blanca es causada por hongos que atacan la lignina o lignocelulolíticos, estos poseen enzimas fenol-oxidasas que rompen las fibras oscuras en la madera y la degradan a CO₂ y H₂O. Las hifas avanzan longitudinalmente a través de la madera o troncos en forma de fibras generando el color blanco sobre el sustrato. Durante este proceso de degradación los hongos de la pudrición blanca producen las enzimas lignino peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasas. Algunas especies de hongos pueden provocar varios tipos de pudrición (García Rollan 1976; Arana *et al.*, 2002; Stamets 2005).

De las enzimas involucradas en la degradación de la lignina son 3 grupos los más estudiados: Lignino peroxidadas (Lip) que catalizan la oxidación de compuestos aromáticos fenólicos y no fenólicos, Manganeso peroxidadas capaces de oxidar compuestos no fenólicos y fenólicos a radicales fenoxilo y por ultimo las Lacasas que son capaces de oxidar monofenoles, difenoles, polifenoles, aminofenoles y diaminas (Arana *et al.*, 2002).

2.3 Lacasa (Fenol oxidasa)

La lacasa se describió por primera vez para la planta *Rhus vernicifera* y se determinó que en plantas tiene una función de protección, posteriormente se encontró actividad de enzimas lacasas en varios hongos, su estructura se caracteriza por la presencia de 4 átomos de cobre (Cu²⁺) en su sitio activo. Las lacasas son glicoproteínas con actividad fenol oxidasa que son capaces de catalizar la oxidación de una amplia variedad de sustratos naturales o xenobióticos, esto se produce por medio de la reducción de los átomos de cobre en su sitio activo y la transferencia de electrones con la conversión del O₂ a H₂O. Se ha demostrado su capacidad oxidativa sobre difenoles, aminofenoles, polifenoles, poliaminas, compuestos fenólicos, alcoholes bencílicos y anillos aromáticos, así como su capacidad para

catalizar la polimerización, despolimerización, metilación y desmetilación. Existen hongos que generan más de un tipo de Lacasa y estas se han clasificado en 3 que son: 1) Lacasas azules que tienen 4 átomos de cobre en su sitio activo, 2) Lacasas blancas que tienen 2 átomos de hierro, 1 de zinc y 1 de cobre en su sitio activo y 3) Lacasas amarillas que se diferencian de las azules por no poseer sitios de unión a cobre tipo 1 (Fig. 2.2). En algunas especies de hongos alguna de estas Lacasas producidas necesita de un mediador para llevar a cabo su mecanismo de acción (Arana *et al.*, 2002).

Figura 2.2 Modelo 3D de Lacasa

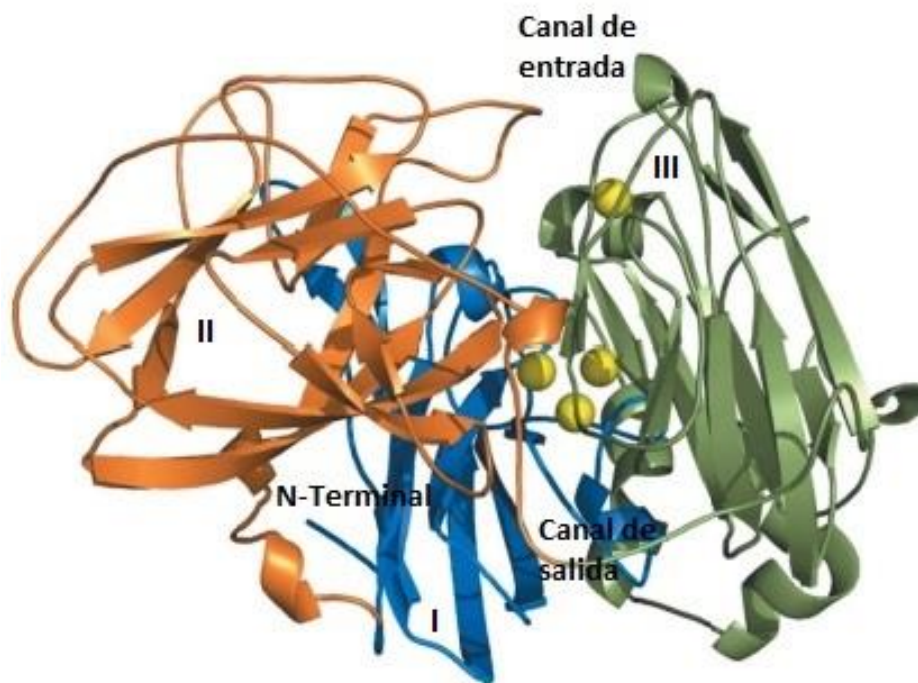


Figura 2.2 Estructura molecular de la lacasa obtenida del hongo *Cerrena maxima*. Se muestran los canales de entrada y salida, así como sitios activos representados por las esferas amarillas, también se muestran los dominios I, II y III representados en distintos colores. Tomada y modificada de Lyashenko 2006.

Los hongos ligninolíticos producen la enzima lacasa como parte importante de sus procesos fisiológicos, la producción y regulación de las lacasas varían dependiendo de la especie de hongo que la produce, así como su efecto, pudiendo ser desde la

degradación de lignina y taninos para obtener nutrientes, morfogénesis de rizomorfos, esclerocios, micorrizas o cuerpos fructíferos, en procesos de pigmentación, esporulación, humificación, fitopatogénesis y como mecanismo de defensa contra ataques químicos de plantas y otros antagonistas. (Arana *et al.*, 2002; Arambarri *et al.*, 2008).

A partir de la década de los 90's los hongos ligninolíticos y sus lacasas han sido estudiados y aplicados de diferentes formas y con diversos fines industriales, como biosensores en inmuno ensayos, en la industria del papel para biopulpeo, para ahorro de energía, bioblanqueo libre de cloro, en tratamientos de decoloración y decodificación de efluentes por colorantes textiles, en la producción de alimentos y bebidas, producción de fármacos, modificación de polímeros y en procesos de biorremediación de sitios contaminados por hidrocarburos, bifenilos policlorados e insecticidas (Sánchez-Vázquez *et al.*, 2002;2007; Arana *et al.*, 2002; Arambarri *et al.*, 2008).

El potencial de estas enzimas fúngicas como biotecnología está en su naturaleza multifuncional, ya que su actividad catalítica está asociada a un amplio espectro de procesos biológicos y tienen la capacidad para acelerar la oxidación de una gran variedad de compuestos orgánicos y compuestos xenobióticos recalcitrantes en radicales libres y otros subproductos con diferentes grados de estabilidad y reactividad. A pesar de que existen otras fenol-oxidasas, las lacasas tienen un mayor espectro de aplicación esto debido a su nula especificidad de sustrato y su rol en la degradación y mineralización de la lignina, por lo que pueden romper enlaces parecidos a los enlaces de tipo éter que se encuentran en la lignina de la madera. Dependiendo de la fuente de origen de las lacasas su potencial redox varía entre 0.45v - 0.8v (Sánchez-Vázquez *et al.*, 2002; 2007; Stamets 2005; Arambarri *et al.*, 2008).

2.4 Contaminación ambiental del agua por la industria textil en Puebla

La contaminación está ligada directamente al desarrollo urbano y crecimiento de las sociedades industriales. La ciudad de Puebla fundada en 1531 es rica en recursos hídricos debido a su ubicación geográfica, fue establecida en un valle que atraviesan 3 ríos, el río Alseseca, el río Atoyac y el río San Francisco, los cuales pertenecen a la cuenca alta del río Balsas y desembocan en el Lago de Valsequillo. Desde su establecimiento, Puebla ha sido un centro de actividad textil, siendo una de las industrias más importantes en la economía de la ciudad hasta el día de hoy, lamentablemente a partir de 1875 sumado a los desechos agrícolas y domésticos, el aumento y la incorporación de nuevas tecnologías químicas dentro de la industria textil hizo que se comenzaron a contaminar los ríos de la ciudad de manera drástica debido a que se rebasó la capacidad de auto recuperación de los sistemas hídricos. La gravedad de este problema ha ido aumentando progresivamente con los años y actualmente a lo largo de la capital poblana se han establecido diferentes parques o corredores industriales que descargan sus aguas residuales a los ríos causando diferentes niveles de anoxia en ellos, lo cual ha puesto inevitablemente a la ciudad de Puebla ante una crisis ambiental y social sin precedentes que causa daños a la salud de los ecosistemas, la biodiversidad asociada y a los habitantes de la capital poblana (Handal-Silva, 2017).

Los contaminantes son compuestos tóxicos que ponen en riesgo la salud humana y la calidad ambiental, hoy en día los niveles de contaminación que presenta el río Atoyac son alarmantes y provocan sobre la población de Puebla enfermedades que van desde afectaciones gastrointestinales hasta cáncer, está comprobada y documentada la relación entre el aumento de la contaminación ambiental con síntomas de enfermedades. La exposición del ser humano a químicos peligrosos aumenta proporcionalmente con el incremento de la contaminación en nuestro medio ambiente. La contaminación es una enfermedad ambiental que mata (Sánchez-Vázquez *et al.*, 2002; Stamets, 2005 Handal-Silva, 2017).

La industria textil es la segunda más contaminante en el mundo después de la industria del petróleo, sus principales impactos sobre el medio ambiente son su alto consumo de recursos hídricos que es entre 5 y 20 % del agua disponible en las ciudades y sus efluentes con alta carga de contaminantes químicos, los cuales dependerán de la planta textil y del tipo de fibras y procesos que utilicen. Se prevé que para el 2050 la población humana habrá crecido al doble y con ella su demanda de productos textiles, lo que duplicará el volumen de las aguas residuales existentes, por lo que es necesario mejorar e innovar los tratamientos de depuración de estos efluentes (Brañez-Sánchez *et al.*, 2018)

De las 700 000 toneladas de colorantes que se producen anualmente, la industria textil es la que más los utiliza y consume a nivel mundial. Estos colorantes se pueden clasificar en base a su estructura química o en base a su uso en la industria, en base a su estructura se diferencian por el grupo cromóforo que contienen y podemos encontrarlos en 7 grupos o familias: Azoicos, Antraquinonas, Ftalocianina, Ion arilcarbonio, Sulfuro, Polimetino y Nitro. Los colorantes Azoicos son los más comunes en la industria textil ocupando el 70% del total de estos y destacan por contener enlaces dobles de átomos de nitrógeno o enlaces tipo “Azo” en su estructura (Fig. 2.3), algunos de estos colorantes son cancerígenos y mutagénicos (Zaruma-Arias *et al.*, 2018).

Figura 2.3 Cromóforo tipo Azo

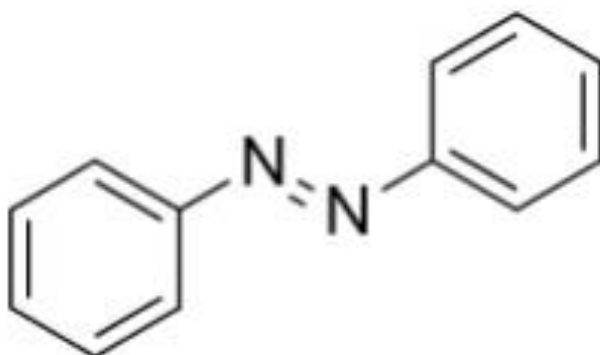


Figura 2.3. Grupo cromóforo de un colorante de tipo azoico en donde se muestra su doble enlace por átomos de nitrógeno. Tomada de Zaruma-Arias, 2018.

Los colorantes usados en la industria textil son solubles en agua y estos se consideran recalcitrantes ya que no son biodegradables, por lo tanto, la industria textil es una de las mayores contaminadoras de cuerpos de agua en el mundo, ya que se ha reportado que hasta el 50% de los colorantes utilizados por esta industria terminan en cauces de ríos al final del proceso de producción. Estos desechos líquidos son descargados a los ríos y canales conteniendo los colorantes y otros compuestos químicos sin un correcto tratamiento. La descarga de estos hacia los cuerpos de agua superficiales y subterráneos provoca un alto grado de contaminación y anoxia sobre los mismos, por lo que este tipo de desechos son muy difíciles de tratar y remover. Por esta razón los efluentes de residuos textiles deben de ser tratados adecuadamente antes de ser descargados a los ecosistemas acuáticos, con el fin de reducir los impactos provocados por los mismos hacia los hábitats y sus especies. Actualmente se han encontrado maneras y condiciones para degradar estos desechos y para mitigar este problema, se han desarrollado diferentes tecnologías entre las que destacan los Procesos de Oxidación Avanzada (POAs) que consisten en la oxidación química bajo presión y temperatura de estos contaminantes y el uso de microorganismos como bacterias y hongos en los cuales se utilizan sus metabolitos, enzimas, o la aplicación directa del organismo para la degradación y transformación de estos contaminantes. La biorremediación es una tecnología que permite recuperar zonas contaminadas al aplicar sobre ellas organismos o sus derivados y de esta manera disminuir el impacto de los contaminantes sobre el medio ambiente. Esta biotecnología no se ha implementado en México debido a varios factores legales y biológicos (Stamets 2005; Mouso 2007; Sánchez-Vázquez *et al.*, 2007; Zaruma-Arias *et al.*, 2018).

2.5 Biorremediación y contaminantes

La Micorremediación es una técnica de biorremediación que se basa en el uso de hongos o sus derivados para degradar o remover toxinas del medio ambiente. Esto debido a que los hongos y sus enzimas tienen la capacidad para descomponer y desnaturalizar compuestos tóxicos de cadenas largas y así convertirlos a moléculas

más simples y menos tóxicas, así mismo el micelio también tiene la capacidad para absorber y adsorber diferentes sustancias y metales pesados. El micelio puede degradar y destruir ciertos componentes tóxicos antes de que entren en la cadena trófica y por lo tanto dentro de nuestra dieta diaria. Los costos económicos implicados en procesos de Micorremediación son menores a cualquier otro método conocido (Stamets, 2005).

Diversas especies de hongos silvestres ligninolíticos de los géneros *Stereum*, *Phanerochaete*, *Trametes*, *Bjerkandera* y *Pleurotus* entre otros, han sido estudiados en procesos de biorremediación o micorremediación y han demostrado un gran potencial en la degradación de compuestos recalcitrantes entre los que están: colorantes textiles, fertilizantes, insecticidas como el endosulfan, antraceno, petróleo, hidrocarburos aromáticos policíclicos, pentaclorofenol, bifenilos policlorados, insecticidas, fármacos e incluso en procesos de filtración biológica del agua. El micelio de hongos ligninolíticos expuesto a efluentes con colorantes enriquece su producción de enzimas lacasas, desnaturalizando los colorantes tóxicos (Sánchez-Vázquez *et al.*, 2002; 2007; Stamets 2005; Mouso 2007; Arambarri *et al.*, 2008).

El hongo *Pleurotus ostreatus* ha sido ampliamente estudiado en procesos de Biorremediación para eliminar diversos tipos de contaminantes demostrando resultados positivos en todos los casos. El hongo ostra es una especie vanguardia en los estudios y casos de biorremediación, por este motivo ha sido elegido como organismo control dentro de este estudio. (Stamets 2005; Sánchez-Vázquez *et al.*, 2007).

Algunas especies de hongos de la podredumbre blanca tienen dificultad para colonizar suelos a causa de su dependencia a colonizar materiales maderables, lo que indica que no todos ellos son aplicables a procesos de tratamiento de suelos. Existen especies de diversas especies no asociadas a la madera que también

producen lacasas, por lo tanto, este tipo de especies son una fuente potencial de lacasas con fines biotecnológicos (Arambarri *et al.*, 2008).

Los hongos del género *Psilocybe* pueden ser candidatos para la biorremediación de suelos contaminados por pesticidas, herbicidas y otras toxinas industriales compuestas de órgano fosfatos (Stamets, 2005). Elegimos el hongo *Psilocybe cubensis* por su habilidad para crecer en suelos altamente nitrogenados y a su vez por su capacidad para degradar la celulosa y lignina residual de las heces de rumiantes. El hongo *Psilocybe yungensis* fue elegido por ser un hongo de la podredumbre blanca que crece sobre madera muerta. (Guzmán, 1980; Barahona-Rosales y Sánchez-Pinzón, 2005; Stamets, 2005).

Aplicar microbiota nativa en procesos de biorremediación tiene numerosas ventajas, entre ellas, que los organismos están adaptados a las condiciones ambientales en las que serán aplicados (temperatura, altitud, medio ambiente, pH, etc.) por lo tanto, es probable que tengan mayor éxito para degradar contaminantes en el sustrato elegido, y en caso de escape accidental del inóculo, existen antagonistas en el ambiente que mantendrán controlada su población y evitaran que se vuelva una plaga. México se encuentra entre los países que cuentan con mayor biodiversidad en el mundo, por lo cual es de esperarse que existan especies y cepas fúngicas cuyos perfiles enzimáticos aún no hayan sido estudiados y sean potencialmente exitosos en estos procesos de biorremediación (Castillo-Ávila, 2010).

Además de la escasa presencia de estudios de este tipo. Se considera que el aislamiento e investigación de la microbiota nativa es una herramienta biotecnológica prometedora para ayudar a enfrentar problemas ambientales actuales y una actividad prioritaria ante la pérdida de biodiversidad que estamos enfrentando en esta época llamada Antropoceno (Chan *et al.*, 2016).

Unos de los contaminantes más comunes en los cuerpos de agua en la ciudad de Puebla son los colorantes azoicos utilizados en la industria textil. En Puebla este

problema es bastante grave ya que repercute sobre los ecosistemas sus especies y las poblaciones humanas, por lo que es necesario diagnosticar nuevas formas económicas para disminuir y mitigar el efecto que tienen estos contaminantes sobre el medio ambiente y la salud humana, por lo tanto, se propone el estudio de la micobiota nativa y el uso de sus enzimas para el tratamiento y mitigación de los problemas ambientales y de salud pública provocados por los colorantes de tipo azoico utilizados en la industria textil.

3 OBJETIVOS E HIPOTESIS

3.1 Objetivo general:

- Determinar el potencial de degradación de colorantes tipo Azoico por los hongos de la podredumbre blanca *Pleurotus ostreatus*, *Psilocybe cubensis* y *Psilocybe yungensis*, para su evaluación en procesos de biorremediación del colorante Violeta 51.

3.2 Objetivos específicos:

- Aislar y purificar el micelio de los hongos experimentales
- Determinar cualitativamente la presencia de enzima lacasa en las especies seleccionadas en medios de cultivo sólido con los colorantes azoicos azul turqués 86, rojo 23 y violeta 51 en cultivo sólido.
- Determinar cuantitativamente la capacidad de las cepas y sus enzimas para la degradación del colorante azoico violeta 51 en cultivo líquido.
- Comparar la capacidad de degradación del colorante azoico violeta 51 en medio líquido con micelio activado y enzimas generadas de las distintas cepas mediante un ANOVA.

3.3 Hipótesis

- Los hongos *Pleurotus ostreatus*, *Psilocybe cubensis* y *Psilocybe yungensis* tienen la propiedad de generar lacasas que degradan el colorante textil violeta 51 de manera eficiente.

4 Material y métodos

4.1 Especies estudiadas

Las especies descritas a continuación fueron las seleccionadas para este experimento y se colectaron en diferentes sitios que se muestran en la tabla 1.

Figura 4.1 *Pleurotus ostreatus* P. Kumm, 1871



Figura 4.1 Basidioma de *Pleurotus ostreatus* proveniente de la cepa "G" CICA-ICUAP.

Pleurotus ostreatus: sombrero o píleo liso, convexo, semicircular, raramente redondo, casi siempre en forma de ostra o concha. Pueden medir entre 5 y 25 cm de diámetro. Puede presentar escamas hacia el centro del píleo o en la base del estípite. Su color varía entre el blanco, el amarillo cremoso, gris y café pardo, dependiendo de la variedad y las condiciones climáticas o de cultivo. Sus laminas son decurrentes, anastomosadas en la base, anchas, blancas y algunas veces amarillentas. El estípite es blanco, corto, excéntrico o lateral engrosado gradualmente hacia el píleo, generalmente mide 2-5 cm de largo por 1-3 cm de grosor y algunas veces no se presenta. Carne blanca, gruesa, blanda, con olor y sabor agradables. Las esporas en masa son de color blanco o crema, tienen forma

elipsoide con una talla promedio de 8-11 x 3-5 μm . Se les encuentra creciendo en conjunto, sobre troncos tirados o sobre árboles como *Ipomoea arborescens* en zonas tropicales, subtropicales, bosques de pino y encino (García-Rollan 1976; Guzmán 1980; Pacioni 1982; Sánchez-Vázquez *et al.*, 2002). Es la tercera especie de hongo más cultivada en el mundo después del champiñón (*Agaricus bisporus*) y el shiitake (*Lentinula edodes*) y su importancia social, económica y ecológica sigue en aumento por sus propiedades nutricionales, medicinales, como reciclador de desechos agroindustriales y como biorremediador en distintos casos. En México se le conoce tradicionalmente con los nombres de: seta u oreja de cazahuate (Sánchez-Vázquez *et al.*, 2007; Esparza-Martínez *et al.*, 2011). (Fig. 4.1).

Figura 4.2 *Psilocybe cubensis* Singer 1948



Figura 4.2 Basidioma del hongo *Psilocybe cubensis* sobre su sustrato y hábitat natural.

Psilocybe cubensis: sombrero o píleo de 1.5 - 8 cm de diámetro, con forma cónica en etapa juvenil, subcampanulado a casi plano en edad avanzada. Píleo con pequeñas escamas blancas aplanadas en sus fases primordiales, liso en la madurez, algo viscoso en presencia de humedad, liso y satinado cuando el ambiente es seco, de color amarillento dorado como la paja o café dorado, pierde el color gradualmente hacia el exterior terminando con el borde blanco, su color es

más oscuro cuando aún es primordio. Láminas adnatas a adnexas de color café violáceo, apretadas. Pie liso entre 4-15 cm de largo por 0.5 - 2 cm de ancho, color blanco-crema satinado con un anillo membranoso colgando sobre la parte superior del mismo color de las láminas a negro. Esporas de forma subelíptica, color café púrpura oscuro a café violáceo, de 11.5 - 17 x 8 - 11 μm . La carne de estos hongos es blanca y se mancha rápidamente de azul cian al maltratarse. Con olor y sabor característicos a harina fermentada. No presenta leche ni látex. Crecen solos o de forma gregaria sobre estiércol de vaca, caballos, búfalos y elefantes o en suelos bien abonados durante primavera, verano y otoño en zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo. En México se le conoce comúnmente por el nombre de San Isidro, se cree que fue utilizado en tiempos prehispánicos dentro de ceremonias religiosas al igual que *P. zapotecorum* y otros hongos del género, es el hongo más llamativo y fácil de identificar dentro del género *Psilocybe*, además de ser el más estudiado en estudios médicos por cantidad de psilocibina y su facilidad de cultivo, que se ha estudiado desde hace décadas y que últimamente ha recobrado importancia (Guzmán 1980; Stamets & Chilton, 1983; Stamets 1996; Nicholas y Ogamé, 2006; Serrano-hurtado, 2009). (Fig. 4.2).

Figura 4.3 *Psilocybe yungensis* Singer & A.H. 1958



Figura 4.3 Basidioma del hongo *Psilocybe yungensis* creciendo sobre madera muerta en su hábitat natural.

Psilocybe yungensis: Sombrero o píleo de 0.5 a 2.5 cm de diámetro, de cónico a campanulado en la madurez, ligeramente mamelonado, superficie suave, viscosa, ligeramente transparente y estriada cuando se humedece, margen irregular y liso cutícula no separable, de color café claro a café naranja o café rojizo, cambia de color con el grado de humedad, siendo color paja cuando está seco. La carne se pinta de color azul al ser lastimada y de color negro al deshidratarse. Láminas de adnatas a adnexas, muy abundantes, grisáceas al principio y café violeta cuando esporula, con los bordes pálidos, casi del color de la lámina. Estípite central, cilíndrico de 2.5 a 6 cm de largo, de 1.5 a 2.5 mm de diámetro desde la base al píleo. Superficie cubierta por una capa de densas fibras o pelillos blancos, de color café pálido en la parte superior y café rojizo a café oscuro en la base, hueco con carne que azulea al ser lastimada y bastante quebradizo. Velo parcial en forma de cortina que desaparece con la madurez dejando fibrillas blancas a lo largo del margen del píleo y escasos remanentes en la parte superior del estípite. Esporada de color café purpura oscuro. Esporas de forma romboide, subromboide a subelipsoide, de 4.4-7 x 4-6 micras. Pleurocistidios 14-25 x 4.4-10.5 micras, venticoso por la base y mucronado en el apéndice. Queilocistidios 14-33 x 4.4-7.7 micras con forma variable de ventricosa a clavada a estrangulada. Esta especie se encuentra creciendo en los meses de Junio y Julio de forma gregaria o en racimos sobre troncos caídos o madera podrida y tocones, dentro de zonas cafetaleras y bosques subtropicales de los 1000-2000 msnm. Se distribuye desde Colombia, Bolivia y Ecuador hasta el norte de México, aunque probablemente su distribución sea más amplia. Su psicoactividad es moderada, aunque no hay estudios disponibles. Localmente se le conoce como hongo de la adivinación u hongo genio (Guzmán 1980; Stamets 1996). (Fig. 4.3).

Tabla 1. Municipios y localidades de los sitios de colecta de los macromicetos estudiados				
Especie	Municipio	Localidad	Sustrato	Coordenadas
<i>P. Ostreatus "G"</i>	Puebla, Puebla	CICA	Paja	19.005530, - 98.205334
<i>P. cubensis</i>	Huautla de Jiménez, Oaxaca	Barrio del fortín	Heces de vaca	18.122084, - 96.820569
<i>P. yungensis</i>	Cuetzalan, Puebla.	Cascada "La gloria "Apulco.	Madera muerta	19.900103, - 97.617551

4.2 Modelo de estudio y análisis experimental

4.2.1 Etapa I: Colecta, aislamiento y evaluación cualitativa de las cepas.

Aislamiento y condiciones de cultivo

Los hongos fueron colectados en diversos sitios y sembrados in situ, las siembras se realizaron con ayuda de una caja de guantes o de mecheros para aislar el ambiente (Fig. 4.4), además de bisturí, agujas de disección y Lysol, antes del aislamiento de tejido los hongos se esterilizaron con hipoclorito de sodio al 3%, alcohol etílico al 70% y agua destilada estéril, se cortaron pequeñas porciones del centro o carne de cada cuerpo fructífero que no había sido expuesta al ambiente con anterioridad e inmediatamente fueron depositados en placas Petri de 6 mm con medio sólido PDA -MCDLAB (Fig. 4.5), previamente preparado en laboratorio. Una vez sembradas las placas, se sellaron y empaquetaron para su posterior traslado al Departamento de Investigación en Ciencias Agrícolas para la correcta resiembra y purificación de cepas a los 4 días de haber sido colectados y aislados. Los cultivos obtenidos de la purificación de cepas se incubaron a temperatura ambiente por 10 días para permitir el crecimiento y maduración del micelio. Las especies colectadas fueron: *Psilocybe cubensis* (Huautla de Jiménez, Oaxaca), *Psilocybe yungensis* (Cuetzalan, Puebla), ambas fueron correctamente identificadas previo a su aislamiento mediante claves taxonómicas (Tabla 2). (Guzmán 1980; Stamets 1996).

Figura 4.4 Aislamiento de macromicetos

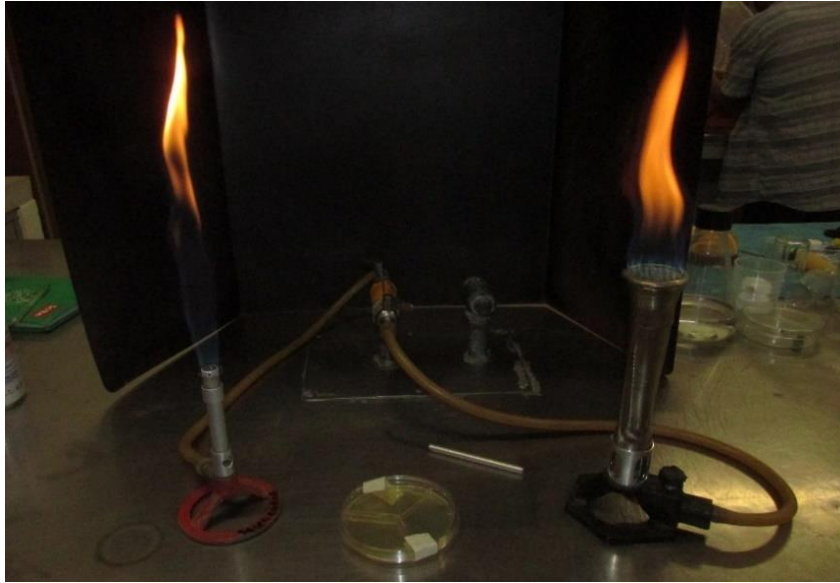


Figura 4.4 Materiales utilizados para el correcto aislamiento de los hongos.

Figura 4.5 PDA-MCD LAB

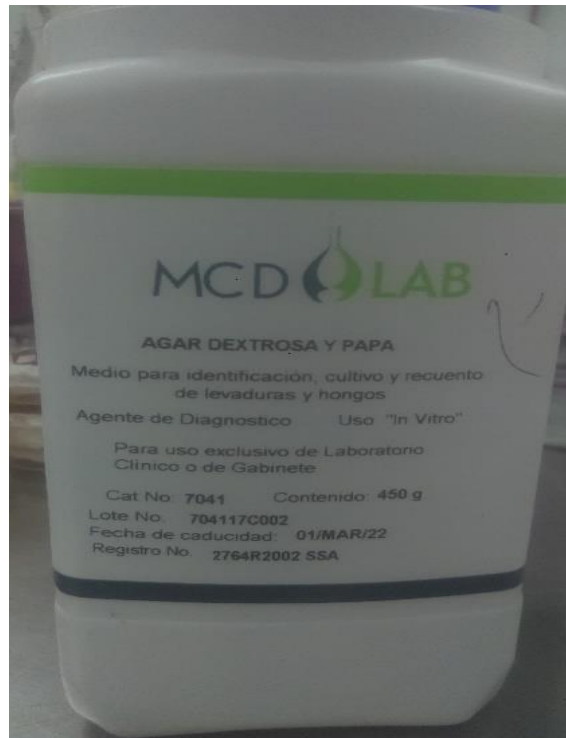


Figura 4.5 Medio solido PDA-MCD LAB utilizado para las siembras en placa Petri.

Tabla 2. Sistemática de las especies estudiadas			
Reino	Fungí	Fungí	Fungí
Phyllum	Basidiomycota	Basidiomycota	Basidiomycota
Clase	Agaricomycetes	Agaricomycetes	Agaricomycetes
Orden	Agaricales	Agaricales	Agaricales
Familia	Pleurotaceae	Strophariaceae	Strophariaceae
Genero	Pleurotus	Psilocybe	Psilocybe
Especie	<i>P. Ostreatus</i>	<i>P. cubensis</i>	<i>P. yungensis</i>

Pruebas cualitativas

Se realizaron pruebas cualitativas para determinar la presencia y actividad de la enzima lacasa, se tomaron inóculos de las siembras previamente incubadas y purificadas en medio sólido PDA y se colocaron sobre nuevas placas Petri de 3 divisiones con PDA a 30 ppm de los colorantes azul turquesa 86, rojo 23 y violeta 51. Se utilizaron 2 cajas Petri de 3 divisiones por especie para la prueba cualitativa y se colocó un color y un punto de micelio por división para inocularlas. Las placas sembradas se mantuvieron 10 días a temperatura ambiente para poder observar el crecimiento de los hongos y la degradación de los colorantes, comprobando la actividad de la enzima lacasa mediante observaciones diarias del diámetro del halo que presentaba cambios en la coloración del medio de cultivo conforme el hongo se iba desarrollando (Fig. 4.6).

Figura 4.6 Medios de cultivo

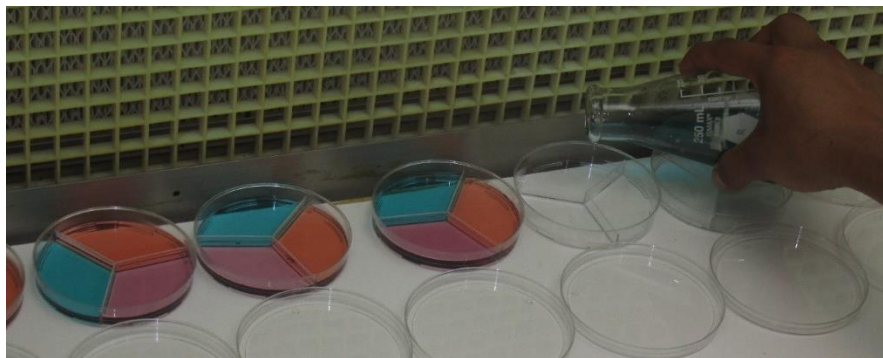


Figura 4.6 Placas Petri de 3 divisiones con medio solido con los colorantes Azul turquesa 86, Rojo 23 y Violeta 51 a 30 ppm, para inocular las cepas seleccionadas.

4.2.2 Etapa II: Generación de micelio activado en medio Kirk

En total se prepararon 24 matraces en 2 rondas de 4 repeticiones por especie, cada uno conteniendo 100 ml de medio Kirk modificado adicionado con all-bran, se inoculó cada matraz con 3 discos de micelio de 1 cm aproximadamente provenientes de placas Petri colonizadas y purificadas previamente, se mantuvieron a temperatura ambiente para observar su desarrollo y maduración por 10 días (Fig. 4.7). La velocidad del crecimiento micelial dentro de los matraces vario entre las distintas especies evaluadas. Se consideró el día 10 como optimo en el desarrollo de todas las cepas para el experimento realizado.

Figura 4.7 Micelio activado

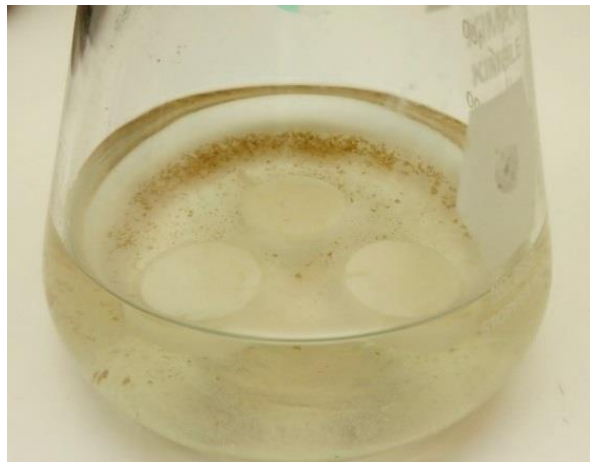


Figura 4.7 Inoculación de discos miceliales en matraz con medio Kirk modificado.

4.2.3 Etapa III: Contacto del micelio activado con el colorante y Pruebas cuantitativas de su degradación

Una vez cumplido el tiempo de maduración de 10 días dentro de los matraces con medio Kirk modificado se realizó un intercambio del primer medio Kirk modificado por uno nuevo de las mismas proporciones al cual se le agrego colorante Violeta 51 a 100 ppm regulado a pH=6. No hubo alteraciones en la masa fúngica del Micelio a la hora de realizar el intercambio (Fig. 4.8). A partir del momento en que se hizo el intercambio por el colorante se comenzó con la extracción de alícuotas de 1ml cada

24 horas durante 5 días, se extrajeron en campana de flujo laminar para mantener los matraces estériles y se filtraron con un tamiz para evitar el paso de partículas que pudieran alterar los resultados de absorbancia. Para poder medir la absorbancia se utilizó un espectrofotómetro JENWAY-6320D calibrado a 520 nm (Fig. 4.9). Se realizó una curva de calibración con Kirk y colorante Violeta 51 a 100 ppm (pH=6) esterilizado para poder comparar el comportamiento del colorante en presencia de las enzimas (Figura 4.10).

Figura 4.8 Intercambio de medios líquidos



Figura 4.8 Masa fúngica inalterada en 100 ml de medio líquido Kirk con colorante violeta 51 a 100 ppm (Día 0).

Figura 4.9 y 4.10 Materiales para espectrofotometría

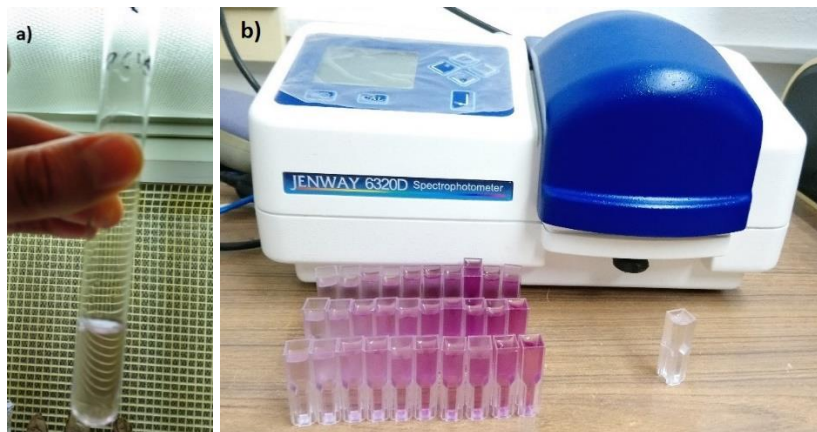
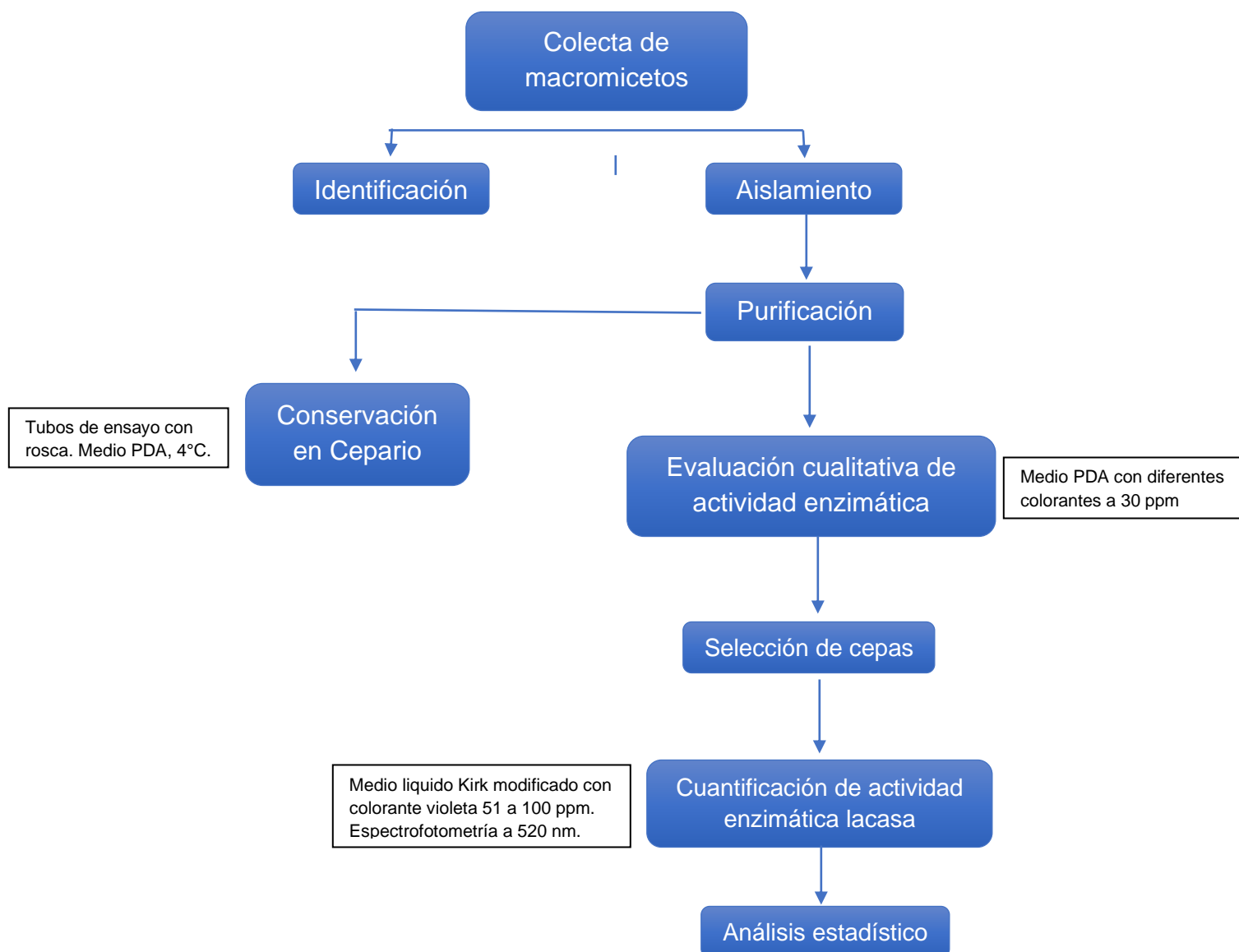


Figura 4.9 a) Alícuotas obtenidas de los matraces. Figura 4.10 b) espectrofotómetro a 520 nm. y alícuotas con colorante a diferente ppm, utilizados para la curva de calibración.

4.2.4 Etapa IV: Análisis estadístico

Se realizaron pruebas de normalidad para comprobar la normalidad de los datos, así mismo se generaron cajas de bigotes para ver sus medias e histogramas para ver el comportamiento del colorante en presencia del micelio activado. Se realizó un ANOVA con el programa SAS para comparar los resultados del experimento y ver si existen diferencias significativas en la degradación de colorantes por parte las especies estudiadas.

4.3 Diagrama experimental



5 RESULTADOS

5.1 Aislamiento y purificación del micelio de los hongos experimentales

Los hongos colectados, identificados y aislados en campo se lograron cultivar en placas Petri por especie, estas a su vez fueron resembradas y purificadas en más placas (Fig. 5.1, 5.2 y 5.3), para posteriormente realizar una siembra en tubos de ensayo con tapa, los cuales contienen medio solido PDA para la correcta conservación y mantenimiento de las cepas a 4°C dentro del Cepario del laboratorio de biotecnología DICA-ICUAP.

Figuras 5.1, 5.2 y 5.3 Proceso de aislamiento y purificación de cepas

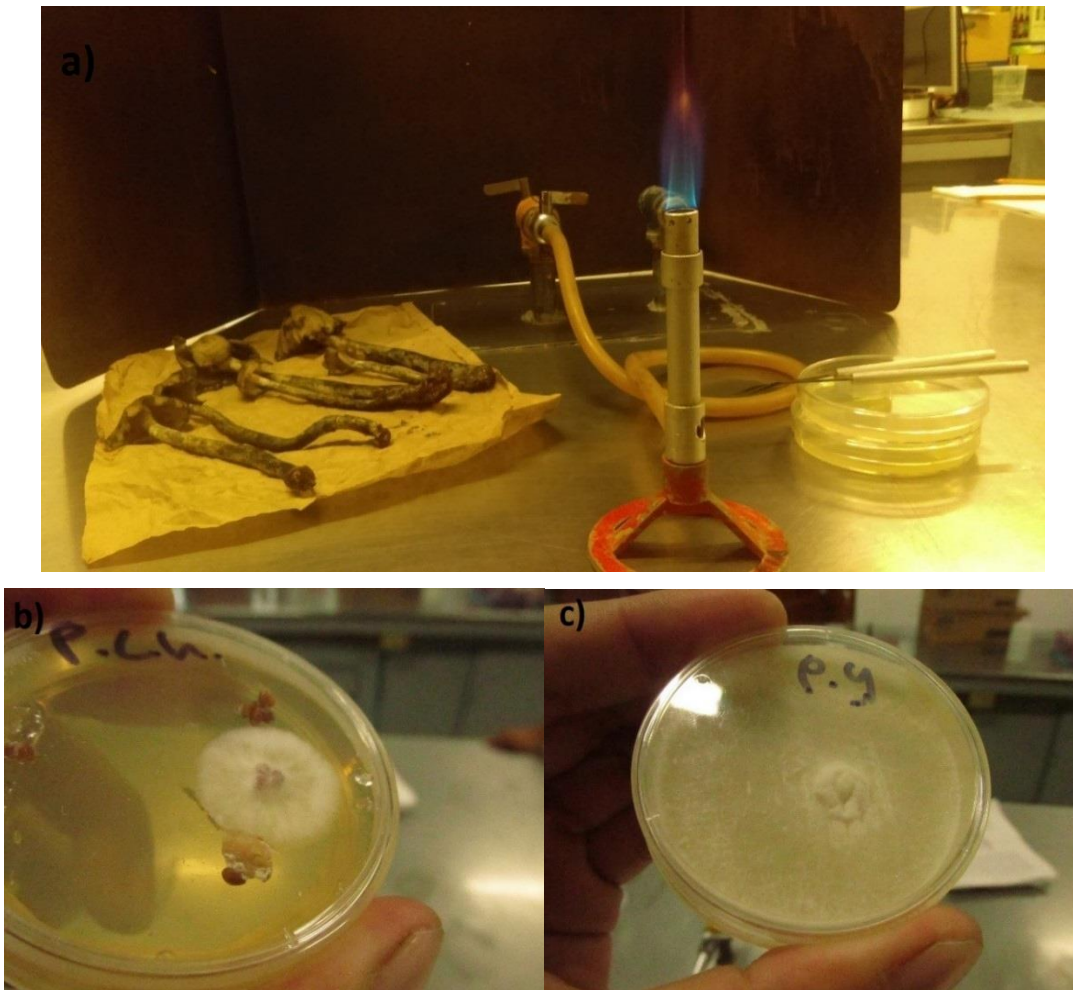


Figura 5.1 a) Proceso de aislamiento y purificación de cultivos. Figura 5.2 b) *Psilocybe cubensis* aislado en medio PDA. Figura 5.3 c) *Psilocybe yungensis* aislado en PDA.

5.2 Determinación cualitativa de la presencia de enzima lacasa en las especies cultivadas en medio sólido PDA con los colorantes azoicos azul turquesa 86, rojo 23 y violeta 51.

Se evaluaron de manera cualitativa las actividades enzimáticas de los hongos aislados en laboratorio, para poder determinar la actividad enzimática de forma correcta, los hongos fueron cultivados en medio sólido PDA adicionado con los colorantes azul turquesa 86, rojo 23 y violeta 51 a 30 ppm cada uno, se utilizaron placas Petri con 3 divisiones para poder separar y comparar los 3 colores por especie de manera eficiente, el micelio se desarrolló por 72 horas a temperatura ambiente y se logró determinar la presencia y actividad de enzimas lacasas en las especies fúngicas aisladas de campo así como en *P. ostreatus* (Fig. 5.4). Las especies estudiadas demostraron la habilidad para desarrollarse sobre todos los colorantes y diferentes capacidades para la degradación de los mismos (Fig. 5.5), se seleccionaron las cepas con mayor actividad lacasa en base al diámetro y crecimiento del halo de decoloración que se presentaron en los medios de cultivos, los halos de decoloración fueron más grandes en el color rojo congo 23 y los más pequeños en Azul 86, mientras que los halos mostrados en la degradación del colorante violeta 51 fueron moderados (Fig. 5.6). Las cepas seleccionadas por especie fueron tomadas de las placas Petri con el halo de degradación más grande registrado para el colorante Violeta 51.

Figura 5.4 Prueba cualitativa

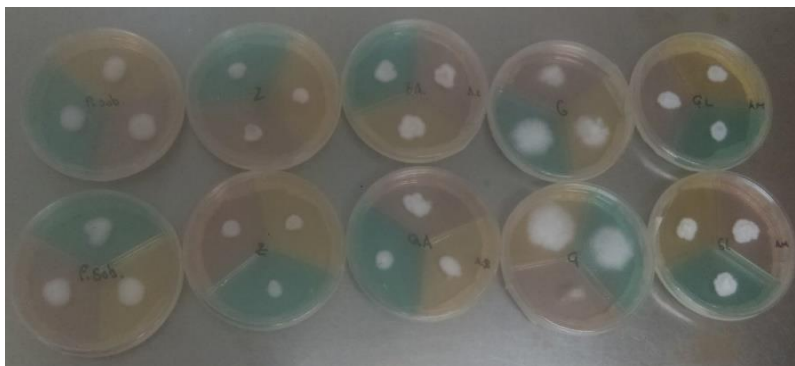


Figura 5.4 Placas Petri con medio sólido PDA y los colorantes Azul turquesa 86, Rojo 23 y Violeta 51 a 30 ppm, inoculados con las cepas seleccionadas después de 72 horas.

Figura 5.5 HPB desarrollándose en contaminante

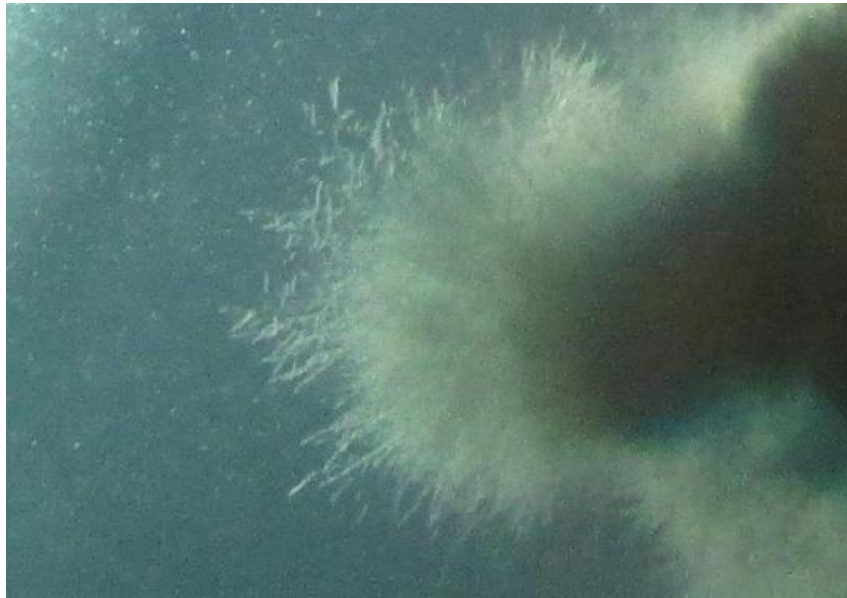


Figura 5.5 Hifas del hongo *Psilocybe cubensis* desarrollándose sobre medio de cultivo PDA con colorante azul turquesa 86.

Figura 5.6 Halo de decoloración causado por el micelio

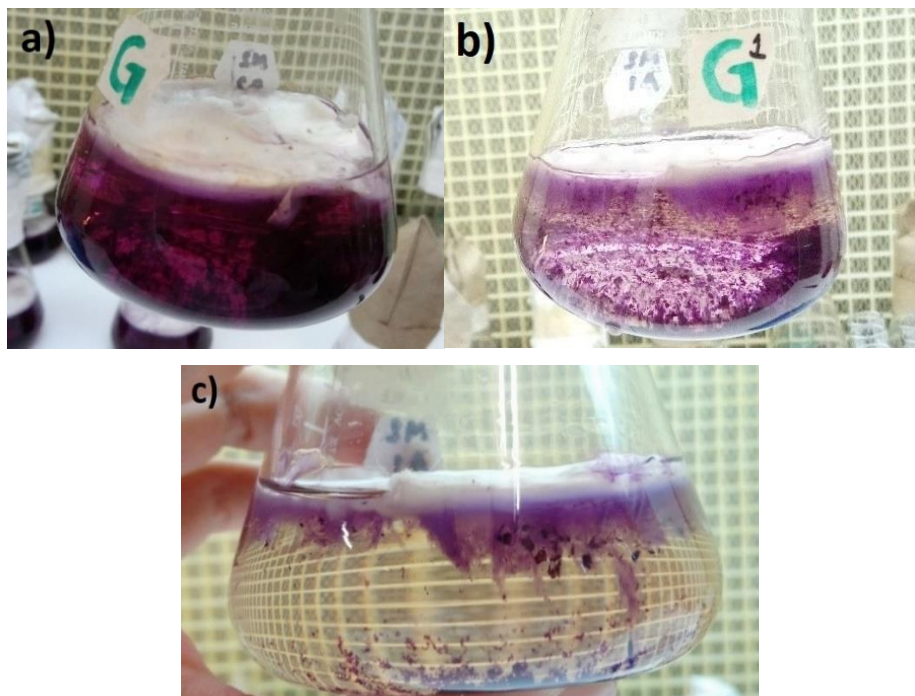


Figura 5.6 Cambios en el diámetro del halo que presenta el colorante en el medio de cultivo PDA, la línea amarilla marca el límite de crecimiento del micelio de la cepa seleccionada y la línea roja muestra el halo marcado por la degradación enzimática del colorante rojo 23 en el medio sólido. Este cambio en la coloración representa la actividad y presencia de lacasas en el sistema enzimático del hongo.

5.3 Determinación cuantitativa de la capacidad de las cepas seleccionadas y sus enzimas para la degradación del colorante azoico violeta 51 en medios de cultivo líquido.

Una vez que se confirmó la presencia de enzimas lacasas mediante las pruebas cualitativas realizadas en las cajas Petri se procedió a evaluar cuantitativamente la capacidad enzimática de las especies seleccionadas mediante la degradación del colorante Violeta 51 bajo condiciones de cultivo líquido, para este experimento se evaluaron 24 matraces con micelio activado en 100 ml del medio propuesto por Kirk modificado y adicionado a 100 ppm con el colorante. Bajo las condiciones del experimento, las tres especies utilizadas en el experimento mostraron una degradación del colorante a partir de las primeras 24 horas, mostrando una disminución considerable de la turbidez en los cultivos líquidos a las 72 horas del contacto con el micelio activado y una disminución casi total a las 120 horas (Fig. 5.7, 5.8 y 5.9).

Figuras 5.7, 5.8 y 5.9 Biodegradación del colorante Violeta 51



Figuras 5.7, 5.8 y 5.9 Proceso de biodegradación del colorante violeta 51. a) 24 horas, b) 72 horas, c) 120 horas.

El análisis y medición de la degradación de colorantes por los Hongos de la Pudrición Blanca cultivados en medios líquidos requiere de la cuantificación del colorante por métodos espectrofotométricos, por lo que en este estudio se analizaron alícuotas provenientes de los 32 matraces con un espectrofotómetro JENWAY-6320D. La longitud de onda utilizada para las lecturas fue de 520 nm que es la correspondiente al color violeta que fue el utilizado para este experimento. Se realizó una curva de calibración con medio Kirk y colorante Violeta 51 a 100 ppm (pH=6) esterilizado para poder comparar el comportamiento del colorante en presencia de las enzimas de las especies fúngicas (Fig. 5.10).

Figura 5.10 Curva de calibración

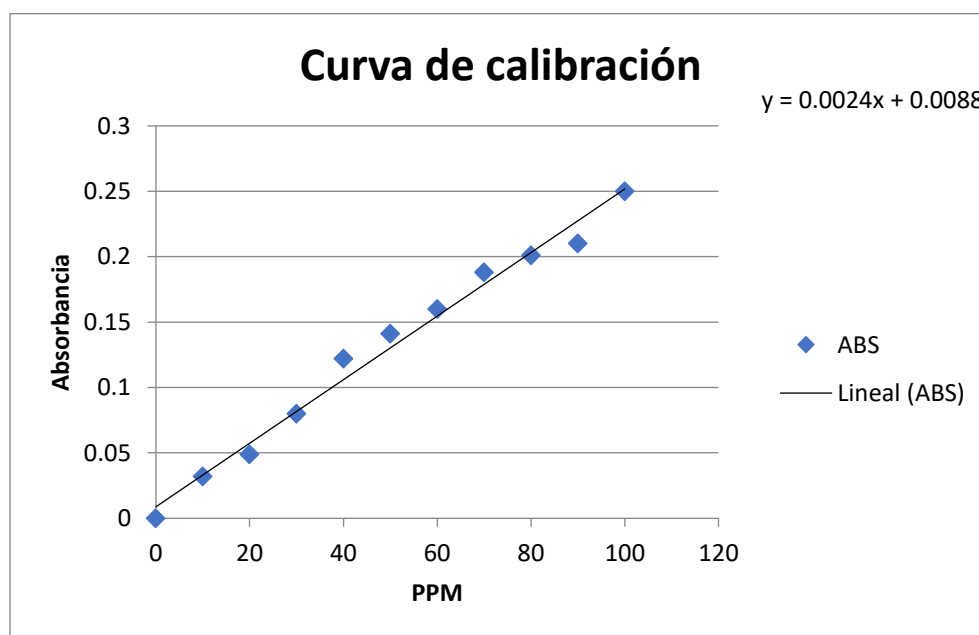


Figura 5.10 Curva de calibración con medio Kirk y colorante Violeta 51 a 100 ppm (pH=6) esterilizado.

La absorbancia inicial del colorante violeta 51 marcada por el espectrofotómetro JENWAY-6320D en todos los medios líquidos fue de 0.24 siendo esto el equivalente a 100 ppm como se puede observar en la Fig. 5.10. A las 24 horas del contacto del micelio activado con el colorante violeta 51, las especies *Pleurotus ostreatus*, *Psilocybe cubensis* y *Psilocybe yungensis*, ya habían logrado un porcentaje de

degradación inicial del colorante mostrando una absorbancia de 0.074, 0.064 y 0.142 respectivamente. Se registraron fluctuaciones en las concentraciones del colorante violeta 51 para las especies *Pleurotus ostreatus* y *Psilocybe cubensis* durante la toma de datos. La tasa máxima de degradación para las tres especies se registró a las 120 horas, registrando los siguientes valores de absorbancia: *Pleurotus ostreatus* = 0.007, *Psilocybe cubensis* = 0.014 y *Psilocybe yungensis* = 0.025. Los valores registrados por el espectrofotómetro fueron transformados a las PPM correspondientes a las absorbancias obtenidas y se pueden corroborar en la siguiente tabla.

Tabla 3. Valores de absorbancia y ppm registrados cada 24 horas para las especies <i>Pleurotus ostreatus</i>, <i>Psilocybe cubensis</i> y <i>Psilocybe yungensis</i>.			
Especie	Tiempo	Absorbancia	PPM
<i>P. ostreatus</i>	24 hrs	0.074	30.83
<i>P. ostreatus</i>	48 hrs	0.039	16.25
<i>P. ostreatus</i>	72 hrs	0.021	8.75
<i>P. ostreatus</i>	96 hrs	0.033	13.75
<i>P. ostreatus</i>	120 hrs	0.007	2.91
<i>P. cubensis</i>	24 hrs	0.064	26.66
<i>P. cubensis</i>	48 hrs	0.026	10.83
<i>P. cubensis</i>	72 hrs	0.044	20.41
<i>P. cubensis</i>	96 hrs	0.035	14.58
<i>P. cubensis</i>	120 hrs	0.014	5.83
<i>P. yungensis</i>	24 hrs	0.142	59.16
<i>P. yungensis</i>	48 hrs	0.083	34.58
<i>P. yungensis</i>	72 hrs	0.054	22.5
<i>P. yungensis</i>	96 hrs	0.049	20.41
<i>P. yungensis</i>	120 hrs	0.025	15

5.4 Comparación de la capacidad de degradación del colorante azoico violeta 51 en medio líquido con micelio activado y enzimas generadas de las distintas cepas mediante un ANOVA.

Los resultados observados respecto a la disminución casi total de la turbidez en los medios líquidos fueron confirmados por las mediciones en el espectrofotómetro, las especies estudiadas mostraron una disminución en la cantidad de colorante dentro de los matraces desde las primeras 24 horas. La única especie que mostró una degradación constante del colorante violeta 51 fue *Psilocybe yungensis*, mientras que *Psilocybe cubensis* y *Pleurotus ostreatus* mostraron fluctuaciones en la degradación del mismo. Se realizó un histograma con el programa R studio que muestra los valores de la degradación del colorante a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas y un diagrama de cajas para poder observar los valores medios de los tratamientos (Fig. 5.11 y 5.12).

Figura 5.11 Histograma de degradación de las especies

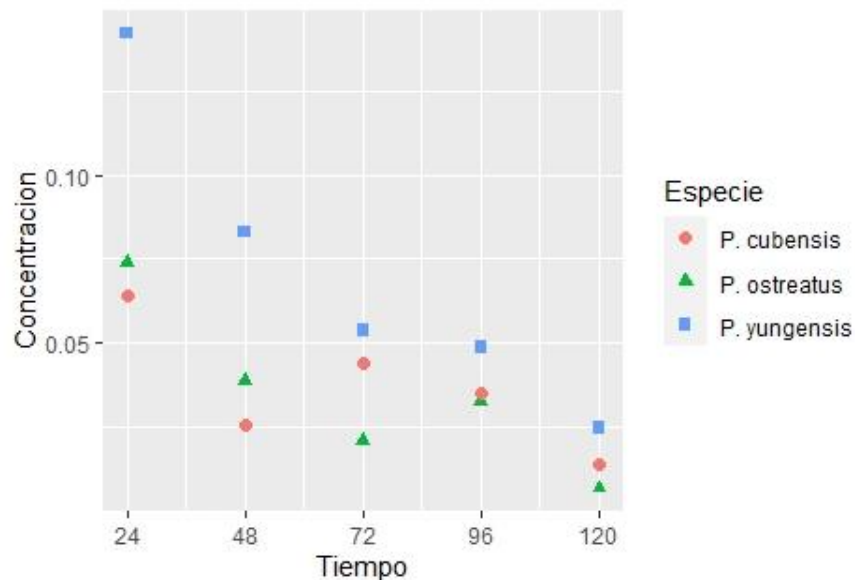


Figura 5.11. Histograma de la degradación del colorante violeta 51 durante 120 horas de contacto con micelio activado de las especies de macromicetos *Pleurotus ostreatus*, *Psilocybe cubensis* y *Psilocybe yungensis*.

Figura 5.12 Diagrama de cajas y bigotes

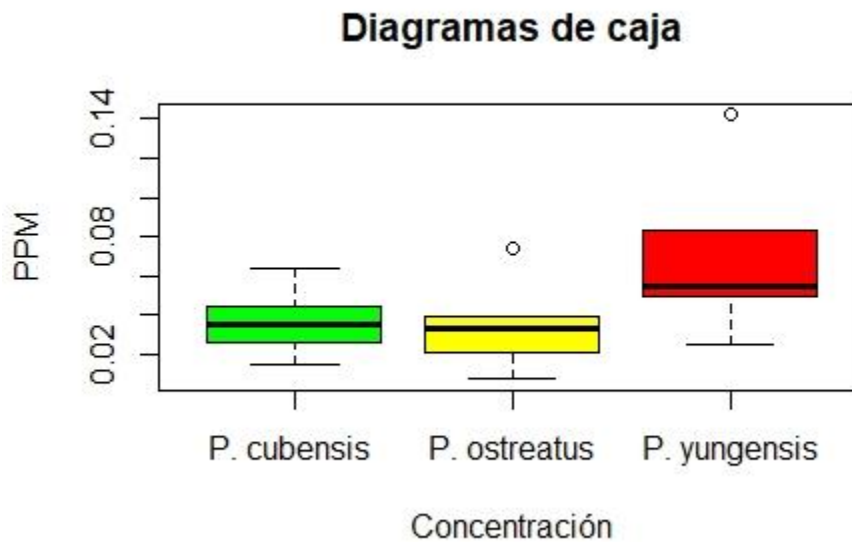


Figura 5.12 Diagrama de cajas con las medidas medias, mínimas y máximas de degradación del colorante.

Los resultados de las lecturas con el espectrofotómetro y que se muestran en la tabla 3 fueron analizados mediante un Análisis de varianza con el programa SAS. Los resultados arrojados por el programa demuestran que no existen diferencias significativas entre la tasa de degradación del colorante violeta 51 por parte de las especies estudiadas durante este experimento.

6 DISCUSIÓN

Los estudios enzimáticos y de biorremediación realizados con hongos se han realizado desde hace más de 20 años y han estado enfocados mayormente a la exploración del potencial de los hongos de la podredumbre blanca o ligninolíticos que son de uso comercial como *Trametes versicolor* y *Pleurotus ostreatus*, sin embargo, durante los últimos años ha crecido el interés por realizar este tipo de experimentos con la microbiota nativa de distintos países y variados ecosistemas. México al ser un país megadiverso, cuenta con una gran riqueza de ecosistemas, especies y genes, dentro de los cuales la diversidad fúngica ocupa un lugar importante, por lo que la exploración del potencial de las especies de hongos nativos para procesos de biorremediación es una línea de investigación prometedora, tomando en cuenta la variedad de sustratos y condiciones físico-químicas y ecológicas bajo las que estos son capaces de desarrollarse. (González, 2001; Sánchez-Vázquez *et al.*, 2007; Fernández *et al.*, 2009; Castillo-Ávila G.M., 2010; Nithya y Ragunathan, 2011; Durand y Neyra, 2015).

Este estudio comprobó la eficacia del hongo *Pleurotus ostreatus* para la degradación de compuestos recalcitrantes, en este caso el colorante azoico Violeta 51. El género *Pleurotus* y su perfil enzimático han sido ampliamente estudiados por diversos autores demostrando su eficacia en la degradación de diversos compuestos xenobióticos o recalcitrantes que repercuten sobre la calidad del medio ambiente, sus especies y la salud humana. Este hongo al ser domesticado para cultivo y consumo humano tiene la ventaja de haber sido seleccionado y mejorado genéticamente para poder crecer con altas tasas de crecimiento sobre una amplia variedad de sustratos forestales, agrícolas y agroindustriales con diferente composición química y bajo un amplio rango de parámetros ambientales, lo cual le confiere una alta agresividad a su sistema enzimático (Manzano *et al.*, 2004; Gomes-Machado & Matheus-Dacido, 2006; Sánchez-Vázquez *et al.*, 2007).

Este trabajo seleccionó para su evaluación enzimática a la especie *Psilocybe cubensis* y a pesar de ser un hongo ampliamente estudiado en cuestiones médicas por su contenido de psilocibina, no existen estudios previos como este, enfocados en su producción enzimática donde se comprobó la eficacia de su sistema enzimático para la degradación del colorante Violeta 51, este potencial de su sistema enzimático puede deberse a su capacidad para degradar moléculas complejas como la lignina y la celulosa, que son sustancias residuales en su sustrato natural que es el abono de rumiantes, estos últimos al igual que todos los mamíferos carecen del sistema enzimático para degradar lignina y celulosa en sus estómagos, en su lugar han establecido una simbiosis con especies del Phylum Neocallimastigomycota, sin embargo estos no son capaces de degradar la lignina en su totalidad, por lo que la cantidad residual de lignina en sus excretas es bastante alta, por otro lado los rumiantes son alimentados con pajas de cereales o residuos agrícolas, los cuales son también sustratos comunes para cultivar especies del género *Pleurotus* lo cual explica su parecida capacidad enzimática para la degradación de compuestos contaminantes como los colorantes azoicos. (Stamets 2005; Barahona-Rosales y Sánchez-Pinzón, 2005; Serrano-Hurtado D. 2009).

La especie *Psilocybe yungensis* fue seleccionada por ser una especie lignícola que crece sobre madera muerta en bosque mesófilo de montaña, por lo tanto, su sistema enzimático es parecido al de los demás hongos de la podredumbre blanca que también son capaces de degradar lignina, como era de esperarse también es capaz de degradar moléculas complejas que son contaminantes del medio ambiente, en este estudio mostro una alta capacidad para degradar el colorante azoico violeta 51, este hongo al igual que *Pleurotus ostreatus* es capaz de degradar y alimentarse de madera muerta lo cual explica el parecido de sus sistemas enzimáticos para la degradación del colorante violeta 51. (Stamets 2005; Nicholas L.G. y K. Ogamé. 2006; Serrano-Hurtado D. 2009).

Las pruebas de grupos de TUKEY mostraron la existencia de un solo grupo de datos por lo que las especies *Pleurotus ostreatus*, *Psilocybe cubensis* y *Psilocybe*

yungensis pueden ser utilizadas en sistemas de tratamiento de aguas residuales contaminadas con el colorante azoico violeta 51 o parecidos de manera indistinta y teniendo resultados bastante similares en la degradación del contaminante (Fig. 6.1). Sin embargo, si se encontraron diferencias en el comportamiento de la tasa de degradación por especie encontrando que *Pleurotus ostreatus* tuvo un rango de degradación similar durante los días 2,3 y 4, registrando un aumento el día 5. *Psilocybe cubensis* no presento cambios en los rangos de degradación por día y la especie *Psilocybe yungensis* tuvo cambios considerables en la tasa de degradación entre los días 2 y 3.

Figura 6.1 Pruebas TUKEY

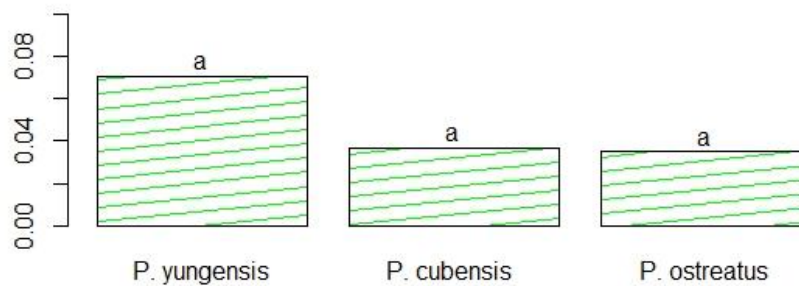


Figura 6.1 Prueba de grupos TUKEY donde se muestra la existencia de un solo grupo de datos.

A pesar de que las tres especies de hongos estudiados tienen potenciales similares para la degradación de colorantes azoicos y de que podrían ser utilizados por igual con la misma eficacia, el hongo de la especie *Pleurotus ostreatus* tiene la ventaja de generar micelio activado en el sustrato degradado que se genera de forma masiva como un subproducto de la producción de cuerpos fructíferos para consumo humano, por lo que actualmente se ha propuesto su reutilización en procesos de biorremediación, sin dejar de lado el hecho de que en un futuro los hongos del género *Psilocybe* puedan seguir la misma trayectoria al irse incrementado

progresivamente el interés en sus propiedades medicinales y su cultivo. Si bien los alcances del sustrato degradado por *Pleurotus ostreatus* son mucho mayores que los de las especies estudiadas debido al volumen de producción y disponibilidad en el país, la especie *Psilocybe cubensis* podría ser una herramienta en la biorremediación de suelos o sustratos altamente nitrogenados donde el micelio de *Pleurotus ostreatus* tenga dificultades para desarrollarse. Sin embargo, se considera que debido a la nueva tendencia de las investigaciones en psicodélicos en un futuro la disponibilidad de sustrato degradado por hongos del género *Psilocybe* sea mayor a nivel mundial y nacional por lo que este tipo de investigaciones tomaría mayor relevancia. (Stamets, 2005; Sánchez-Vázquez *et al.*, 2002; 2007).

Al igual que se ha reportado con anterioridad este estudio ha comprobado la eficacia de las enzimas lacasas provenientes de hongos de la podredumbre blanca o ligninolíticos para la degradación de colorantes textiles de tipo azoico. Aunque la literatura reporta muchos métodos desde simples hasta complejos, variando de los métodos físico químicos a los biológicos, la aplicación de hongos y sus enzimas es una solución barata y de gran alcance en comparación con muchas otras. La mejor estrategia es utilizar técnicas y métodos rápidos, económicos y efectivos para la descontaminación de efluentes y las lacasas pueden ser una biotecnología importante a futuro para la biorremediación de efluentes contaminados provenientes de industrias textiles (Arambarri *et al.*, 2008; Serrano-Hurtado D. 2009; Zaruma-Arias, 2018).

La tasa máxima de degradación para las 3 especies fue a las 120 horas del contacto, sin embargo, la única especie que mostro una degradación constante del color fue *Psilocybe yungensis*, por otro lado, *Pleurotus ostreatus* mostro un aumento de 8.75 ppm a 13.75 ppm registrada de las 72 a las 96 horas y volviendo a disminuir a 2.91 ppm a las 120 horas. *Psilocybe cubensis* también mostro el mismo comportamiento mostrando un aumento de 10.83 a 20.41 registrado de las 48 a las 72 horas. Las fluctuaciones en los niveles del colorante no se deben en su totalidad al proceso de

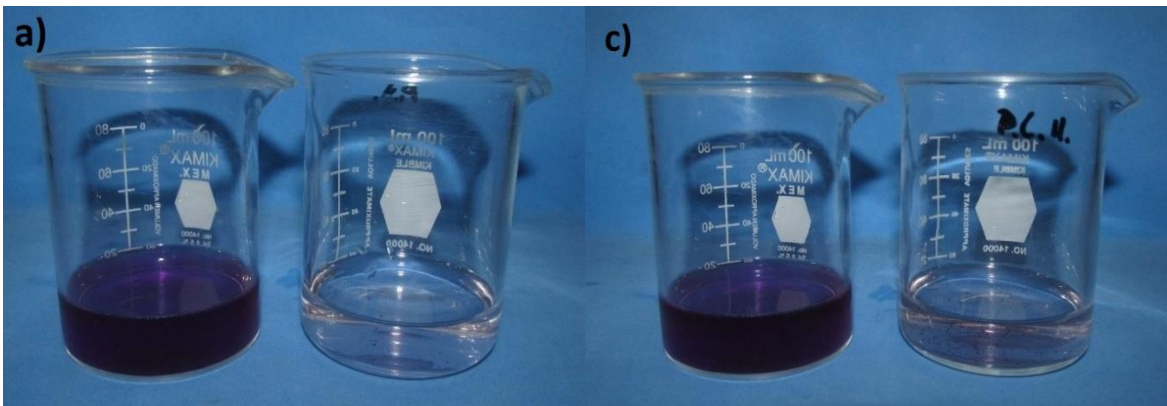
biodegradación de las enzimas, sino que también se presentaron los procesos físicos de adsorción y desorción en las hifas de los micelios de las especies, procesos que afectaron los resultados al haber alterado la distribución de las partículas de colorante en los medio de cultivo liquido los cuales involucran la retención y liberación de sustancias en los tejidos, lo cual derivo en un aumento de la ppm registradas en los días 2 y 3.

La especie con mayor actividad enzimática fue *Pleurotus ostreatus* seguido por las especies *Psilocybe cubensis* y *Psilocybe yungensis*. Este estudio no tomo como variable la tasa de crecimiento ni la biomasa, solo el tiempo de incubación, *Psilocybe yungensis* mostro una menor tasa de degradación que creemos está asociada a la formación de biomasa ya que en el mismo tiempo de incubación su micelio se desarrolló en menor densidad que el de las especies *Pleurotus ostreatus* y *Psilocybe yungensis*.

7 CONCLUSIONES

Este estudio demostró que las especies seleccionadas poseen una actividad enzimática considerable y la capacidad de biodegradación del colorante azoico violeta 51 al contacto con micelio activado de los Hongos de la Pudrición Blanca *Psilocybe cubensis* y *Psilocybe yungensis* (Fig. 7.1 y 7.2). La actividad enzimática de estos hongos podría ser importante en un futuro para la biodegradación de diversos colorantes de tipo azoico y otros contaminantes xenobióticos. La naturaleza responde a las catástrofes de maneras apolíticas (Stamets 2005), por lo que es necesario desestigmatizar a los organismos que tienen potencial para el mejoramiento de la calidad del medio ambiente y la salud humana como es el caso del género *Psilocybe* que además de sus cualidades medicinales, son una herramienta prometedora para la descontaminación de compuestos tóxicos vertidos en efluentes como los colorantes azoicos.

Figuras 7.1 y 7.2 Colorante violeta a 100ppm con y sin contacto con HPB.



Figuras 7.1 y 7.2 a): Derecha: Solución con violeta 51 a 100 ppm, Izquierda: extracto después de 120 horas de contacto con *P. yungensis*. b) Derecha: Solución con violeta 51 a 100 ppm, Izquierda: extracto después de 120 horas de contacto con *P. cubensis*.

Los resultados obtenidos en este estudio contrastan con lo reportado por diversos autores quienes confirman que la actividad de las enzimas lacasas de diversos hongos de la pudrición blanca tienen la capacidad de biodegradar diversos componentes xenobióticos recalcitrantes (Fig. 29), el hongo *Pleurotus ostreatus*

presenta una alta actividad lacasa, que ya había sido reportada, sin embargo, se suman organismos como *Psilocybe cubensis* y *Psilocybe yungensis* a la lista de especies que se pueden utilizar para degradar colorantes azoicos y ser utilizados en procesos de micorremediación, aun así se recomienda hacer más estudios para seguir evaluando el comportamiento y potencial de estas especies bajo diferentes condiciones de cultivo y en presencia de distintos contaminantes a diferentes concentraciones, para poder determinar sus alcances.

La problemática de la contaminación ambiental en los ríos de la ciudad de Puebla es un problema grave en la actualidad, siendo la industria textil una de las que más contaminan los efluentes con colorantes y otros químicos, es de gran importancia tener a nuestro alcance métodos confiables y económicamente viables que nos ayuden a mitigar los impactos negativos que estos tienen sobre los ecosistemas, sus especies asociadas y las poblaciones humanas que dependen de ellos.

Como parte de esta tesis se estandarizó un método sencillo, rápido y confiable para la evaluación de la degradación de colorantes azoicos, y que permite realizar cuantificaciones para comparar la actividad enzimática de macromicetos ligninolíticos. Investigaciones de este tipo son de especial interés para encontrar formas de descontaminación de efluentes a partir del potencial de la biodiversidad fúngica nativa, por lo que se recomienda realizar a futuro más investigaciones de este tipo.

8 BIBLIOGRAFÍA

Aguirre-Acosta E., M. Ulloa, S. Aguilar, J. Cifuentes y R. Valenzuela. 2014. Biodiversidad de hongos en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. México. PP. 76-81.

Arambarri A. y M.C.N. Saparrat. 2008. Implicancias funcionales de la enzima Lacasa en la biología de los hongos y su potencial biotecnológico. Tópicos sobre diversidad ecología y usos de los hongos microscópicos en Iberoamérica. INECOL / CONACYT / CYTED. Veracruz, México. PP. 327-349.

Arturo, J., & Castillo Tapia. (2001). Apertura comercial y recesión en la industria maquiladora. El caso de Tehuacán. En *Tesis para obtener el título de Lic. En relaciones Internacionales, UDLAP*.

Arana A., A. Téllez, T. González y A. González. 2002. Aspectos generales de la biodegradación de la madera: Aplicaciones industriales de las lacasas. *BioTecnología* Vol.7 No 3. PP. 44-55

Barahona-Rosales R. y S. Sánchez-Pinzón. 2005. Limitaciones físicas y químicas de la digestibilidad de pastos tropicales y estrategias para aumentarla. *Revista CORPOICA*, Vol. 6 No.1. PP. 69-82

Brañez-Sánchez M., R. Gutiérrez, R. Pérez, C. Uribe, P. Valle. 2018. Contaminación de los ambientes acuáticos generados por la industria textil. *Escuela universitaria de Posgrado UNFV Lima-Perú*. V. XXIII. No.26. PP 129-144.

Castillo-Ávila G.M., (2010). Aislamiento de hongos lignocelulolíticos a partir de residuos agroindustriales de plátano (Tesis de maestría). Centro de Investigación científica de Yucatán, México.

Chan Cupul W., G.P. Heredia-Abarca y R. Rodríguez-Vázquez. 2016. Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática ligninolítica de macromicetos del estado de Veracruz, México. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 32 (3). PP 339-351.

Chávez-Sifontes, M. y M.E. Domine. 2013. Lignina estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. *Avances en ciencias e ingeniería.* 4(4), PP. 15-46.

Durand L. y L Neyra. 2015. I- La diversidad biológica de México: ecosistemas, especies y genes. *La biodiversidad de México: Inventarios, manejos, usos, informática, conservación e importancia cultural.* Fondo de Cultura Económica. México. PP. 12-36.

EPA. (2013). *Best management practices for pollution prevention in the textil industry U.S.* Enviromental Protection Agency, Cincinnati, USA.

Esparza-Martínez V.M. y R. De la torre-Almaraz. 2011. Manual: El cultivo de hongos comestibles como una alternativa de biotecnología integral. UNAM / FES Iztacala / PyV editores. México. PP. 15-27.

Fernández J.A., L.M. Henao, A.M. Pedroza-Rodríguez y B. Quevedo-Hidalgo. 2009. Inmovilización de hongos ligninolíticos para la remoción del colorante negro reactivo 5. *Rev. Colomb. Biotecnol.* Vol. XI, No.1. PP. 59-72

Flores Torres & Guadalupe, E. (2004). Evaluación de la contaminación generada por el vertido de aguas residuales provenientes d la industria textil en Zinapecuaro, Michoacán, Tesis de Maestría. En *Escuela Superior de Ingeniería Textil, IPN-México* (pág. 103).

García-Rollan M. 1976. Hongos de la madera (Basidiomicetos). Ministerio de agricultura. Graficas Agenjo. Madrid, España. PP. 13-38.

Gomes Machado K. & Matheus Dacido, R. (2006). Biodegradation of remazol brilliant blue r by ligninolytic enzymatic complex produced by *Pleurotus ostreatus*. *Brazilian Journal of Microbiology* (2006) 37: 468-473, ISSN 1517-8382.

Guzmán G. 1980. Identificación de los hongos comestibles, venenosos, alucinantes y destructores de la madera. LIMUSA. México. PP. 451.

Handal-Silva A., G. Pérez-Castresana, J.L. Morán-Perales y W. García-Suastegui. 2017. Historia de la contaminación hídrica del alto balsas. *Revista del desarrollo urbano y sustentable*. Vol.3 No. 9 PP. 10-23.

Herrera T. y M. Ulloa. 2004. El reino de los hongos: Micología básica y aplicada. 2da edición. UNAM / FCE. México. PP. 552 .

Juárez T. (2003). La industria maquiladora textil en el Municipio de Xoxtla, Puebla. (Tesina). En *Facultad de Economía de la BUAP. Puebla, México*.

Kuhar J. F. (2013). Cultivo de *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. y evaluación de su aplicación a la biorremediación. Obtenido de (Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.): Recuperado de http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n5332_Kuhar

Lyashenko A.V., N.E. Zhukhlistova, A.G. Gabdoulkhakov, Y.N. Zhukova, W. Voelter, V.N. Zaitsev, I. Bento, E.V. Stepanova, G.S. Kachalova, O.V. Koroleva, E.A. Cherkashyn, V.I. Tishkov, V.S. Lamzin, K. Schirwitz, E.Y. Morgunova, C. Betzel, P.F. Lindley & A.M. Mikhailov. 2006. Purification, crystallization and preliminary X ray study of the fungal laccase from *Cerrena maxima*. *Acta Crystallographica* F62, PP. 954–957.

Manzano AM., T. León, J. Arguelles, M. Ramos-Leal, R. Chinae, G. Guerra, G. Casado, M.I. Sánchez y B. Gómez. 2004. Hongos de la podredumbre blanca con capacidad ligninolítica y acción decolorante sobre el violeta cristal. *Revista Biología*. Vol. 18, No. 2, PP. 123-127.

Mouso N., L. Diorio y F. Forchiassin. 2007. Acción de *Stereum hirsutum* (wild) Pers. en la degradación de colorantes. *Rev. Iberoam. Micol.* 2007; 24: 294-298.

Nicholas L.G. y K. Ogamé. 2006. *Psilocybes manual de cultivo*. Ediciones CAÑAMO. Barcelona, España. PP.215.

Nithya R., & Ragunathan, R. (2011). Decolorization of the dye congo red by *Pleurotus sajor caju* silver nanoparticle. *International Conference on Food Engineering and Biotechnology IPCBEE vol.9 (2011) © (2011) IACSIT Press. Singapoore.*

Pacioni G. 1982. *Guía de Hongos*. Grijalbo. Barcelona, España. PP. 9-58.

Rodríguez Rosario, K. J. (2005). Tesis para el grado de Maestro en Ciencias en Biología. "Eficacia del hongo *Pleurotus ostreatus* como biorremediador de suelos contaminados con metales pesados". En *Universidad de Puerto Rico Recinto Universitario de Mayagüez*. (pág. 83).

Saldoval, V., & Gordillo, M. (2009). Evaluación fisicoquímica, microbiológica y toxicológica de La degradación ambiental del río Atoyac, México. En *INTERCIENCIA*, vol.34, n.12 (págs. 880-887).

Sánchez-Vázquez J.E. y D.J. Royse. 2002. La biología y el cultivo de *Pleurotus spp.* *ECOSUR / LIMUSA*. México. PP. 27-79;259-271.

Sánchez-Vázquez J.E., D. Martínez-Carrera, G. Mata y H. Leal-Lara. 2007. V Potencial de las especies de *Pleurotus* en procesos de Biorremediación. El cultivo de setas *Pleurotus spp* en México. *ECOSUR*. México. PP. 185-199.

SEMARNAT-CNA. (2004). Estadísticas del agua en México 2004. Secretaria Medio Ambiente y Recursos Naturales, Comisión Nacional del Agua. México.

SEMARNAT-CNA. (2005). Estadísticas del agua en México 2005. Secretaria Medio Ambiente y Recursos Naturales, Comisión Nacional del Agua. México.

SEMARNAT-CNA. (2017). NUMERAGUA 2017. Secretaria Medio Ambiente y Recursos Naturales, Comisión Nacional del Agua. México.

SEMARNAT-CNA. (2019). Estadísticas del agua en México 2019. Secretaria Medio Ambiente y Recursos Naturales, Comisión Nacional del Agua. México. 2004; 2005; 2017; 2019

Serrano-Hurtado D. 2009. La psilocibina: perspectiva histórica y farmacológica e investigaciones actuales autorizadas. Cultura y drogas. Vol.14, No.16. PP. 165 - 188

Stamets, P. & Chilton, J. (1983). A Practical Guide to Growing Mushrooms at home. En *The Mushroom Cultivator*.

Stamets P. 1996. Psilocybin mushrooms of the world. Ten Speed Press. U.S.A. PP. 245.

Stamets P. 2005. Mycelium running: How mushrooms can save help save the world. Ten Speed Press. U.S.A. PP. 86-114.

Toca-Herrera J. L., & Rodríguez, S. (2006). Lacassas in the textile industry. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 117-122.

Viramontes-Ramos S. y M.C. Portillo-Ruiz. 2016. Atlas para la identificación de hongos y organismos relacionados. Universidad Autónoma de Chihuahua. México. PP. 15-38.

Zaruma-Arias P.E, J.B. Proal-Nájera, I. Chaires-Hernández y H.I- Chávez-Ayala. 2018. Los colorantes textiles industriales y tratamientos óptimos de sus efluentes de agua residual: una breve revisión. Revista de la facultad de ciencias químicas. No. 19. PP 38-47.

9 ANEXOS

Tabla 1. Sistemática de las especies estudiadas			
Reino	Fungí	Fungí	Fungí
Phyllum	Basidiomycota	Basidiomycota	Basidiomycota
Clase	Agaricomycetes	Agaricomycetes	Agaricomycetes
Orden	Agaricales	Agaricales	Agaricales
Familia	Pleurotaceae	Strophariaceae	Strophariaceae
Genero	Pleurotus	Psilocybe	Psilocybe
Especie	<i>P. Ostreatus</i>	<i>P. cubensis</i>	<i>P. yungensis</i>

Tabla 2. Municipios y localidades de los sitios de colecta de los macromicetos estudiados				
Especie	Municipio	Localidad	Sustrato	Coordenadas
<i>P. Ostreatus</i> "G"	Puebla, Puebla	CICA	Paja	19.005530, - 98.205334
<i>P. cubensis</i>	Huautla de Jiménez, Oaxaca	San Andrés Hidalgo	Heces de vaca	18.122084, - 96.820569
<i>P. yungensis</i>	Cuetzalan, Puebla.	Apulco	Madera muerta	19.900103, - 97.617551

Tabla 3. Valores de absorbancia y ppm registrados cada 24 horas para las especies <i>Pleurotus ostreatus</i>, <i>Psilocybe cubensis</i> y <i>Psilocybe yungensis</i>			
Especie	Tiempo	Absorbancia	PPM
<i>P. ostreatus</i>	24 hrs	0.074	30.83
<i>P. ostreatus</i>	48 hrs	0.039	16.25
<i>P. ostreatus</i>	72 hrs	0.021	8.75
<i>P. ostreatus</i>	96 hrs	0.033	13.75
<i>P. ostreatus</i>	120 hrs	0.007	2.91
<i>P. cubensis</i>	24 hrs	0.064	26.66
<i>P. cubensis</i>	48 hrs	0.026	10.83
<i>P. cubensis</i>	72 hrs	0.044	20.41
<i>P. cubensis</i>	96 hrs	0.035	14.58
<i>P. cubensis</i>	120 hrs	0.014	5.83

<i>P. yungensis</i>	24 hrs	0.142	59.16
<i>P. yungensis</i>	48 hrs	0.083	34.58
<i>P. yungensis</i>	72 hrs	0.054	22.5
<i>P. yungensis</i>	96 hrs	0.049	20.41
<i>P. yungensis</i>	120 hrs	0.025	15

Anexo 1. Composición nutrimental (gr/L) de los medios de cultivo líquidos evaluados para la producción de enzimas lacasa.

Medio Kirk modificado			
Reactivo	1L	200ml	100ml
Elementos traza	10ml	2ml	1ml
KHPO4	2.0139gr	0.402gr	0.201gr
MgSO4	0.49938gr	0.099gr	0.049gr
Glucosa	10gr	2gr	1gr
Nitrato de Amonio	0.20412gr	0.040gr	0.020gr
Tiamina hidroclicrica	0.001gr	0.0002	0.0001

Solución de elementos traza (10ml)	
MgSO4	0.25gr
FeSO4	0.028gr
MnSO4	0.017gr
NaCl	0.016gr

Anexo 2. Formulas ocupadas

Solución madre 100 ppm =100mg (.100gr) de colorante en 1 litro de agua (1000 ml)

Solución a 30 ppm (200ml) =60ml de solución madre aforados a 200ml con agua destilada

Formula= $C_1V_1=C_2V_2$

C_1 = Concentración conocida

V_1 = Vol.= X

C_2 = Concentración deseada

V_2 = Volumen deseado

C_1 = 100ppm

V_1 = X

C_2 = 30ppm

V_2 = 200ml

$C_1V_1=C_2V_2$ -----> $V_1 = C_2V_2/C_1$ -----> $30*200/100 = 60$ (ml)