



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

---

---

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Licenciatura en Biología**

**Bio-decoloración de tintes sintéticos industriales con cepas nativas de  
*Trichoderma spp., in vitro.***

TESIS PRESENTADA

Que para obtener el título de:

**Licenciado en Biología**

Presenta

**Marco Antonio Kevin Pérez Vázquez.**

Director de Tesis

**DR. OMAR ROMERO ARENAS**

**Puebla, Pue.**

**Junio 2018**



La presente tesis, titulada: **Bio-decoloración de tintes sintéticos industriales con cepas nativas de *Trichoderma* spp., in vitro.**

Realizada por el alumno **Marco Antonio Kevin Pérez Vázquez**. Bajo la dirección del Comité Tutorial indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

Licenciado en Biología.  
Facultad de Ciencias Biológicas.  
COMITÉ TUTORAL:

DIRECTOR:

DR. Omar Romero Arenas

REVISOR:

Dra. Rocío Pérez y Terrón.

REVISOR:

M. C. Héctor Julio García Flores

Puebla, Pue., Junio de 2018.

## **Agradecimientos**

Agradezco a mi padre Marco Antonio Pérez Reyes y a mi madre Blanca Estela Vázquez Gaviña, por su apoyo y ayuda brindada durante toda la carrera y en el presente trabajo. De la misma forma agradezco a mi hermana Nubia Berenice Vázquez Gaviña, quien siempre me ayudo y me guio en distintos aspectos de mi vida. Esta tesis está dedicada a mi familia, gracias por su apoyo.

Quisiera dar gracias a mi primo el Dr. Raúl García Vázquez, por sus consejos y guía que me sirvió de mucho para poner en perspectiva diferentes momentos y aspectos de la carrera en los cuales me encontraba desorientado.

Agradezco a mis amigos más cercanos, Jesús Martínez, Mario Vicente y Javier Aguilar por sus palabras de aliento y apoyo desde que nos conocimos en la preparatoria. Al igual que a mi compañero en la licenciatura de biología, Jesús Ruiz por su apoyo durante la carrera.

Mis agradecimientos al Dr. Omar Romero Arenas por su ayuda y por permitirme trabajar en su laboratorio como uno de sus tesisistas.

Por último, quisiera agradecer a los compañeros que tuve en el laboratorio de Hongos y Patología vegetal, a Saira Martínez y Alejandro Portilla por su ayuda y apoyo para realizar este estudio.

*“La gente piensa que los sueños no son reales porque no están hechos de materia, de partículas. Los sueños son reales. Están hechos de puntos de vista, imágenes, memorias, equívocos y esperanzas perdidas”.*

— Neil Gaiman

## Resumen

Los problemas sanitarios encontrados en aquellos lugares cercanos a aguas residuales crean una gran preocupación dentro de un país que se encuentra entre los principales productores textiles, ya que estos requieren de una gran cantidad de colorantes sintéticos que son difíciles de remover una vez que han ingresado en cuerpos de agua.

El presente trabajo de investigación pretende aumentar los conocimientos acerca de los métodos ecológicos dentro del marco del desarrollo sustentable, que sirvan como una alternativa a los tratamientos físico-químicos para la limpieza de aguas contaminadas con colorantes sintéticos, ya que estos resultan ser costosos, de difícil manejo y representan un peligro para la salud; ya que varios de estos colorantes son cancerígenos para las personas que se encuentran en contacto con estos desechos. Para tratar el problema de contaminación de la industria textil en aguas residuales se emplearon tres cepas nativas del género *Trichoderma* spp, con la finalidad de medir su efectividad al momento de actuar en un medio a base de dextrosa de papa (PDA). La efectividad estaría representada en los resultados obtenidos al medir el crecimiento del micelio, la generación de esporas y la degradación y absorción de los colorantes industriales, Azul índigo, Negro de eriocromo T y Rojo Congo. Cada uno en tratamientos de 100%, 75% y 25% al 1 Mol., de concentración de colorante, teniendo tres repeticiones por cada uno de los tratamientos. Los Resultados obtenidos mostraron tener diferencias significativas entre la tasa de desarrollo de las cepas y los colorantes aplicados a diferentes concentraciones, los porcentajes de degradación fueron mayores en el colorante rojo congo, al igual que la generación de esporas. Los porcentajes más bajos de degradación se registraron en el azul índigo, las esporas observadas también presentaron números bajos en este colorante. En el colorante Negro de eriocromo T presento la velocidad de crecimiento más rápida y también genero una mayor cantidad de biomasa en comparación con las otras cepas de *Trichoderma* spp., así como los demás colorantes. Las cepas del género *Trichoderma* fueron efectivas en la degradación de los colorantes industriales, ya que no se vio afectado su desarrollo y crecimiento *in vitro*.

**Palabras Claves.** Cepas nativas, % de degradación de colorantes, tasa de desarrollo y biomasa acumulada.

## INTRODUCCIÓN

El registro correspondiente al uso de pigmentos es muy antiguo (40,000 años de antigüedad), teniendo sus primeros intentos de uso en el pintado de rocas o de cualquier otro material al alcance del hombre, ya sea por estética, arte o necesidades comunicativas (Méndez, 2009). En un inicio el origen de los pigmentos era totalmente natural, se obtenían a partir de plantas, insectos, animales y minerales (Singh *et al.*, 2018). Con el pasar del tiempo estos pigmentos naturales han sido remplazados por los tintes sintéticos; que se utilizan hoy en día. Por una parte esto se debió a su perdurabilidad en diferentes productos, además de la reducción en sus costos de producción para satisfacer la demanda industrial, la cual genera una gran cantidad de efluentes en el ambiente (Paz *et al.*, 2017).

La industrial textil y de colorantes diariamente genera una gran cantidad de aguas residuales y contaminantes, ya que la producción ha crecido significativamente (Gavrilescu, 2004). Anualmente, se descarga una cantidad aproximada de 280,000 toneladas de tintes en los cuerpos de agua receptores, contando 8,000 tintes, 6,900 productos químicos auxiliares y sales en todo el mundo. Esto crea preocupación en distintas regiones del mundo debido a que el consumo de agua dulce es un recurso escaso en varios países en vías de desarrollo (Wang-Jin *et al.*, 2017).

El uso de colorantes y la producción textil representa una fuente de ingresos económicos sustancial en nuestro país ya que este se encuentra entre los diez mayores productores de cuero en el mundo generando aproximadamente el 4% de la producción mundial. El procesado del cuero presenta varias etapas de producción (bronceado, teñido, engrase y acabado) para que adquieran su suavidad y color, llegándose a emplear tintes aniónicos directos y básicos que no han recibido ningún tratamiento previo, los cuales, posteriormente son desechados generando contaminación en cuerpos acuáticos (Cruz-Rizo *et al.*, 2016).

Existen diversos métodos para remover desechos tóxicos como contaminantes del agua o suelo. Los más conocidos son los tratamientos fisicoquímicos, sin embargo estos conllevan distintas dificultades para poder ser utilizados en cualquier sector de la industria textil. Estos métodos

representan un elevado costo, tienen una eficacia limitada y pueden afectar de manera irreversible las propiedades del suelo, agua y de los seres vivos que en ellos habitan (Delgadillo-López *et al.*, 2011). La concentración de tintes como parte de los efluentes no solo resulta visible e indeseable, también causa serios problemas a la vida acuática y desórdenes en la salud humana, creando la necesidad a través de los años de generar e implementar tecnologías compatibles con los ecosistemas (Khataeea *et al.*, 2010).

Las tecnologías basadas en la fitoremediación son en alto grado convenientes debido a que resultan eficientes, económicas y ambientalmente amigables (Wang-Ji *et al.*, 2017). La fitorremediación es un proceso en el cual se utilizan diferentes organismos biológicos, como la plantas vasculares, algas y hongos para extraer, inmovilizar, contener y degradar contaminantes del suelo, el agua o el aire (Gerhardt *et al.*, 2016).

La biorremediación por medio de hongos filamentosos son una opción rentable y ecológicamente necesarias, debido a que las enzimas producidas son capaces de degradar contaminantes sintéticos que se pueden encontrar en aguas y suelos, en adición a esto su biomasa fúngica es conocida por sus propiedades biosorbentes, efectiva para la eliminación de metales tóxicos, como el: cromo, cobre, mercurio, níquel, cadmio y plomo encontrados en aguas residuales (Sharma *et al.*, 2015). La creación de tecnologías biológicas se vuelve año con año en una necesidad latente en un mundo afectado por diferentes contaminantes en diversos ambientes (Gartland *et al.*, 2018).

## **MARCO DE REFERENCIA**

### **TECNOLOGÍAS EMPLEADAS EN LA DECOLORACIÓN DE EFLUENTES TEXTILES**

Existen diferentes tratamientos biológicos diseñados para limpiar sitios contaminados como los son: cuerpos acuíferos, lodos, suelos y varios flujos de residuos tóxicos. Estos tratamientos pertenecen a los distintos tipos de biorremediación, el cual consiste en el uso de microorganismos para eliminar o reducir la concentración de desechos peligrosos en lugares afectados por diferentes contaminantes (Boopathy, 2000).

### **ALTERNATIVAS EN LA BIORREMEDIACIÓN**

Para que la biorremediación pueda emplearse de forma efectiva es necesario tener en cuenta que los microorganismos utilizados sean capaces de atacar enzimáticamente a los contaminantes presentes con la finalidad de convertirlos en sustancias menos dañinas, lo cual se logra por medio de reacciones químicas que forman parte del proceso metabólico dentro del microorganismo empleado. Sin embargo, la efectividad del tratamiento en cuestión depende de la interacción de varios factores ambientales para que el crecimiento y la actividad microbiana funjan como degradadores de forma adecuada. Aquellos microorganismos que son utilizados para la biodegradación son las bacterias, los hongos, plantas vasculares o algas (Vidali, 2001).

### **Bacterias**

Existen diversos métodos biológicos, que pueden llegar a ser de gran ayuda para mitigar la migración de contaminantes al suelo o al agua por medio de procesos como la bioacumulación o la reducción de metales, el más conocido y estudiado de estos es la biorremediación por medio de bacterias. Este método actúa en un estado específico de oxidación en los contaminantes tóxicos, como la reducción del uranio hexavalente soluble o la degradación de un hidrocarburo específico (Pieper *et al.*, 2000). Sin embargo, para lograr que un tratamiento basado en bacterias funcione de forma adecuada en un sitio contaminado se requiere que el microorganismo degrade a varios contaminantes, ya que los suelos y las aguas rara vez se encuentran contaminados por un solo químico (Ruggiero *et al.*, 2004).

## **Fitoremediación**

Dentro de la biorremediación existe una técnica llamada fitoremediación, la cual desarrolla estrategias eficientes, económicas y ambientalmente amigables, utilizando plantas vasculares, algas y/u hongos para eliminar y contener contaminantes orgánicos e inorgánicos, que se pueden llegar a encontrar en el suelo y/o el agua. En la fitoremediación se beneficia la estabilidad del ambiente, se desarrolla una excelente capacidad para producir biomasa y acumula diversos contaminantes ambientales de acuerdo a los organismos biológicos empleados (Wang-Xu *et al.*, 2017).

## **Algas**

Los métodos basados en algas son de los menos estudiados para la remoción de contaminantes, sin embargo, resultan en gran parte beneficiosos a causa de su alta tolerancia a los metales pesados, capacidad de crecer tanto autotróficamente como heterotróficamente, sus grandes relaciones entre superficie, volumen y fototoxicidad (Fazalb *et al.*, 2017). Las algas no sólo son utilizadas para captar dentro de sus tejidos metales pesados en el agua, también se utilizan a lo largo del mundo para medir concentraciones de contaminantes en ambientes marinos fungiendo como biomonitores (Chekroun *et al.*, 2013).

De acuerdo con Sivakumar *et al.* (2012) las biotecnologías ambientales como las algas, pueden ser utilizadas para capturar elementos no metálicos como; carbono, nitrógeno y fósforo de desechos industriales específicos, municipales y agrícolas. Las algas a su vez, pueden llegar a formar un sistema integrado de producción que recicle desechos agrícolas para biocombustibles.

## **Hongos**

Los estudios basados en hongos se han vuelto atractivos en el tratamiento de aguas contaminadas, esto debido a las altas tasas de eliminación de varios contaminantes, en especial aquellos encontrados en aguas residuales, como los tintes sintéticos (Anastasi *et al.*, 2012). Los hongos, particularmente los de la pudrición blanca, funcionan como degradadores de una amplia gama de compuestos recalcitrantes, mediante la secreción extracelular de enzimas oxidativas específicas (Haia *et al.*, 2006). Este complejo de enzimático se encuentra conformado por

enzimas oxidativas como: peroxidasas, manganeso peroxidasas, lignina peroxidasas, lacasas, microperoxidasa-11, polifenol oxidasas y azoreductasas las cuales han sido explotadas en la decoloración y degradación de los tintes (Husain, 2006).

El uso de hongos para llevar acabo la purificación de aguas residuales resulta en extremo atractivo a causa de su facilidad de cultivo, la capacidad de crecer a valores de pH inferiores a 5, baja susceptibilidad a la contaminación por otros microorganismos y la producción de biomasa con alto valor nutritivo, que a su vez puede servir como sustrato para el crecimiento de proteína fúngica altamente deshidratable y que puede usarse como fuente de alimento para animales de ganado. Aunque se requiera incorporar nutrientes adicionales al medio para que el hongo crezca, en realidad estos son mínimos durante el tratamiento (Sindhuja *et al.*, 2010).

## **COLORANTES INDUSTRIALES**

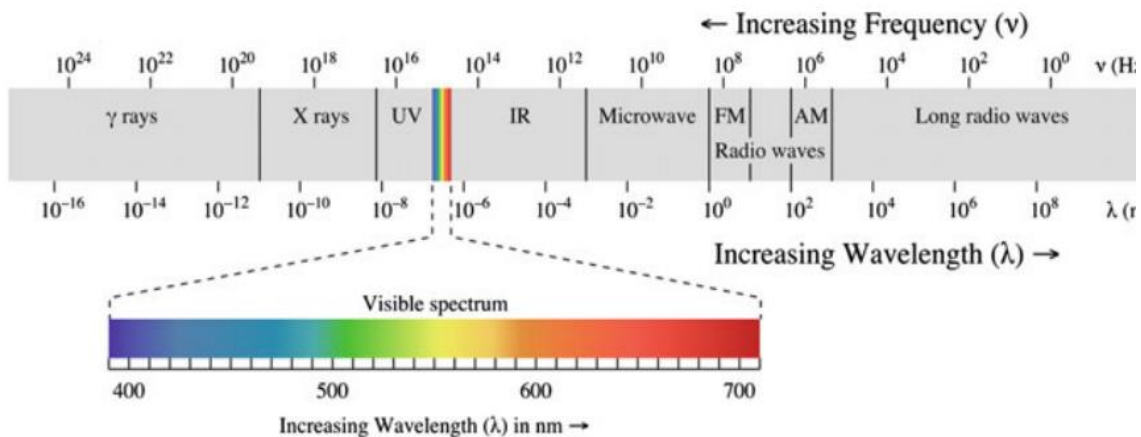
La producción de textiles teñidos posee más de 4,000 años de antigüedad. La mayoría de los colorantes se solían obtener a partir de fuentes naturales, sin embargo, desde mediados del siglo XIX los colorantes han encontrado una nueva fuente de origen en compuestos sintéticos (Ferreira *et al.*, 2004).

El descubrimiento del primer colorante sintético en 1856 conocido como “Mauveine”, dio paso a un crecimiento exponencial en la producción y demanda de colorantes requiriendo un flujo continuo de nuevos productos a causa de la gran demanda requerida por la industria hasta el día de hoy. El descubrimiento de los cromógenos de colorantes impulsó el desarrollo de diferentes sectores industriales, sin embargo a mediados del siglo XX, se dio un aumento en el costo de las materias primas en la producción de colorantes, iniciando un cambio en los procesos de fabricación, reemplazando los cromógenos tintorialmente débiles, como antraquinona, con cromógenos tintorialmente más fuertes, como los azo (heterocíclico) y benzodifuranona, los cuales generan tintes más rentables (Hunger, 2003).

Los colorantes sintéticos poseen diferentes propiedades que permiten su caracterización, entre las más importantes encontramos su conformación por anillos aromáticos que contienen electrones deslocalizados y también diferentes grupos funcionales. Su color se debe a la estructura del

cromógeno-cromóforo (aceptor de electrones) y la capacidad de tinción se debe a los grupos de auxocromía (donante de electrones). Las configuraciones cromóforo están representadas por el grupo azo ( $-N=N-$ ), grupo etileno ( $=C=C=$ ), grupo metino ( $-CH=$ ), grupo carbonilo ( $=C=O$ ), carbono-nitrógeno ( $=C=NH$ ;  $-CH=N-$ ), carbono-azufre ( $=C=S$ ;  $\equiv CS-SC\equiv$ ), nitro ( $-NO_2$ ;  $-NO-OH$ ), nitroso ( $-N=O$ ;  $=N-OH$ ) o grupos chinoides. Mientras que los grupos auxocromo son ionizables, confiriendo a los tintes la capacidad de unión sobre el material textil. Los grupos de auxocromo pueden ser:  $-NH_2$  (amino),  $-COOH$  (carboxilo),  $-SO_3H$  (sulfonato) y  $-OH$  (hidroxilo), entre los más comunes (Zaharia *et al.*, 2012).

Para poder clasificar colorantes de forma apropiada se debe considerar ambos métodos. Hunger, (2003), señala que si bien la clasificación por estructura química es una opción muy útil debido a que identifica colorantes como pertenecientes a un grupo que tiene propiedades características o muy específicas, hay que considerar que la jerga y nomenclatura que surge de este sistema puede cambiar debido a que no pertenece a un lenguaje científico, además lo más común es que este tipo de lenguaje solo lo manejen químicos e ingenieros textiles. Por lo tanto, la clasificación por método de aplicación resulta ser de gran importancia, no sólo por ser el sistema adoptado por el Índice de color (**Fig. 1**), también se debe al hecho de que su uso engloba de mejor forma a los tintes, como ejemplo, tenemos el uso de estos en algodón y poliéster, que son los materiales con mayor tasa de teñido, así una vez que se conoce el uso o aplicación la búsqueda de tintes disminuye.



**Figura 1.** Espectro electromagnético (Gürses *et al.*; 2016).

**Tabla 1.** Clasificación de los tintes por uso o método de aplicación.

<b>Clase</b>	<b>Sustratos principales</b>	<b>Método de aplicación</b>	<b>Tipo de químico</b>
Acido	nylon, lana, seda, papel, tintas y cuero	generalmente de neutro a baños de tinte ácidos	azo (incluido el premetalizado), antraquinona, trifenilmetano, azina, xanteno, nitro y nitroso
Componentes Azoicos y sus composiciones	algodón, rayón, acetato de celulosa y poliéster	fibra impregnada con acoplamiento componente y tratado con una solución de diazonio estabilizado y sal	Azo
Básicos	papel, poliacrilonitrilo, nylon modificado, poliéster y tintas	aplicado desde baños de tintura ácida	cianina, hemicianina, diazahemicina, difenilmetano, triarilmetano, azo, azina, xanteno, acridina, oxazina y antraquinona
Directos	algodón, rayón, papel, cuero y nylon	aplicado desde neutro o ligeramente baños alcalinos que contienen electrólito	azo, ftalocianina, estilbeno y oxazina
Dispersos	poliéster, poliamida, acetato, acrílico y plástica	finas dispersiones acuosas a menudo aplicado por alta temperatura / presión o temperatura más baja métodos de portadora; tinte puede ser acolchado en tela y horneado o termofijados	azo, antraquinona, estililo, nitro y benzodifuranona
Fluorescentes abrillantadores	jabones y detergentes, todas las fibras, aceites, pinturas, y plásticos	de solución, dispersión o suspensión en una masa	estilbeno, pirazoles, cumarina y naftalimidias
Comida, drogas y cosmético	alimentos, fármacos y productos cosméticos		azo, antraquinona, carotenoide y triarilmetano

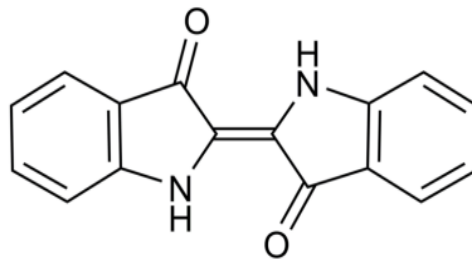
Mordantes	lana, cuero y anodizado aluminio	aplicado junto con sales de Cr	azo y antraquinona
Oxidación bases	cabello, piel y algodón	aminas aromáticas y fenoles oxidado en el sustrato	anilina negra e indeterminada estructuras
Reactivos	algodón, lana, seda y nylon	sitio reactivo en colorante reacciona con grupo funcional en fibra para unir colorante covalentemente bajo influencia de calor y pH (alcalino)	azo, antraquinona, ftalocianina, formazan, oxazina y básico
Solventes	Plásticos, gasolina, barnices, lacas, manchas, tintas, grasas, aceites, y ceras plásticas, gasolina, barnices, lacas, manchas, tintas, grasas, aceites y ceras	disolución en el sustrato	azo, trifenilmetano, antraquinona y ftalocianina
sulfúrico	algodón y rayón	sustrato aromático vaciado con sulfuro de sodio y reoxidado a insoluble que contiene azufre productos en fibra	estructuras indeterminadas
Vat o tina	algodón, rayón y lana	colorantes insolubles en agua solubilizados reduciendo con sodio hidrogenosulfito, luego agotado en fibra y reoxidado	antraquinona (incluso policíclico) quinonas) e indigoides

**Fuente:** (Hunger, 2003).

## COLORANTES SINTÉTICOS DE MAYOR USO EN LA INDUSTRIA

### Azul índigo

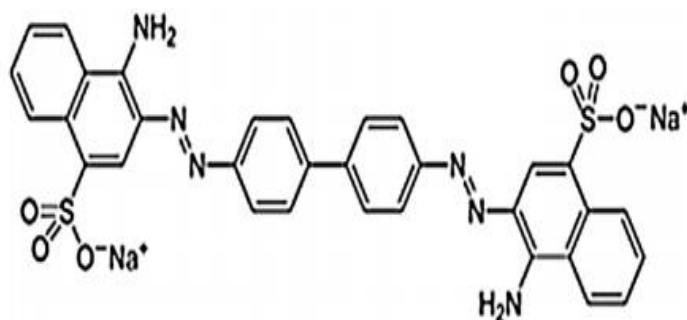
El color índigo (Vat Blue I), es un polvo cristalino azul oscuro que pertenece al grupo de los tintes tina, los cuales permanecen sin fijarse entre el 5 y el 20% durante el proceso de teñido. Este colorante se encuentra representado en la fórmula química  $C_{12}H_{10}O_2N_2$ , aunque bien puede ser de origen natural o sintético (**Fig. 2**). La estructura química del colorante índigo es un sistema conformado por un grupo H-cromóforas que consisten en un simple enlace doble entre carbonos substituidos por dos donadores NH y dos aceptores CO. Es insoluble en agua, alcohol o éter, lo cual sucede a causa de las fuerzas intermoleculares causadas por los puentes de hidrógeno, sin embargo, es soluble en cloroformo, nitrobenzeno, o ácido sulfúrico concentrado. Su uso más conocido es dentro de la industria textil, para dar color a la mezclilla (Quintero *et al.*, 2010).



**Figura 2.** Estructura química de Azul Índigo (Zhu *et al.*, 2016).

### Rojo Congo

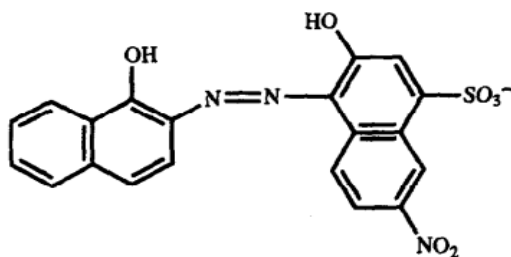
El rojo congo es un colorante azo a base de bencidina (**Fig. 3**) cuya estructura química es  $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$ . Tiene una alta solubilidad en solución acuosa y es persistente una vez vertido en un medio natural ya que durante el teñido, aproximadamente el 15% del colorante termina en aguas residuales (Chatterjee *et al.*, 2010). Colorantes sintéticos como el rojo congo en un pH ácido (1- naftalenosulfónico, 3,30 - (4,40-bifenilenbis (azo)) bis (4- amino-) sal disódica) posee facultades que dificultan el proceso de remoción en un medio natural debido a sus estructuras aromáticas complejas que le brindan estabilidad fisicoquímica, térmica y óptica (Chatterjee *et al.*, 2009).



**Figura 3.** Estructura química de Rojo Congo (Mahmoud, 2017).

### Negro de Eriocromo T (Negro Azulado)

El negro de eriocromo T (2-hidroxi-1-(1-hidroxinaftil-2-azo)-6-nitro-naftalano-4-sulfonato) es un colorante azoico aniónico (**Fig. 4**) soluble en agua con la fórmula química  $C_{20}H_{12}N_3O_7SNa$ . Este colorante contiene restos de hidroxinaftaleno y puede llegar a comportarse como indicador de metales para determinar la dureza del agua. Negro de eriocromo T tiene tres formas iónicas. La forma ácida de esta molécula ( $H_2In$ -form en  $pH < 6.2$ ) es de color rojo, la forma natural del colorante ( $HIn^{2-}$  en  $pH$  es entre 6.2 y 11.5) es azul y la forma básica ( $In^{3-}$  en  $pH$  superior a 11.5) es rojo (Gholami *et al.*, 2018). El negro de eriocromo T se utiliza mayormente en textiles y cosméticos. Es resistente a la decoloración por exposición a la luz, el agua y otros productos químicos debido a su compleja estructura química (Karimi-Shamsabadi *et al.*, 2017).



**Figura 4.** Estructura química de Negro de Eriocromo T (Madouh *et al.*, 2002).

## GENERALIDADES DE LOS HONGOS

Se cree que la antigua ciudad de Micenas es conocida con ese nombre gracias a un hongo: mykes, e incluso la ciencia que estudia los hongos, la Micología de igual forma le debe su nombre a esta palabra en griego. Estos datos históricos también nos revelan mucho con respecto al uso y conocimiento que se les ha dado a estos organismos, ya que desde tiempos antiquísimos se había logrado la producción de pan, vino y cerveza, entre otros productos a través de la fermentación que funciona con diferentes enzimas que los hongos poseen (Navarro *et al.*, 2013). No obstante, fue hasta 1969 que, Robert H. Whittaker clasificó a los hongos dentro del reino fungi y agrupó a los seres vivos en cinco reinos a nivel biológico: Monera, Protista, fungi, Plantae y Animalia (Kendrick *et al.*, 2007).

Los hongos son organismos eucariotas que se presentan en diferentes formas y tamaños (Gravesen *et al.*, 1994). El tamaño se encuentra relacionado con el tipo de células fúngicas presentes ya que puede haber células individuales (encontradas en levaduras) o de extensas cadenas cuya forma es oblonga con tamaños de  $3-8 \mu\text{m} \times 5-15 \mu\text{m}$ , con tricomas muy grandes que contienen organelos y grandes gránulos intracelulares (Sankaran *et al.*, 2010). A nivel mundial se estima que existen más de 90,000 especies de hongos, con una lista que sigue creciendo año con año. Aun así, se calcula que pueden llegar a existir 1,5 millones de especies, lo cual sería una relación 5:1, debido principalmente en las interacciones de las plantas vasculares con hongos en diferentes regiones del mundo (Hawksworth, 1991).

Hay una gran variedad de hongos, que se encuentran integrados por organismos macroscópicos y microscópicos. En general se distinguen por ser eucariotas heterótrofos no móviles, con una pared celular alrededor de la célula, que presenta notables diferencias con la pared celular de las plantas ya que tiene distintos componentes entre los cuales destaca la quitina (Zaragoza, 2017). También son un componente diverso de las comunidades microbianas del suelo, en las que funcionan como descomponedores, mutualistas micorrízicos y patógenos (O'Brien *et al.*, 2005). Como un organismo vivo los hongos presentan características comunes tales como: la irritabilidad, conductividad, contractilidad y la capacidad de reproducción. También se encuentran características propias como: la ausencia de clorofila, (no pueden realizar la

fotosíntesis), así que deben nutrirse a partir de materias orgánicas ya elaboradas (son heterótrofos); poseen la capacidad de descomponer organismos muertos o sus productos (saprofitos o saprótrofo) y obtener nutrientes de otros organismos vivos como huéspedes (Arenas, 2013).

Dentro de la misma idea, Arenas (2013), menciona la importancia de los hongos dentro de un ecosistema, ya que pueden desintegrar o reciclar casi todos los restos orgánicos y permiten así completar el ciclo de la materia. Participan en la producción del humus del suelo y también son fundamentales para su fertilidad (proceso particularmente llamado biodesintegración). Son vitales en la biosfera, pero también participan en el biodeterioro, lo cual también ha ayudado a la creación de programas de control biológico teniendo como base a estos organismos. El uso que el hombre le ha dado a los organismos del reino fungí ha sido vasto. Han estado presentes en varias civilizaciones a través de los años como parte de los procesos de fermentación (*Saccharomyces cerevisiae*) (Chen *et al.*, 2017), en su gastronomía (*Agaricus bisporus*), también se han incluido en tratamientos médicos, en especial contra el cáncer (*Lentinula edodes*), tratamientos contra el VIH (*Cordyceps sinensis*). Los componentes de los hongos tienen antimicóticos, propiedades antibacterianas, antioxidantes y antivirales, y han sido utilizados como insecticidas (Ahmad *et al.*, 2010).

En el campo de la biorremediación los hongos han presentado facultades para la eliminación de contaminantes orgánicos recalcitrantes en aguas residuales y de suelos por medio de hongos de pudrición blanca, debido a su producción de enzimas modificadoras de la lignina extracelular, que desempeñan un papel crucial en la biotransformación de contaminantes aromáticos (Rajendran *et al.*, 2017). Las características ecológicas estratégicas que, aunadas a su ambiente físico como son temperatura, actividad acuosa y aerofilia, permiten que los hongos puedan satisfacer sus requerimientos nutricionales. Los hongos patógenos requieren tejido vivo para el crecimiento, al menos durante una parte de su ciclo; en cambio, los hongos oportunistas son necrotróficos o saprotróficos, es decir, usan componentes orgánicos generados por vertebrados o compuestos orgánicos de invertebrados. De acuerdo al sustrato que utilizan, los hongos necrotróficos pueden dividirse en queratinofílicos, lipofílicos, osmofílicos (que viven en

ambiente con poca actividad acuosa), así como urofilicos, coprofilicos y simbioses endógenos (Bonifaz, 2010).

## **GENERO TRICHODERMA**

Este género de hongos son saprotróficos que pueden habitar diferentes suelos funcionando como organismo oportunistas y simbioses avirulentos de plantas. Pueden adquirir un rol benéfico para la planta en forma de micoparasitismo, competencia o antagonistas de patógenos (hongos, bacterias y nematodos) [Jalali *et al.*, 2017]. También son conocidos dentro de la industria textil al ser un degradador de colorantes en aguas residuales al secretar diferentes enzimas y desarrollándose en sustratos formados por diferentes desechos encontrados en cuerpos acuáticos (Gupta *et al.*, 2013).

Estos hongos habitan principalmente en los ecosistemas terrestres (suelos agrícolas, pastizales, bosques y desiertos) y acuáticos (Zhang *et al.*, 2005). Se reproducen en todo el mundo, teniendo en su haber más de 200 especies, caracterizándose por tener un rápido crecimiento en diversas condiciones y diferentes tipos de sustratos (Skoneczny *et al.*, 2015). Además, en un suelo natural, *Trichoderma* spp., (Teleomorph Hypocrea) es un competidor pobre a comparación de otros organismos, no obstante, si se agrega una cantidad adecuada de nutrientes puede desarrollar un crecimiento efectivo (Coventry *et al.*, 2006). Sus requerimientos para nutrirse son elementos comunes dentro de la materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, como la hojarasca, siendo esta rica en celulosa (Jiang *et al.*, 2014). Para que el micelio se pueda desarrollar, la temperatura adecuada del ambiente debe ser de entre 20 y 28 °C, sin embargo pueden llegar a adaptarse y sobrevivir en condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad ya que su crecimiento también se puede dar a temperaturas de entre 6 a 32 °C (Romero *et al.*, 2009).

Los miembros del género *Trichoderma* tienen el potencial de sintetizar y liberar enzimas como polisacaridasas, celulasas, xilanasas y quitinasas, las cuales se han aprovechado en procesos industriales (Hermosa *et al.*, 2012). El aprovechamiento comercial de estas enzimas es diverso, ya que se utilizan para producir detergente de ropa, aceite de oliva, vino, cerveza, jugos,

alimentos para animales y en la producción de algunos combustibles (Verma *et al.*, 2007). Por ejemplo, las celulasas de *T. reesei* se emplea en el blanqueo de pulpa de papel y son una alternativa al blanqueo aplicando cloro, evitando el problema ambiental del cloro que surge por dicho proceso (Buchert *et al.*, 1994).

#### CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *TRICHODERMA* SPP.

Los primeros registros de la palabra *Trichoderma* tiene una antigüedad de más de 200 años. Este término que fue acuñado en 1794 por Persoon y el cual vinculo a un estado sexual de la especie *Hypocrea* (Schuster *et al.*, 2010). *Trichoderma* spp., es un grupo de hongos filamentosos, que puede ser desglosado taxonómicamente en: Reino Mycetae (fungi), división Eumycota, subdivisión Deuteromycotina, clase Hyphomycetes, orden Hyphales (Moniliales) y familia Moniliaceae (Delira *et al.*, 2009). Clasificación también defendida por Zhang (*et al.*, 2005). Su clasificación taxonómica seria la siguiente:

**Tabla 2.** Jerarquía taxonómica de *Trichoderma* spp.

<i>Reino</i>	<i>Fungi</i>
<i>División</i>	<i>Eumycota</i>
<i>Subdivisión</i>	<i>Deuteromycota</i>
<i>Clase</i>	<i>Hyphomycetes</i>
<i>Orden</i>	<i>Moniliales</i>
<i>Familia</i>	<i>Moniliaceae</i>
<i>Género</i>	<b><i>Trichoderma</i></b>

**Fuente:** (Zhang *et al.*, 2005).

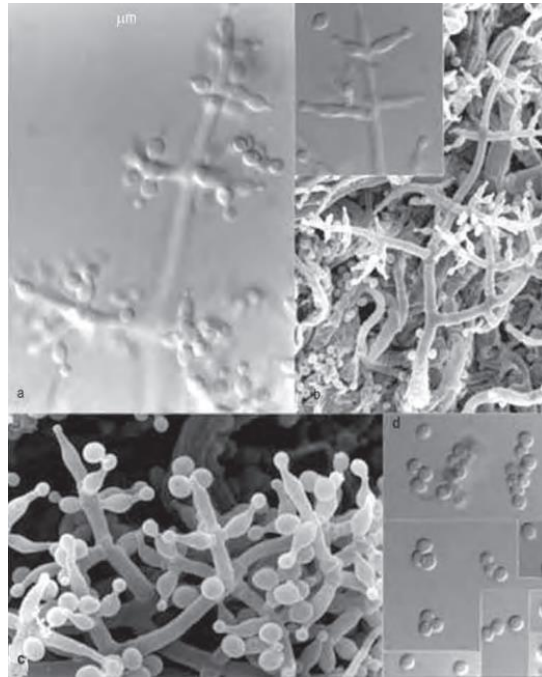
Hoy en día se cuenta con una fuerte evidencia de que el género *Trichoderma*, es joven y sigue evolucionando con distintas formas intermedias (Lieckfeldt *et al.*, 1999).

## ***TRICHODERMA HARZIANUM***

El hongo *T. harzianum* (Rifai) tiene la capacidad de producir diferentes compuestos antibióticos. Su colonización se ve facilitada por la generación de metabolitos antifúngicos, quitinasas, glucanasas y enzimas hidrolíticas que degradan los componentes de la pared celular de muchos microorganismos, que luego pueden utilizarse como fuente de nutrientes (Krupke *et al.*, 2003).

El micelio de *T. harzianum* tiene un color blanco cuando se encuentra en una fase temprana de crecimiento. Aunque eventualmente adquiere un color verde oscuro, posterior a la esporulación. El crecimiento y maduración de colonias se ve favorecido, gracias a su fácil adaptación a diferentes medios, ya que pueden encontrarse en un pH ácido de 4.5-5, localidades secas y templadas o templadas y frías, en áreas con un excesivo contenido de humedad y en lugares con un alto contenido en bióxido de carbono en la atmósfera. Estos factores impulsan un rápido desarrollo del organismo y una distribución amplia del hongo (Romero *et al.*, 2009).

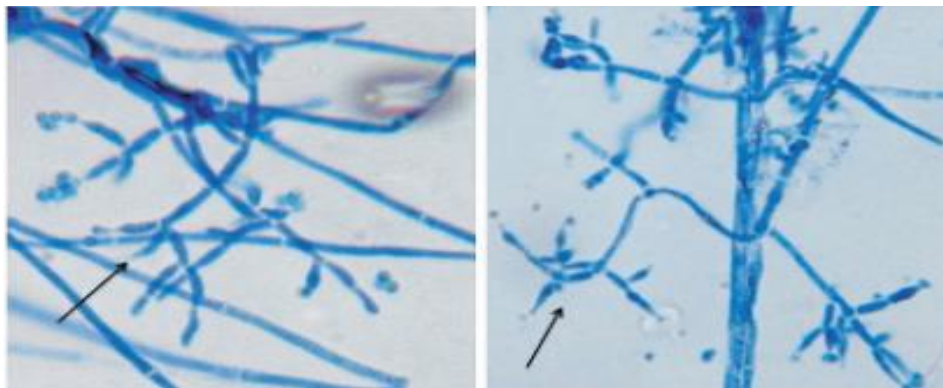
Las características microscópicas de Trichoderma presentan hifa fúngica que mide de 5-10  $\mu$  de diámetro en las cuales se forman clamidosporas intercaladas, que a veces pueden llegar a fusionarse. Su esporulación es de tipo asexual que ocurre cuando las esporas de 3-5  $\mu$  de diámetro son liberadas. Los sistemas de ramificación presentan una formación piramidal en donde se encuentran los conidióforos de color verde con un tamaño regular de 62,5- 69 x 3-4,7  $\mu$ m. De la misma forma los conidióforos forman estructuras llamadas clamidosporas que se presentan de forma intercalada y formadas por el micelio, además de ser subglobosas (**Fig. 5**), de pared dentada, color verde suave y un tamaño de 12,5-10  $\mu$ m (Bissett, 1991).



**Figura 5.** Conidióforos de *T. harzianum* (Romero-Arenas *et al.*, 2009).

### ***TRICHODERMA ATROVIRIDE***

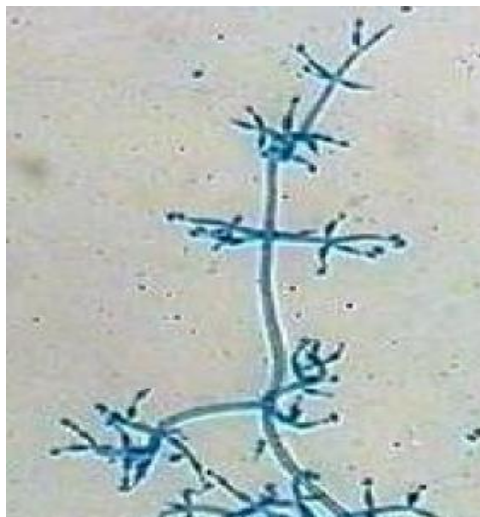
Posee hifas hialinas anchas con engrosamientos irregulares de la pared, que pueden llegar a ser lisas o en ocasiones rugosas. Sus clamidosporas están situadas de forma intercalada o pueden ser terminales en ramas cortas cuando el micelio se encuentra sumergido o en hifas aéreas, aunque no es muy frecuente este último estado. Los conidios se caracterizan por ser globosos y lisos (**Fig. 6**). Son abundantes de color verde oscuro con una superficie en el micelio que puede variar de costrosa a granular (Bisett, 1992).



**Figura 6.** Conidióforos de *Trichoderma atroviride* (Osorio *et al.*, 2013).

## ***TRICHODERMA VIRIDE***

El hongo *Trichoderma viride*. Ha sido investigado anteriormente profundizando en sus funciones como fungicida y biofertilizante. El cultivo de *T. viride* utilizando aguas industriales con residuos de almidón y PDA como medio para la producción de biofertilizante, se ha empleado para demostrar la reducción en la volatilización de NH<sub>3</sub> en un suelo alcalino mejorando simultáneamente la utilización de fertilizante por sorgo dulce (Wang-Xu *et al.*, 2017). Dentro de la especie *Trichoderma viride* se encuentran demasiados caracteres morfológicos que pueden ser fácilmente vinculados con otras especies razón por la cual confundirlas entre ellas es común. Los rasgos morfológicos de los conidios se muestran conspicuos, con forma globosa a subglobosa (**Fig. 7**), su relación de longitud / anchura es de 1.1 y 1.2  $\mu\text{m}$ , con una gran cantidad de verrugas ampliamente redondeadas (Lieckfeldt *et al.* 1999).



**Figura 7.** Conidióforos de *Trichoderma viride* (Vigo, 2011).

## JUSTIFICACIÓN

Una gran cantidad de contaminantes en forma de colorantes son desechados en aguas residuales, provenientes de diferentes industrias como la textil, papelera, cosméticos, etc. Estos desechos generan una fuerte preocupación, debido a la toxicidad que representa para diferentes formas de vida. Se sabe que los colorantes sintéticos resultan ser carcinogénicos para las personas que se encuentran en contacto con ellos, además afectan gravemente a la flora y fauna marina ya que son compuestos de sustancias estables al ataque de la luz, la temperatura y los microorganismos, resultando en compuestos recalcitrantes de baja velocidad en el proceso de despolimerización.

Los problemas relacionados con la salud y el deterioro de un ecosistema se encuentran ligadas a la producción de sustancias tóxicas, entre las más comunes se encuentran los desechos de la industria textilera, que en su gran mayoría son colorantes sintéticos. Las tecnologías físico-químicas son las más utilizadas para tratar aguas residuales, sin embargo, existen diferentes dificultades para que se establezcan completamente como métodos adecuados para la eliminación de tóxicos, esto debido a que su costo llega a ser muy elevado, son difíciles de manejar y no poseen un porcentaje alto de efectividad en su producto final.

Los anteriores problemas mencionados son preocupantes puesto que muchos empresarios en México poseen empresas pequeñas, razón por la cual deciden omitir este proceso de remoción para las sustancias tóxicas debido a su alto costo. Los empresarios con mayor capital utilizan dichos métodos pero la complejidad que representa el uso de estas tecnologías provoca un resultado ineficiente y problemático en gran parte del tiempo debido a que pueden llegar a crear un grado más alto de contaminación.

Debido a lo anterior, es necesario la búsqueda de tratamientos que funcionen de manera efectiva, que sean compatibles con el ambiente y sean económicamente accesibles. En el presente trabajo abordara un tipo de biorremediación vinculado al uso de hongos y en específico a tres cepas pertenecientes al género *Trichoderma* (*viride*, *atroviride* y *harzianum*). Los estudios hechos con

hongos de este género son escasos, sin embargo han demostrado ser eficientes de acuerdo a su capacidad para absorber y degradar compuestos tóxicos de forma rápida, puesto que estos no necesitan luz solar, crecen en lugares húmedos y son propensos a crecer en pH ácido. Aunado a esto, su obtención no representa altos costos ya que su producción no es realmente compleja y el manejo de estos organismos no posee grandes dificultades, debido a que muestra una gran afinidad a diferentes desechos químicos.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la viabilidad de remoción de colorantes industriales con el uso de cepas nativas de *Trichoderma* spp., en condiciones de laboratorio.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Evaluar la tasa de desarrollo y la velocidad de crecimiento de tres cepas de *Trichoderma* spp., a diferentes concentraciones de los colorantes: azul índigo, rojo congo y negro de eriocromo T.
- b) Determinar el porcentaje de esporulación de tres cepas de *Trichoderma* spp., en diferentes concentraciones de los colorantes industriales: azul índigo, rojo congo y negro de eriocromo T
- c) Evaluar el porcentaje de remoción de tres cepas de *Trichoderma* spp. en los colorantes industriales: azul índigo, rojo congo y negro de eriocromo T

## **HIPÓTESIS**

Las cepas nativas de *Trichoderma* spp., presentaran alta capacidad para la remoción de colorantes industriales (azul índigo, rojo congo y negro de eriocromo T), sin ver afectado su desarrollo y crecimiento.

## METODOLOGÍA

El experimento se desarrolló en el laboratorio 204 de Hongos y Patología vegetal dentro del Centro de Agroecología del Ecocampus-Valsequillo (Val-1) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). Las cepas nativas de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* y *Trichoderma atroviride*, empleadas en el estudio se encuentran almacenadas en la colección biológica del laboratorio 204. Los colorantes azul índigo, negro de eriocromo T y rojo congo fueron obtenidos en la facultad de Ciencias Químicas de la BUAP.

## MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo se realizaron por esterilización húmeda en autoclave a 121 °C y 15 lb (Romero *et al.*, 2013)., posteriormente, se vertieron 30 mL de medio dextrosa de papa (BD Bioxon de 450 g.) en cajas Petri, una vez gelificado y pasado el tiempo de verificación de esterilidad, se inocula en condiciones de higiene, lavando una meza con agua y jabón, consecuentemente se limpia, se desinfecta con alcohol y se colocan dos mecheros a lado de la caja Petri que va a ser inoculada con discos de cada una de las cepas del genero *Trichoderma* para evitar en mayor medida posible la contaminación del medio por parte de bacterias u otros hongos.

Una vez realizada la esterilización, se inició con el experimento al formar un grupo testigo (**Fig.8**) hecho solamente con agua destilada (250 mL) y PDA (9.75 gr). Posteriormente se vertió el medio en 9 cajas Petri necesarias para las tres repeticiones por cada cepa de *Trichoderma* (tres cajas por cepa). Este grupo testigo sirvió como punto de comparación entre un medio normal y uno con colorantes para observar los cambios en el crecimiento de las cepas (**Fig.11**).

Las cepas del genero *Trichoderma* fueron inoculadas con un solo disco en un medio de cultivo con los nutrientes adecuados, además fueron vertidos tres tipos de colorantes en las placas Petri con PDA a diferentes concentraciones (100%, 75% y 25%) con tres repeticiones para cada concentración (**Fig. 9 y 10**).

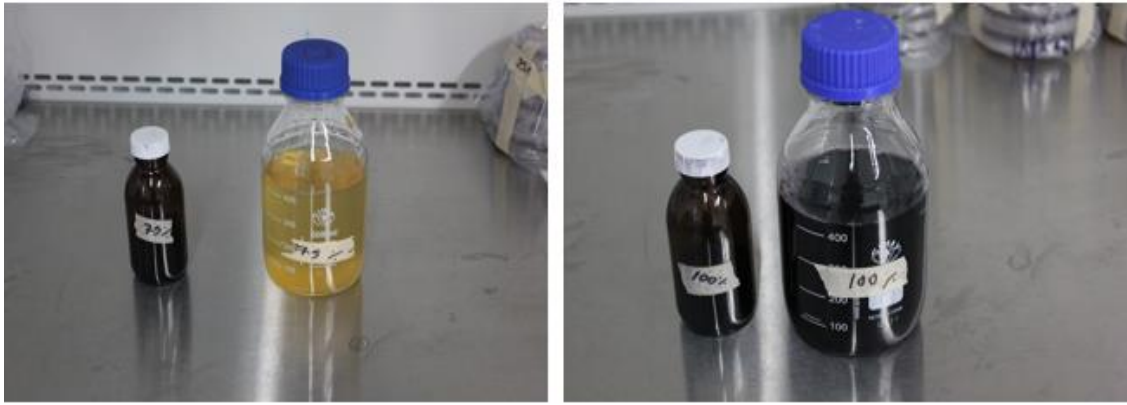


**Figura 8.** Preparación de agar dextrosa de papa gelificado e inoculación del grupo testigo con tres cepas de *Trichoderma* spp.

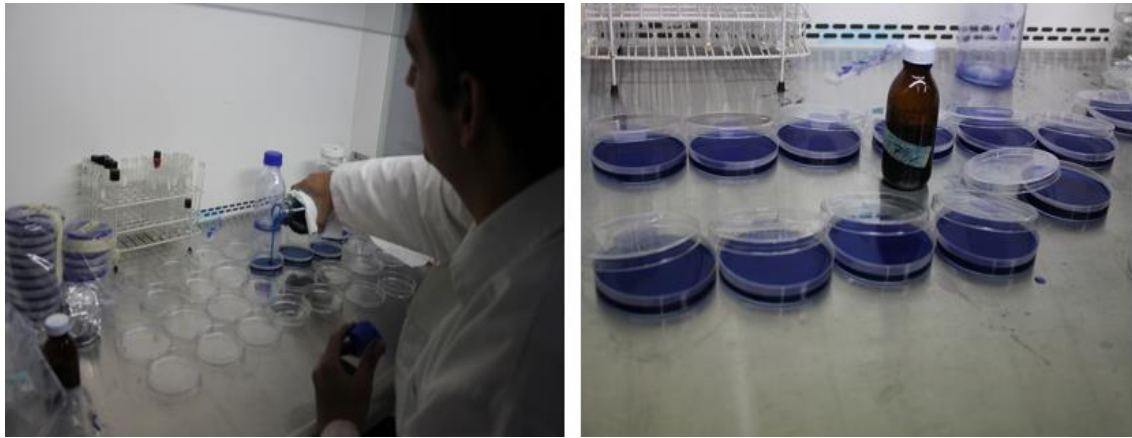
#### **PREPARACIÓN DE LOS COLORANTES**

El primer experimento consistió en realizar medios de cultivo con agar de dextrosa de papa (PDA) mezclado con el colorante azul índigo, negro de eriocromo T y rojo congo. Los medios de cultivo se prepararon en frascos al verter 17. 55 g de PDA en 450 mL de agua destilada, posteriormente se esterilizó en autoclave (Singh *et al.*, 2012).

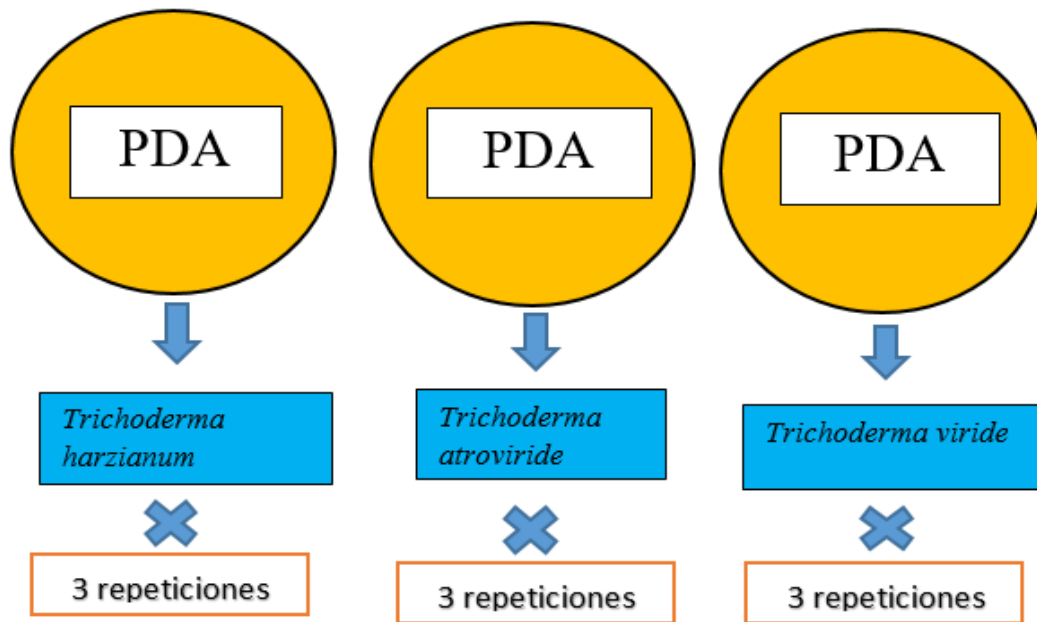
Se empleó 1 g de acuerdo al peso molecular de cada colorante, en 100 mL de agua destilada, posteriormente se realizaron disoluciones en tres diferentes frascos para lograr concentraciones al 100%, 75% y 25%. En cuanto a las repeticiones por cajas Petri, se emplearon tres cajas para cada una de las cepas y se inocularon en 30 mL de PDA, en adición a las diferentes concentraciones de los colorantes (**Fig. 12, 13 y 14**).



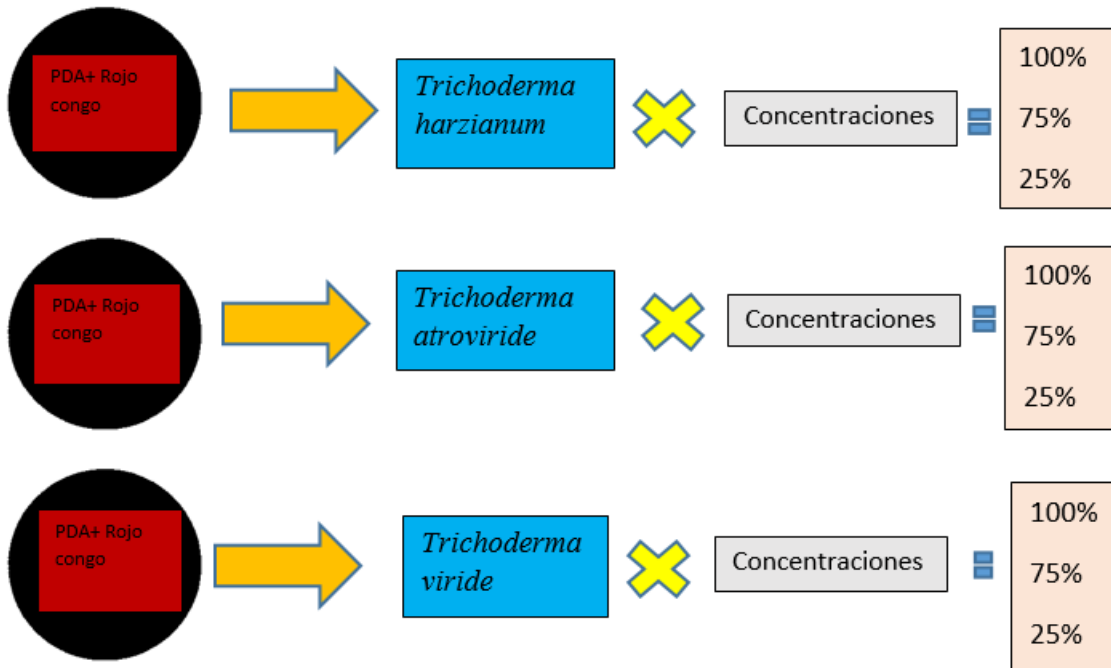
**Figura 9.** Preparación del agar de dextrosa de papa gelificado con colorantes a diferentes concentraciones.



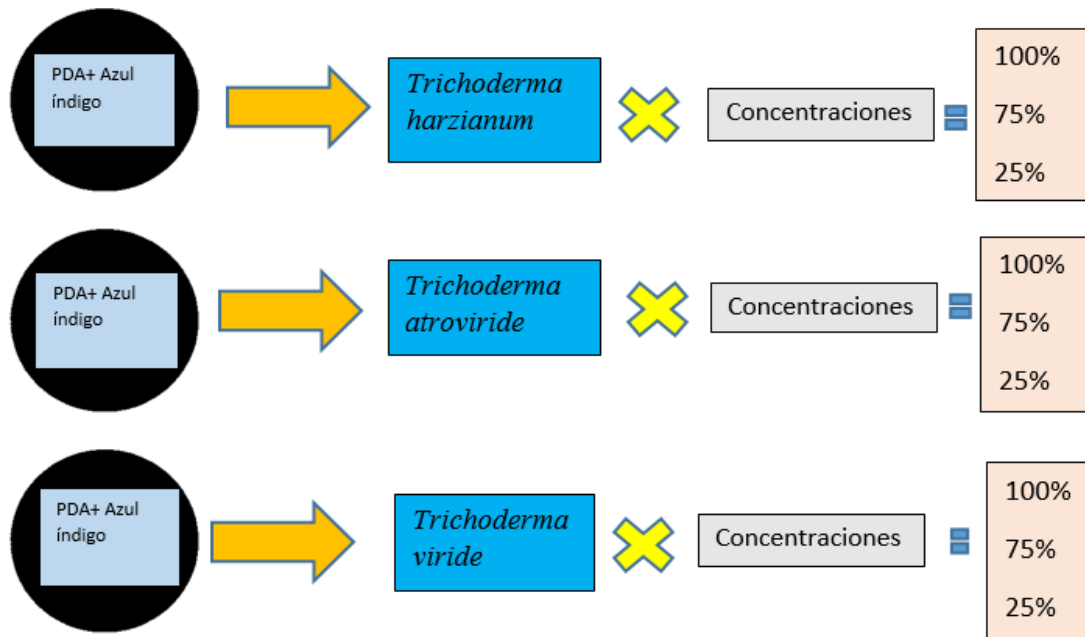
**Figura 10.** Vertido del agar de dextrosa de papa con el colorante azul índigo en cajas Petri.



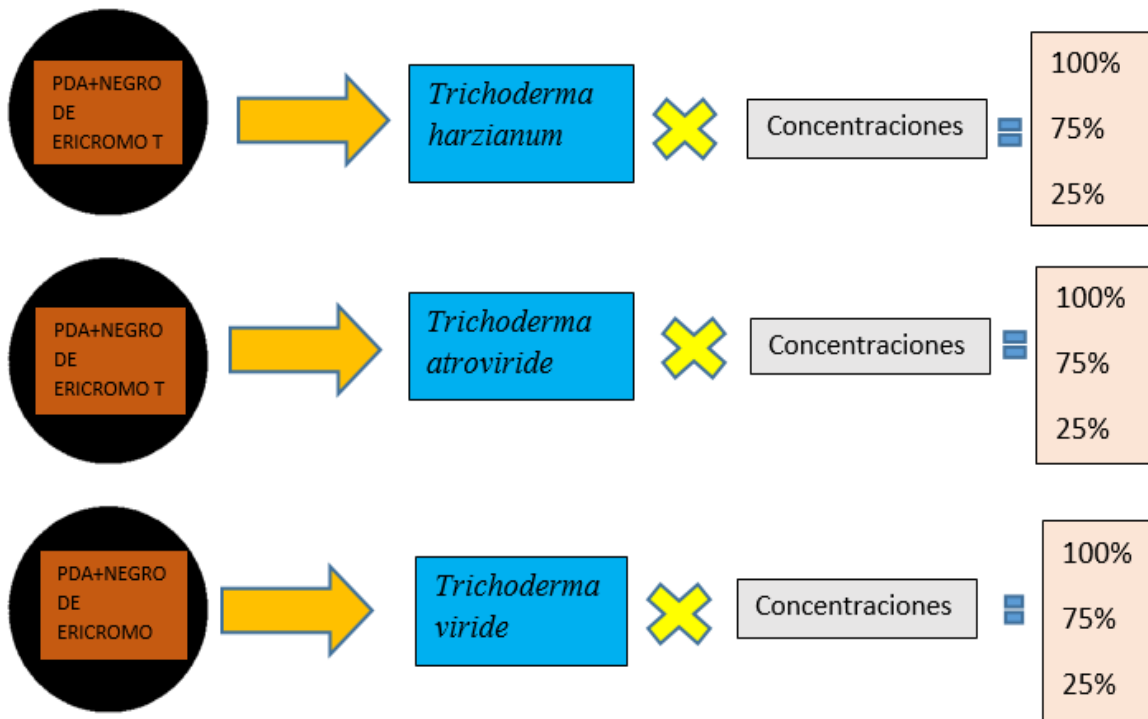
**Figura 11.** Grupo testigo, PDA inoculado con *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* y *Trichoderma atroviride*, con repeticiones de tres placas por cada cepa.



**Figura 12.** Grupos experimentales PDA + Rojo congo (696.665 P.M., a 1 M) inoculado con *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* y *Trichoderma atroviride*, a concentraciones de 100 %, 75%, y 25% con repeticiones de tres placas por cada cepa.



**Figura 13.** Grupos experimentales PDA + Azul índigo (266.27 P.M., a 1 M) inoculado con *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* y *Trichoderma atroviride*, a concentraciones de 100 %, 75%, y 25% con repeticiones de tres placas por cada cepa.



**Figura 14.** Grupos experimentales PDA + Negro de eriocromo T (461,381 P.M., a 1 M) inoculado con *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* y *Trichoderma atroviride*, a concentraciones de 100 %, 75%, y 25% con repeticiones de tres placas por cada cepa.

#### DETERMINACIÓN DE LA TASA DE CRECIMIENTO Y DESARROLLO

Se calculó la tasa de desarrollo y la velocidad de crecimiento ( $TD = \frac{VC \text{ inicial} - VC \text{ final}}{\text{número de días}}$ ) para comparar la diferencia de comportamiento entre cepas (Romero-Arenas *et al.*, 2012), para ello se traza un eje sobre las cajas Petri tomando como referencia el centro del implante y se mide diariamente con una regla (Carreño *et al.*, 2013). Además, se determinó el pH inicial con un potenciómetro modelo PHI 34 marca Beckman (**Fig.15**) provisto con un electrodo para sólidos (Vázquez *et al.*, 2002).



**Figura 15.** Mediciones de pH de los tres colorantes a diferentes concentraciones.

### CONTEO DE ESPORAS

Se inocularon discos de todos los tratamientos en tubos de ensayo con capacidad de 10 mL, que contenían agua destilada estéril e inoculados con un disco de 0.5 cm de diámetro (Agamez *et al.*, 2008), provenientes de cada una de las tres cepas que se obtuvieron de las cajas Petri con cada uno de los colorantes a diferentes concentraciones y de los tratamientos testigo, para realizar disoluciones de  $1 \times 10^8$ . Posteriormente los tubos fueron agitados en un vortex (Nascimento *et al.*, 2011).

Para obtener el número total de esporas, se observó una gota de 1 ml (calibrada con micropipeta) proveniente de las diferentes concentraciones con esporas en una cámara de Neubauer (Lumycite, Propper Manufacturing Co. Inc. Long Island, NY) (Romero *et al.*, 2013).

### ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO

Para realizar el análisis espectrofotométrico se midió la absorbancia de las muestras hechas con las diferentes concentraciones de azul índigo, rojo congo y negro de eriocromo T, para este proceso se evitó la filtración de sólidos con papel de filtro Whatman No. 1 (**Fig.16**) que dejaba pasar el líquido a través de una máquina de succión al vacío  $\frac{1}{2}$  Hp (Singh *et al.*, 2012). Ya filtrado el líquido sobrenadante, se centrifugó a 5,000 rpm durante 5 minutos, para ser

colocado en una placa de plástico (**Fig.17**) (Namasivayam *et al.*, 2002). Para las lecturas de absorbancia se utilizó un espectrofotómetro Thermo Spectronic (**Fig.18**) utilizando longitudes de onda con un rango de 494 nm (para rojo ácido), 700 nm (para azul índigo) y 430 nm (negro de eriocromo T) y se anotaron los resultados de cada una de las lecturas hechas durante siete días (Cardona *et al.*, 2009).

#### **PORCENTAJE DE DECOLORACIÓN DEL COLORANTE**

La siguiente formula de Singh *et al.* (2017) fue utilizada para medir la absorbancia del colorante:

$$\text{Porcentaje de tinte degradado} = \frac{\text{Absorvancia inicial} - \text{Absorvancia final}}{\text{Absorvancia inicial}} \times 100$$



**Figura 16.** Filtración del colorante.



**Figura 17.** Colorante en placa de plástico.



**Figura 18.** Lecturas en espectrofotómetro.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se procesaron utilizando el programa *SPSS Statistics* versión 17 para Windows. Posteriormente, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) además de aplicar una prueba Tukey-Kramer de comparaciones múltiples ( $\alpha = 0.05$ ) para determinar las diferencias estadísticas entre tratamientos (Romero *et al.*, 2013).

Se realizaron tablas para graficar las diferencias que existieron en el número de esporas y el porcentaje de remoción con el software Microsoft Excel 2010. Las diferencias se realizaron en relación a las cepas por concentración de colorante (Mendoza *et al.*, 2011).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las mediciones hechas solamente al tratamiento testigo (**Fig.20**) con un pH: 6.1, señalaron una velocidad de crecimiento más rápida en los tratamientos inoculados con discos de *Trichoderma viride*, en comparación con las otras dos cepas. Sin embargo cuando se comparó la velocidad de crecimiento del tratamiento testigo con los tratamientos hechos a base de los colorantes, se observó que los tratamientos hechos con negro de eriocromo T mostraron una respuesta de crecimiento más rápida, además de ser el colorante con el crecimiento de biomasa más abundante. En cuanto a la velocidad de crecimiento más lenta, se pudo observar a la cepa *Trichoderma atroviride*, creciendo en aquellos tratamientos hechos con el colorante azul índigo en todas las concentraciones, pero con una inhibición de crecimiento más pronunciada en la concentración al 100%, además de mostrar una biomasa menor a la encontrada en negro de eriocromo T, pero mayor a aquella observada en rojo congo. El micelio en los tratamientos hechos con rojo congo creció a una velocidad similar al tratamiento testigo, la biomasa en general fue prácticamente escasa, no solo en *T. atroviride*, ya que el resto de las cepas tuvieron una generación exigua de esta. La cepa *Trichoderma harzianum* fue la única con crecimiento homogéneo en todos los tratamientos.

En cuanto a la tasa de desarrollo, las diferencias fueron más notorias, ya que la cepa *Trichoderma viride* mostró una tasa reducida en el colorante azul índigo, sin mostrar una gran diferencia en todas sus concentraciones. *Trichoderma harzianum* mostró la mayor tasa de desarrollo en los tratamientos elaborados con negro de eriocromo T, notándose un índice mayor de desarrollo en las concentraciones al 75 y 25%.

### VELOCIDAD DE CRECIMIENTO Y TASA DE DESARROLLO

Las tablas 3 y 4 presentan diferencias entre la velocidad de crecimiento y la tasa de desarrollo, teniendo en el grupo de crecimiento a la letra (**a**) como aquellas cepas que se comportaron de forma igual o similar al grupo testigo en comparación con las que crecieron en el colorante, la letra (**b**) representa a aquellas cepas que tuvieron un proceso más rápido de

crecimiento en los tratamientos hechos con colorante en comparación al grupo testigo, y la letra (c) representa a aquellos tratamientos con colorantes en los cuales las cepas utilizadas vieron inhibido su crecimiento o desarrollo en comparación con los grupos testigos.

El efecto de los colorantes en el crecimiento de las tres cepas utilizadas, mostraron una distribución variada, (**Fig.19**) entre los tratamientos a diferentes concentraciones (100%, 75%, 25%) más el grupo testigo.

**Tabla 3.** Velocidad de crecimiento de tres cepas del genero *Trichoderma* en los colorantes azul índigo, rojo congo y negro de eriocromo T a diferentes concentraciones.

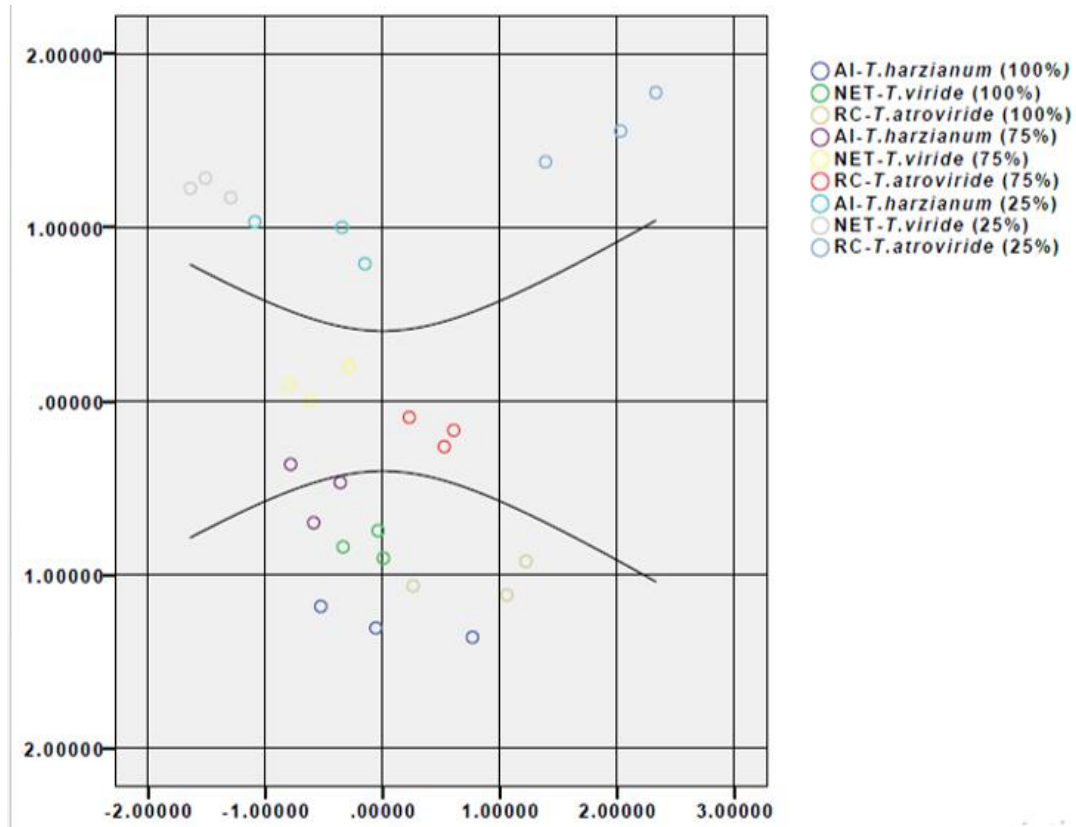
V.Crecimiento (colorantes)						V.Crecimiento (testigo)			
Colorante (%)	Cepa	Media		D.Estandar	Crecimiento	Grupo Testigo	Cepa	Media	D.Estandar
(A.I)100%	<i>T.harzianum</i>	.5000	±	.00000	a		<i>T.harzianum</i>	0,452	
(A.I)75%		.5000	±	.00000	a				
(A.I)25%		.4952	±	.00826	a				
(N.E)100%		.5000	±	.00000	a				
(N.E)75%		.5000	±	.00000	a				
(N.E)25%		.4905	±	.01651	a				
(R.C)100%		.4857	±	.02477	a				
(R.C)75%		.5000	±	.00000	a				
(R.C)25%		.4714	±	.04948	a				
V.Crecimiento (colorantes)						V.Crecimiento (testigo)			
Colorante (%)	Cepa	Media		D.Estandar		Grupo Testigo	Cepa	Media	D.Estandar
(A.I)100%	<i>T.viride</i>	.4667	±	.10104	a		<i>T.viride</i>	0,476	
(A.I)75%		.7667	±	.14434	b				
(A.I)25%		.7750	±	.04330	b				
(N.E)100%		.4917	±	.03819	a				
(N.E)75%		.5000	±	.00000	a				
(N.E)25%		.7250	±	.02500	b				
(R.C)100%		.4833	±	.02887	a				
(R.C)75%		.4833	±	.01443	a				
(R.C)25%		.4917	±	.01443	a				
V.Crecimiento (colorantes)						V.Crecimiento (testigo)			
Colorante (%)	Cepa	Media		D.Estandar		Grupo Testigo	Cepa	Media	D.Estandar
(A.I)100%	<i>T.atroviride</i>	.2334	±	.01651	c		<i>T.atroviride</i>	0,486	
(A.I)75%		.3666	±	.01651	c				
(A.I)25%		.3762	±	.02184	c				
(N.E)100%		.2095	±	.02184	c				
(N.E)75%		.4714	±	.04948	a				
(N.E)25%		.5000	±	.00000	a				
(R.C)100%		.2857	±	.02860	c				
(R.C)75%		.5000	±	.00000	a				
(R.C)25%		.5000	±	.00000	a				

Fuente: propia.

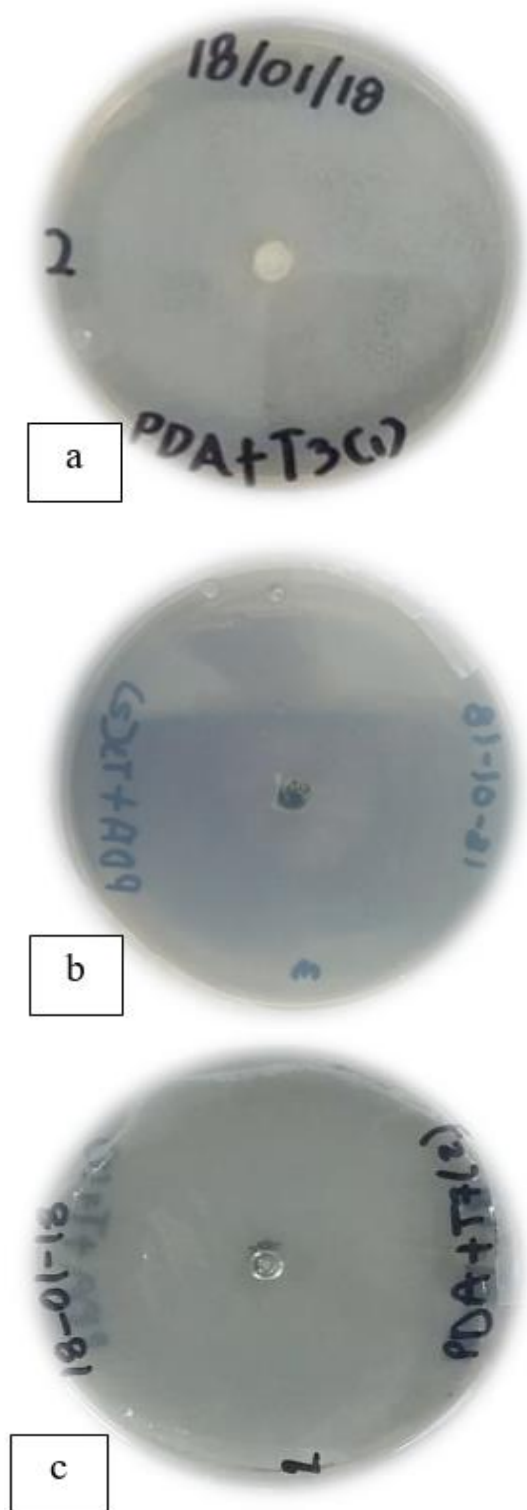
**Tabla 4.** Tasa desarrollo de tres cepas del genero *Trichoderma* en los colorantes azul índigo, rojo congo y negro de eriocromo T a diferentes concentraciones.

T.Desarrollo (colorantes)						T.Desarrollo (testigo)			
Colorante (%)	Cepa	Media		D.Estandar	Crecimiento	Grupo Testigo	Cepa	Media	D.Estandar
(A.I)100%	<i>T.harzianum</i>	.5000	±	.85203	c		<i>T.harzianum</i>	0,667	0,40415
(A.I)75%		.5333	±	.80829	c				
(A.I)25%		.2000	±	.85203	c				
(N.E)100%	<i>T.harzianum</i>	.7333	±	.06927	b				
(N.E)75%		.5000	±	.00000	c				
(N.E)25%		.9667	±	.45717	b				
(R.C)100%	<i>T.harzianum</i>	.8000	±	.91652	b				
(R.C)75%		.4000	±	.69282	c				
(R.C)25%		.6000	±	.34641	a				
T.Desarrollo (colorantes)						T.Desarrollo (testigo)			
Colorante (%)	Cepa	Media		D.Estandar		Grupo Testigo	Cepa	Media	D.Estandar
(A.I)100%	<i>T.viride</i>	.1500	±	.08660	c		<i>T.viride</i>	0,667	0,40415
(A.I)75%		.1500	±	.60622	c				
(A.I)25%		.3500	±	.45826	c				
(N.E)100%	<i>T.viride</i>	.3500	±	.15000	c				
(N.E)75%		.5000	±	.17321	c				
(N.E)25%		.9500	±	.25981	b				
(R.C)100%	<i>T.viride</i>	.8000	±	.67639	b				
(R.C)75%		.5000	±	.15000	c				
(R.C)25%		.0000	±	.43301	c				
T.Desarrollo (colorantes)						T.Desarrollo (testigo)			
Colorante (%)	Cepa	Media		D.Estandar		Grupo Testigo	Cepa	Media	D.Estandar
(A.I)100%	<i>T.atroviride</i>	.5667	±	.45717	a		<i>T.atroviride</i>	0,633	0.6333
(A.I)75%		.5000	±	.70000	c				
(A.I)25%		.9667	±	.76163	b				
(N.E)100%	<i>T.atroviride</i>	.8667	±	.06927	b				
(N.E)75%		.2000	±	.21244	c				
(N.E)25%		.4333	±	.40415	c				
(R.C)100%	<i>T.atroviride</i>	.3667	±	.06927	c				
(R.C)75%		.2667	±	.40415	c				
(R.C)25%		.7667	±	.45832	b				

Fuente: propia.



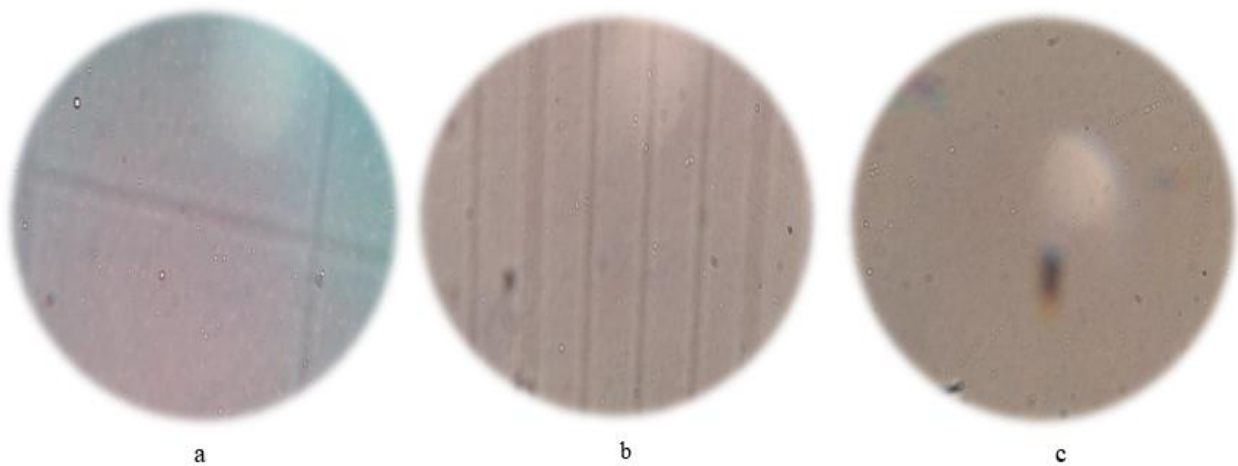
**Figura 19.** Distribución de datos relacionados a la velocidad de crecimientos para las diferentes cepas de *Trichoderma* spp. En los colorantes azul índigo, rojo congo y negro de eriocromo T hechos en tres diferentes concentraciones (100%, 75%, 25%,)



**Figura 20.** Grupos testigos: a) *T. atroviride* b) *T. viride* y c) *T. harzianum* en medio PDA.

## Conteo de esporas

Los medios de PDA presentaron resultados con diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), con respecto a la producción de esporas, que se pudo encontrar por cada cepa. El conteo de esporas en *Trichoderma viride*, dio un total de 274 esporas, una vez que se terminaron de contar todas las esporas encontradas en los 8 cuadros de la cámara de Neubauer. *Trichoderma atroviride*, mostro un total de 541 esporas, número que termino siendo superado por las 739 esporas de *Trichoderma harzianum* (**Fig. 21**), con estos datos se puede determinar que las cepas actuaron de forma normal en cuanto a la generación de esporas, sin embargo *Trichoderma viride* debido a su baja tasa de desarrollo y esporulación, puede inferirse que podría tener mejores resultados en un medio con más nutrientes (Singh *et al.*, 2007).



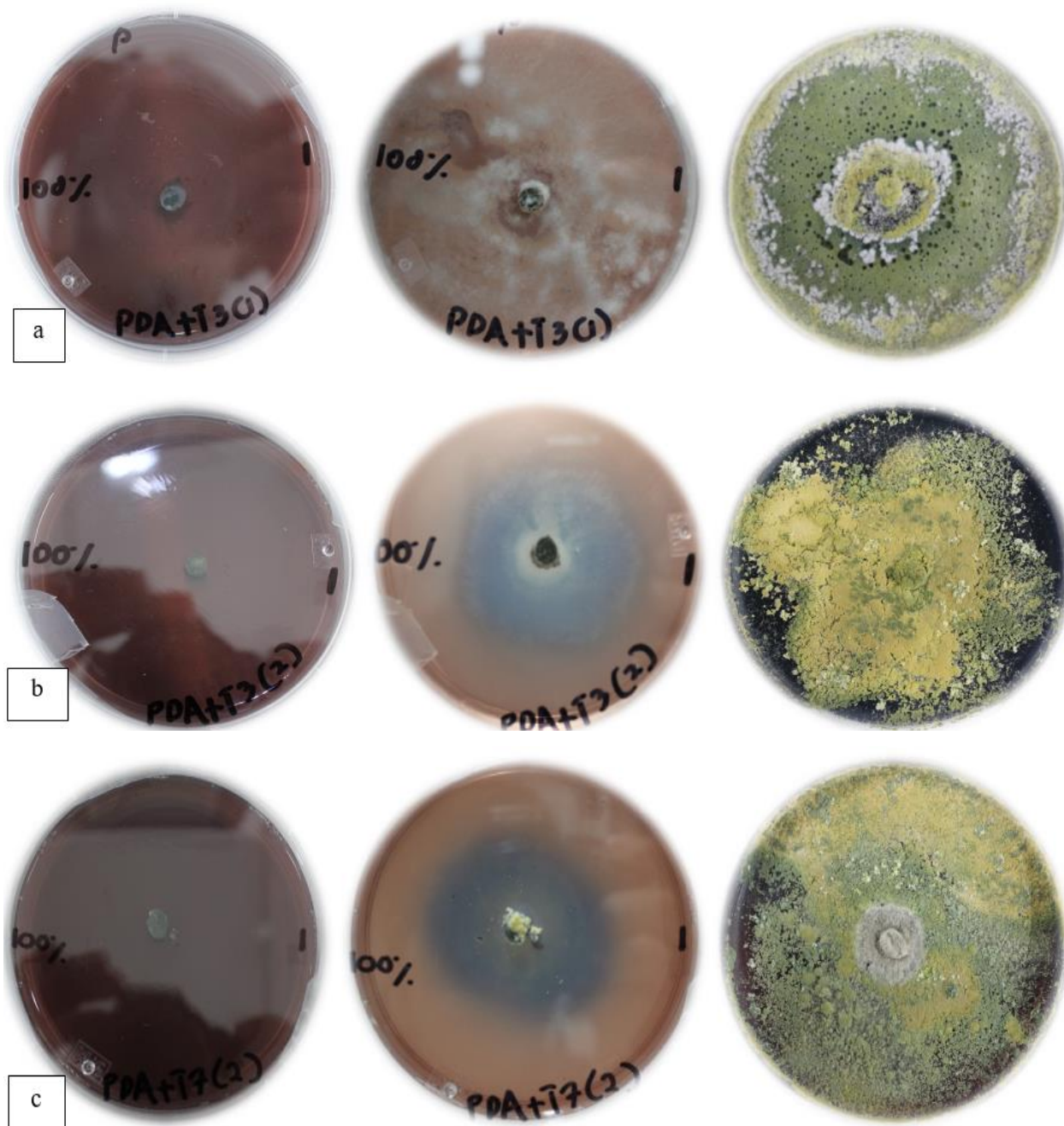
**Figura 21.** No. Esporas: a) *Trichoderma atroviride*, b) *Trichoderma viride* y c) *Trichoderma harzianum*, vistas en cámara de Neubauer “Grupo testigo”.

## NEGRO DE ERIOCROMO T

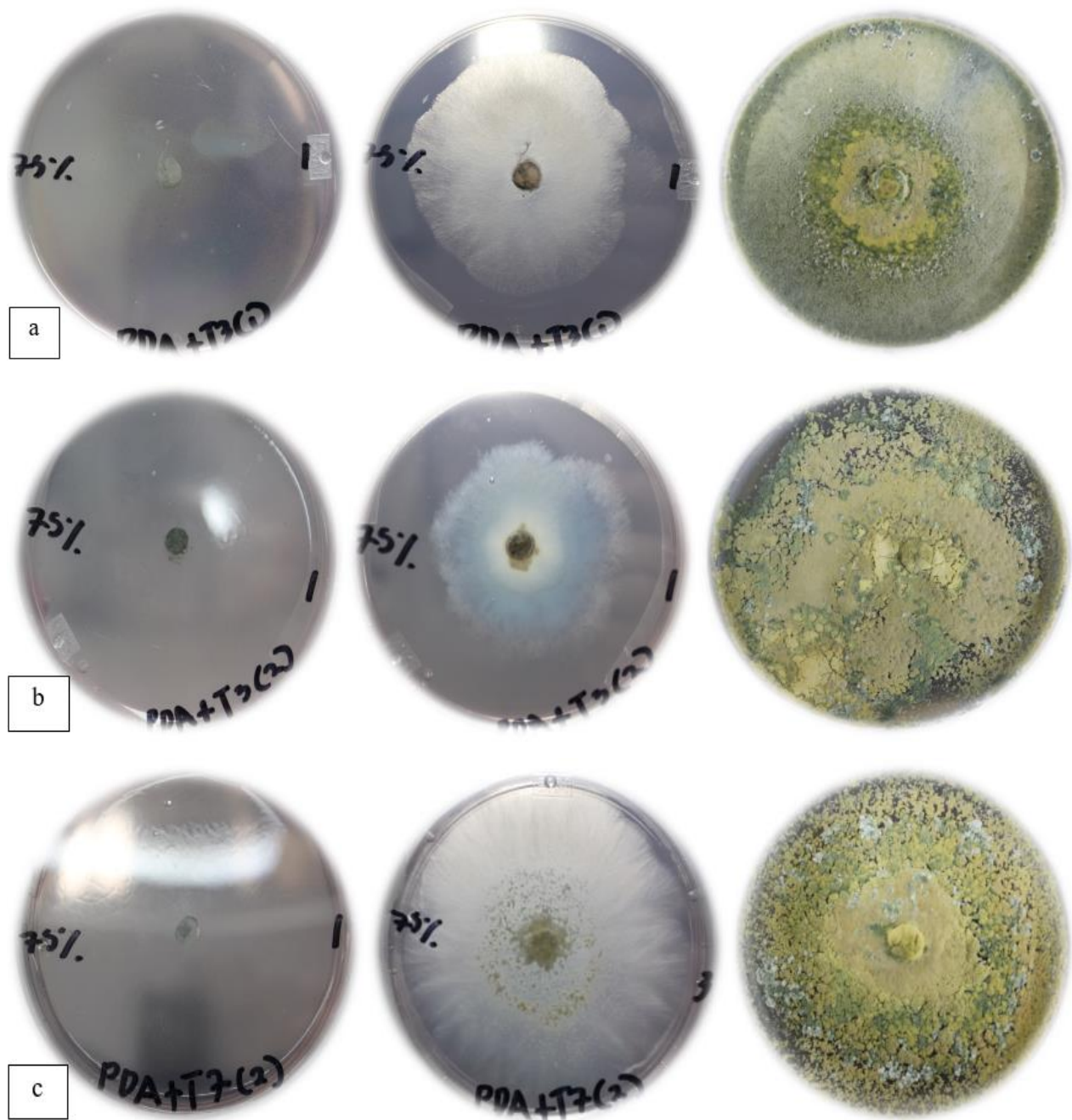
### Crecimiento y desarrollo del micelio

En cuanto al crecimiento del micelio en negro de eriocromo T (pH: 6.2), los resultados observados en los diferentes tratamientos fueron categóricos; los diferentes tratamientos con las tres cepas de *Trichoderma* spp., mostraron resultados desde el primer día, observándose un halo de micelio bien formado en donde se había colocado el disco de las cepas, alrededor del halo de micelio se presentó un color azul, lo cual indica que el micelio había empezado por absorber el colorante, degradándolo en el interior de sus células, como lo reporta Tatarko *et al.* (1997) con rojo congo.

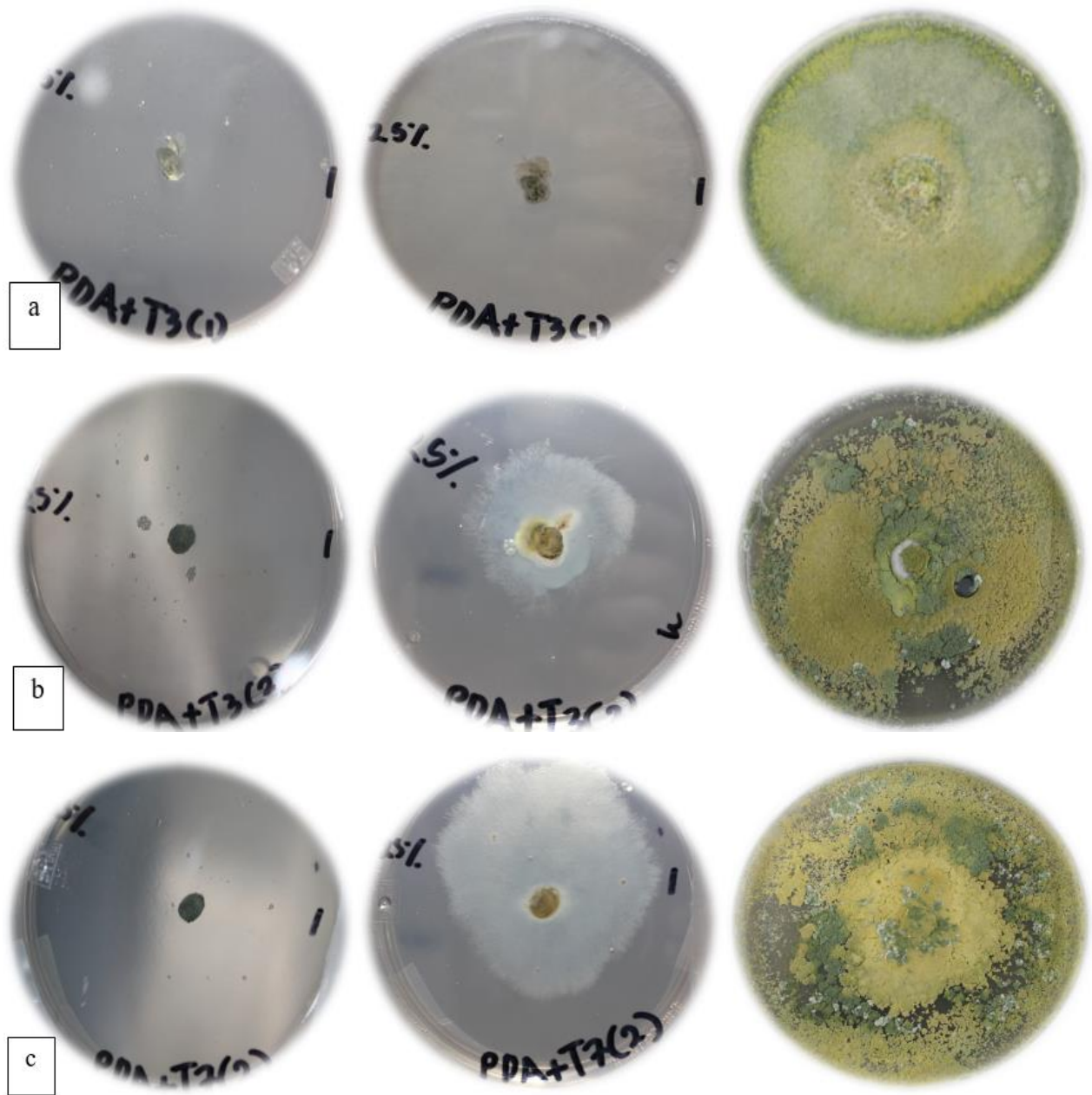
El crecimiento de las cepas en los diferentes tratamientos: 100% (**Fig. 22**), 75% (**Fig. 23**), y 25% (**Fig. 24**), se llegó a distinguir que el micelio había cubierto toda la placa, llegando al límite (3,5 cm) en el cuarto día. La esporulación fue notable al generar una gran cantidad de biomasa en comparación a los tratamientos con rojo congo y azul índigo, sin embargo, vale la pena mencionar que la coloración del micelio pasó de blanco a verde y posteriormente a un color amarillento para todas las cepas, en el colorante Negro de eriocromo T, lo que puede indicar un comportamiento diferente para las cepas de *Trichoderma* spp., debido al nivel de pH como lo menciona Kaushal *et al.*, (2017).



**Figura 22.** Decoloración de NET en medio de PDA: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum*, en una concentración al 100%.



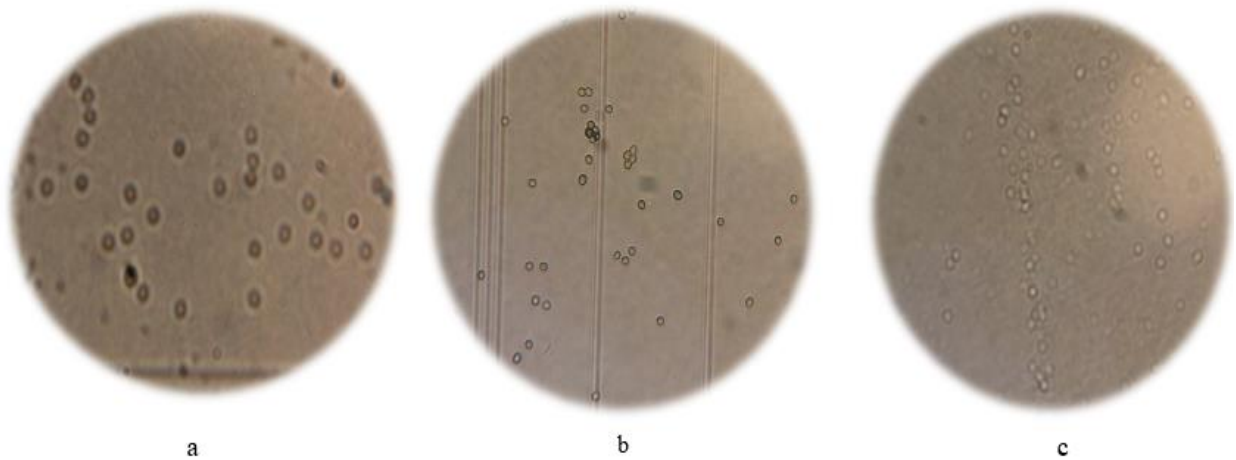
**Figura 23.** Decoloración de NET en medio de PDA: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum*, en una concentración al 75%.



**Figura 24.** Decoloración de NET en medio de PDA: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum*, en una concentración al 25%.

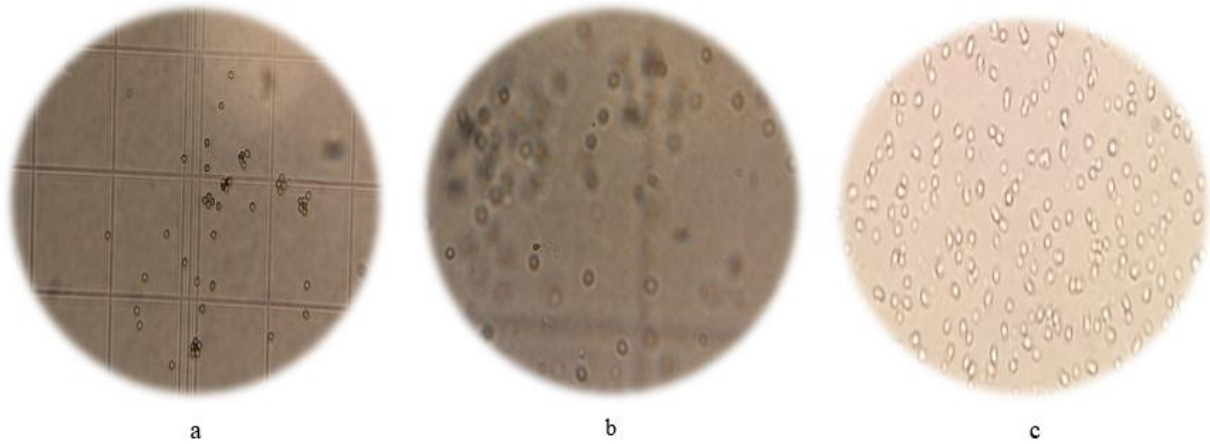
## Conteo de esporas

En cuanto a la producción de esporas, cada cepa mostró una gran proliferación con diferencias significativas (**Fig. 25**), *T. atroviride* en la concentración al 100% mostró un total de 1,138 esporas (al sumarse todas las esporas contadas en 8 segmentos de la cámara de Neubauer). Mientras que en la cepa *T. harzianum*, el número de esporas obtenido a una concentración al 100% fue de 1,017. La cepa de *T. viride* mostró resultados más bajos en comparación a las cepas *T. atroviride* y *T. harzianum*; ya que el número total de esporas fue de 909 en la concentración al 100% de Negro de eriocromo T.



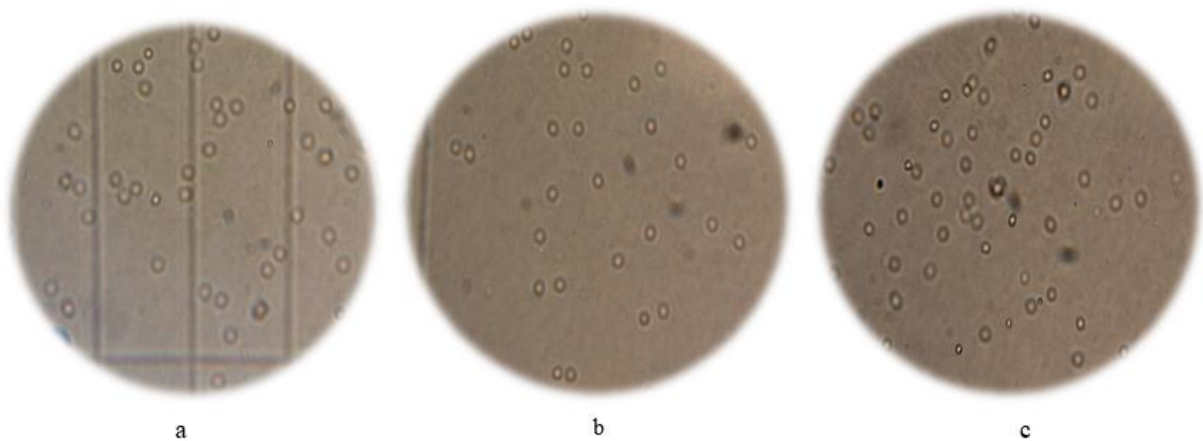
**Figura 25.** Esporas de: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum*, en NET al 100%.

En el 75% de concentración, se obtuvo un total de 1,258 esporas en el conteo hecho para *T. atroviride*, en el conteo para *T. viride*, el número de esporas observadas obtenidas no difirieron mucho en cantidad (965) con respecto a *T. atroviride*, sin embargo, el verdadero cambio se notó en el número de esporas observadas en la cepa *T. harzianum*, pues el número total de esporas encontradas fue de 2,361, mostrando el doble de esporas encontradas (**Fig. 26**).



**Figura 26.** Esporas de: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum*, en NET al 75%.

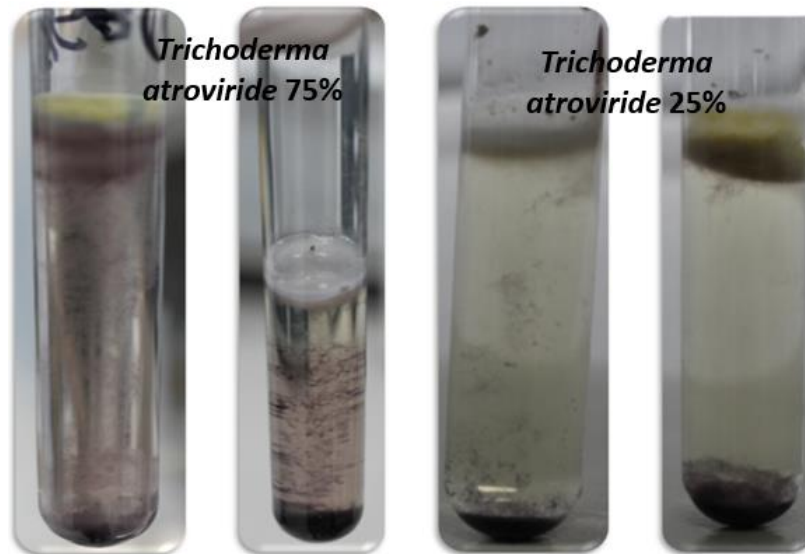
Al observar la concentración hecha al 25% de colorante NET, los cambios fueron significativos, pues la cantidad de esporas disminuyó marcadamente. La producción de esporas entre las tres cepas no tuvieron comportamientos diferentes entre sí, ya que *T. harzianum*, tuvo un total de 120 esporas, *T. atroviride*, pudo desarrollar 173 esporas y *T. viride*, fue la cepa con mayor número de esporas al generar solo 272. Mostrando que a mayor concentración de colorante NET, las cepas esporulan más, pero sin observarse una gran diferencia con respecto a concentraciones más bajas del colorante (**Fig. 27**).



**Figura 27.** Esporas de: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum*, en NET al 25%.

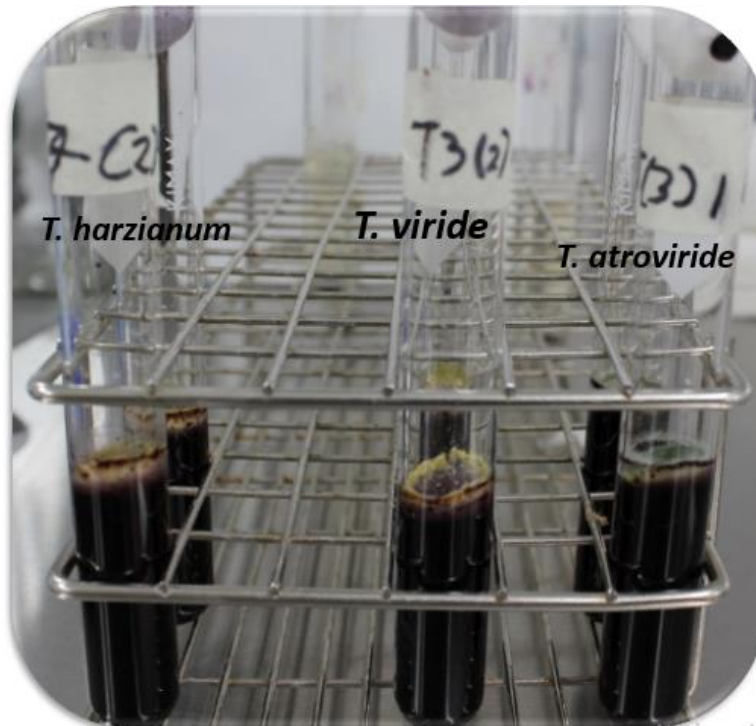
## Espectrofotometría

En el tratamiento de negro de eriocromo T con extracto de malta (461,381 P.M., a 1 M), se pudo apreciar el proceso de remoción alrededor del hongo, además de provocar una gran precipitación al fondo del tubo (**Fig. 28**) aumentando su acción en concentraciones al 75 y 25%.

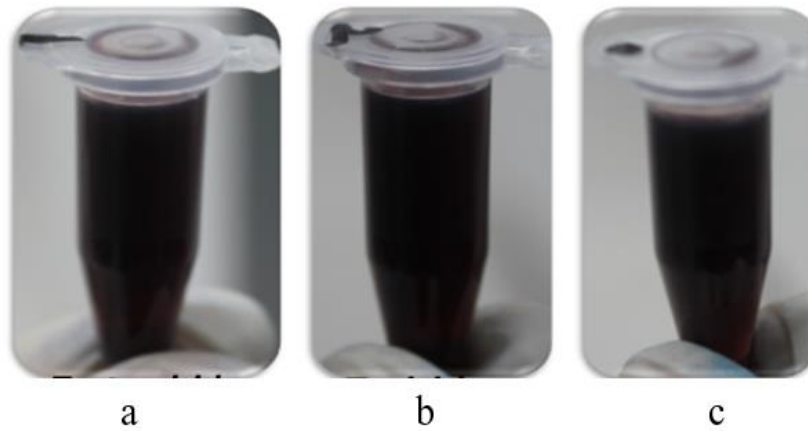


**Figura 28.** Absorción y remoción de NET (461,381 P.M., a 1 M), con *Trichoderma atroviride* al 75 y 25% de concentración.

Las tres cepas en la concentración al 100% mostraron un comportamiento muy similar entre ellas (**Fig. 29 y 30**), al obtener un porcentaje de remoción del 46% para *T. viride*, 48% en la cepa *T. harzianum* y 50% de degradación en *T. atroviride*.

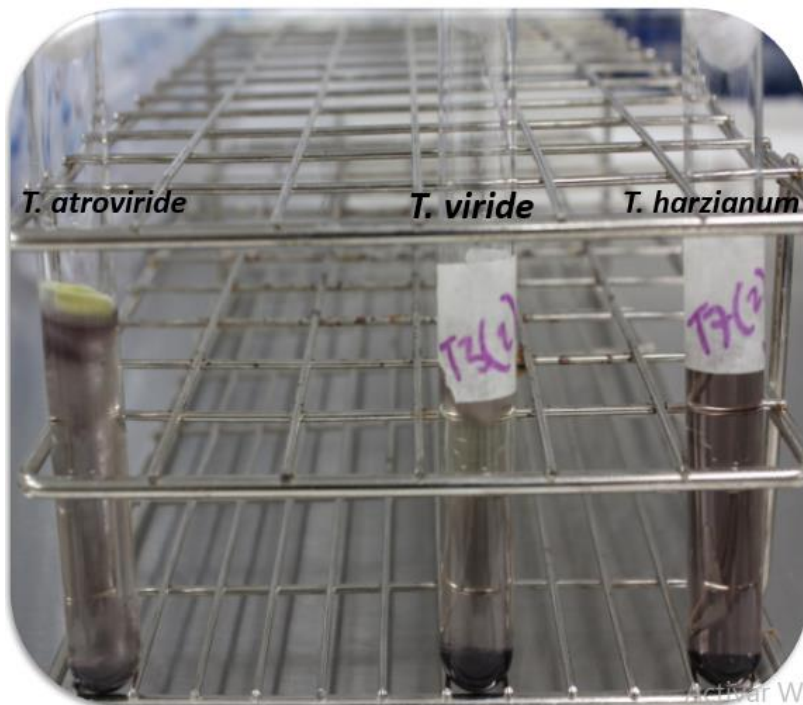


**Figura 29.** *T. atroviride*, *T. viride* y *T. harzianum* en una concentración al 100% de NET.

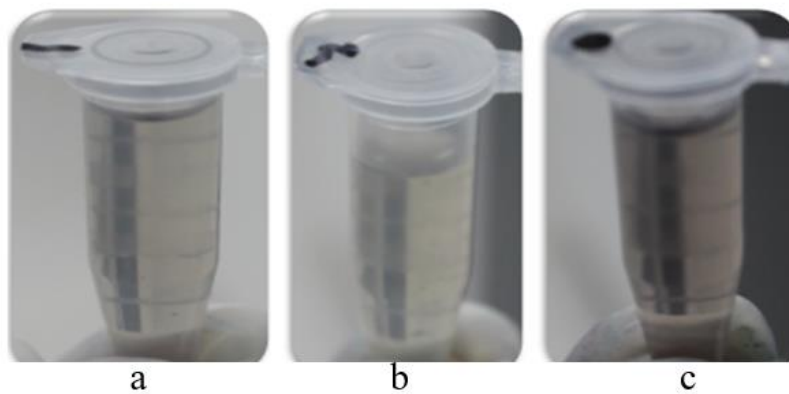


**Figura 30.** Cepas: a) *T. atroviride* b) *T. viride* y c) *T. harzianum*, en NET al 100%.

En concentraciones al 75% de negro de eriocromo T la única cepa que mostro un porcentaje de remoción menor en comparación a la concentración hecha al 25% fue *T. harzianum*, mostrando un 41% de remoción, mientras que *T. viride* y *T. atroviride*, presentaron un 61% de remoción (Fig. 31 y 32).

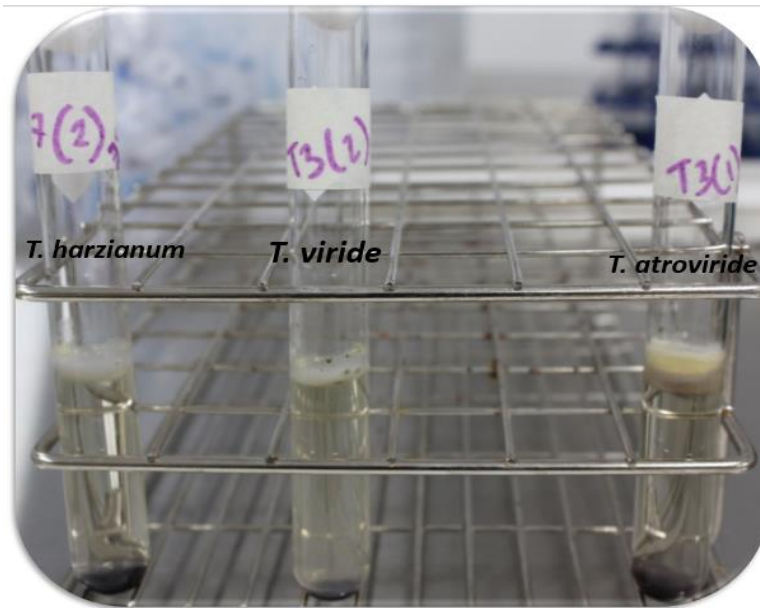


**Figura 31.** *T. atroviride*, *T. viride* y *T. harzianum* en una concentración al 75% de NET.

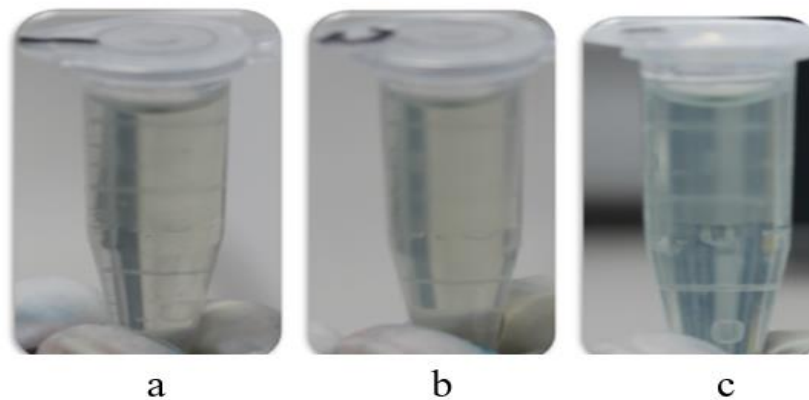


**Figura 32.** Cepas: a) *T. atroviride* b) *T. viride* y c) *T. harzianum*, en NET al 75%.

Las cepas del genero *Trichoderma* registraron un 60% de remoción en una concentración al 25% de colorante (Fig. 33 y 34).



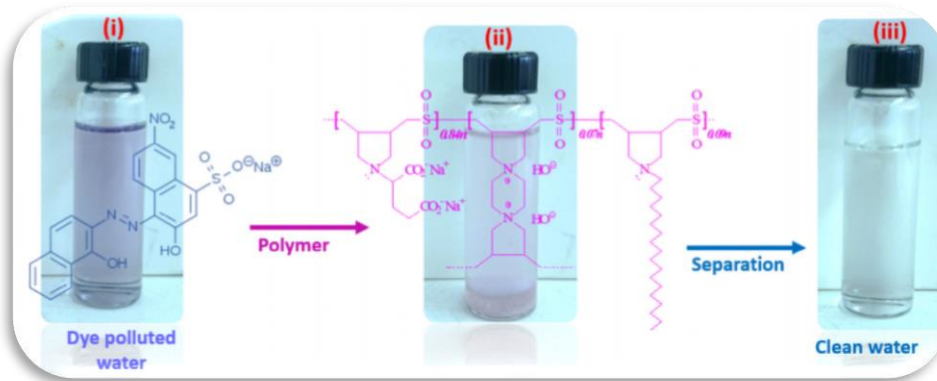
**Figura 33.** *T. atroviride*, *T. viride* y *T. harzianum* en una concentración al 25% de NET.



**Figura 34.** Cepas: a) *T. atroviride* b) *T. viride* y c) *T. harzianum*, en NET al 25%.

Dentro de los métodos físico-químicos que podemos encontrar en algunos estudios con el NET, existe el uso de Ácido policarbono híbrido reticulado hidrofóbico y residuos de ácido glutámico. Saleh *et al.* (2016) registraron únicamente la adsorción del negro de eriocromo T (1000 mg/L), con imágenes y escribiendo sus observaciones, detalla el proceso de adsorción por el APHRH (Ácido policarbono híbrido reticulado hidrofóbico); el cual alcanza un estado de equilibrio dentro de los 30 min., para terminar con una remoción del 100%.

En la (**Fig. 35**), se observa el cambio de oscuro a claro, lo cual indica que las moléculas de NET en la solución se adsorben después 60 min. Mostrando que el NET en la solución puede separarse y eliminarse en poco tiempo con APHRH como adsorbente.



**Figura 35.** Degradación de Negro eriocromo T documentada por Saleh *et al.* (2016).

Mientras que las pruebas realizadas por Karimi *et al.* (2017) al utilizar NiO-ZnO dopado en nanozeolitas como método para la foto-degradación de negro de eriocromo T, encontró que la mejor combinación para la degradación fotocatalítica fue: NiO<sub>11.2%</sub> -ZnO<sub>6.0%</sub> -NZX, registrándose en la región UV (atribuidos a los anillos aromáticos) y desaparecieron por completo en 90 minutos.

Sin embargo, a pesar de la alta efectividad mostrada por los métodos anteriores; se debe hacer mención del alto costo que estos materiales representan para su adquisición y la complejidad del método para poder ser utilizado.

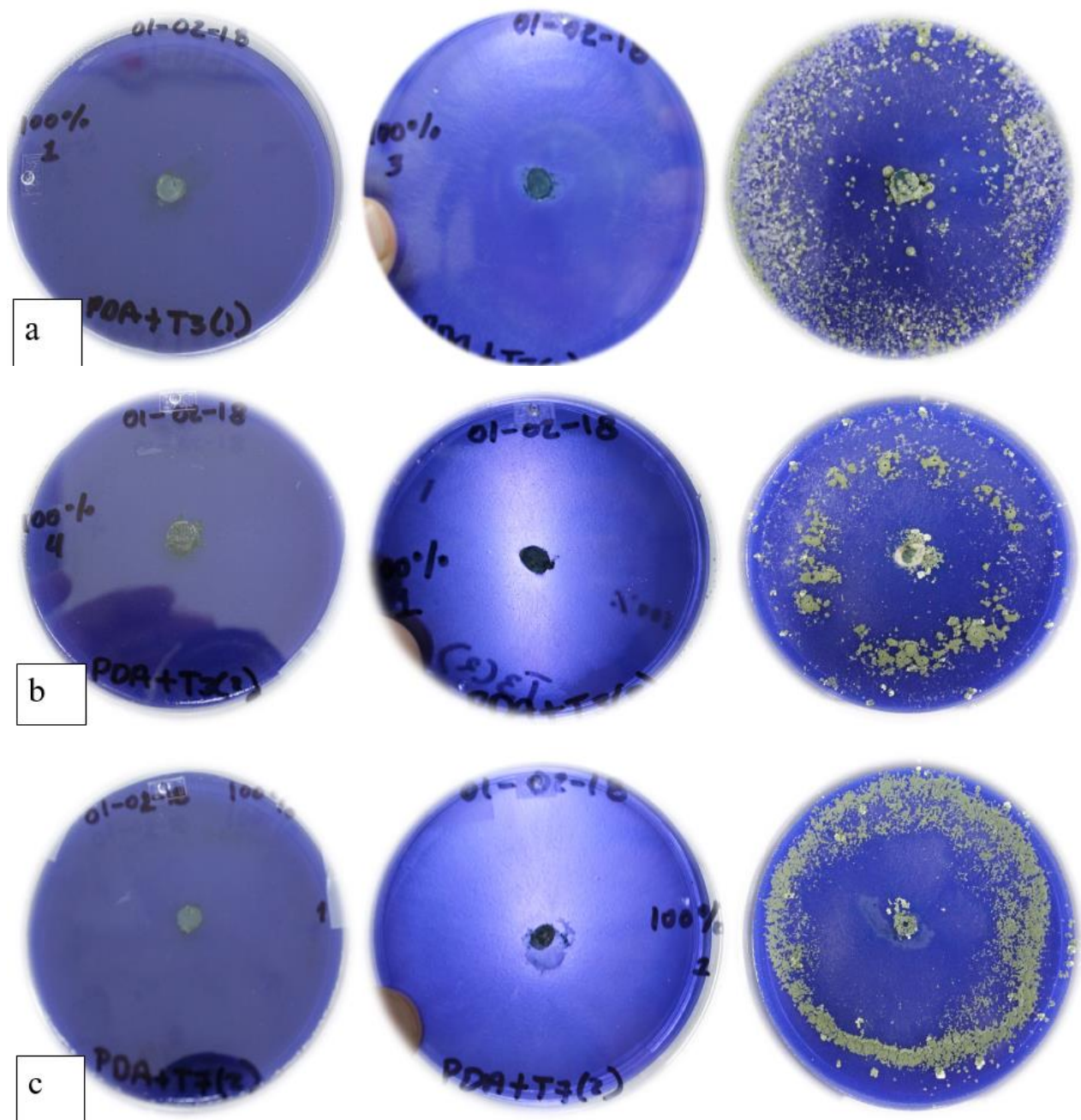
Los documentos relacionados a la fitoremediación por medio de hongos en realidad son escasos, en especial con el negro de eriocromo T, sin embargo, Kumari (2015), realizó un estudio tratando la biodegradación del negro de eriocromo T (50 mL), utilizando hongos Basidiomicetes (Seta de ostra rosa), dado que son hongos que degradan y sintetizan la lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasa, por lo tanto, son capaces de remover una amplia gama de compuestos orgánicos recalcitrantes, cancerígenos y tóxicos; entre ellos varios colorantes. Los resultados obtenidos en la presente investigación, muestran una decoloración hasta el tercer día, en un medio líquido hecho a través de extracto de malta, registrando una absorbancia máxima a 400-500 nm. Teniendo en este rango un 35% de remoción con el género *Trichoderma*.

## AZUL ÍNDIGO

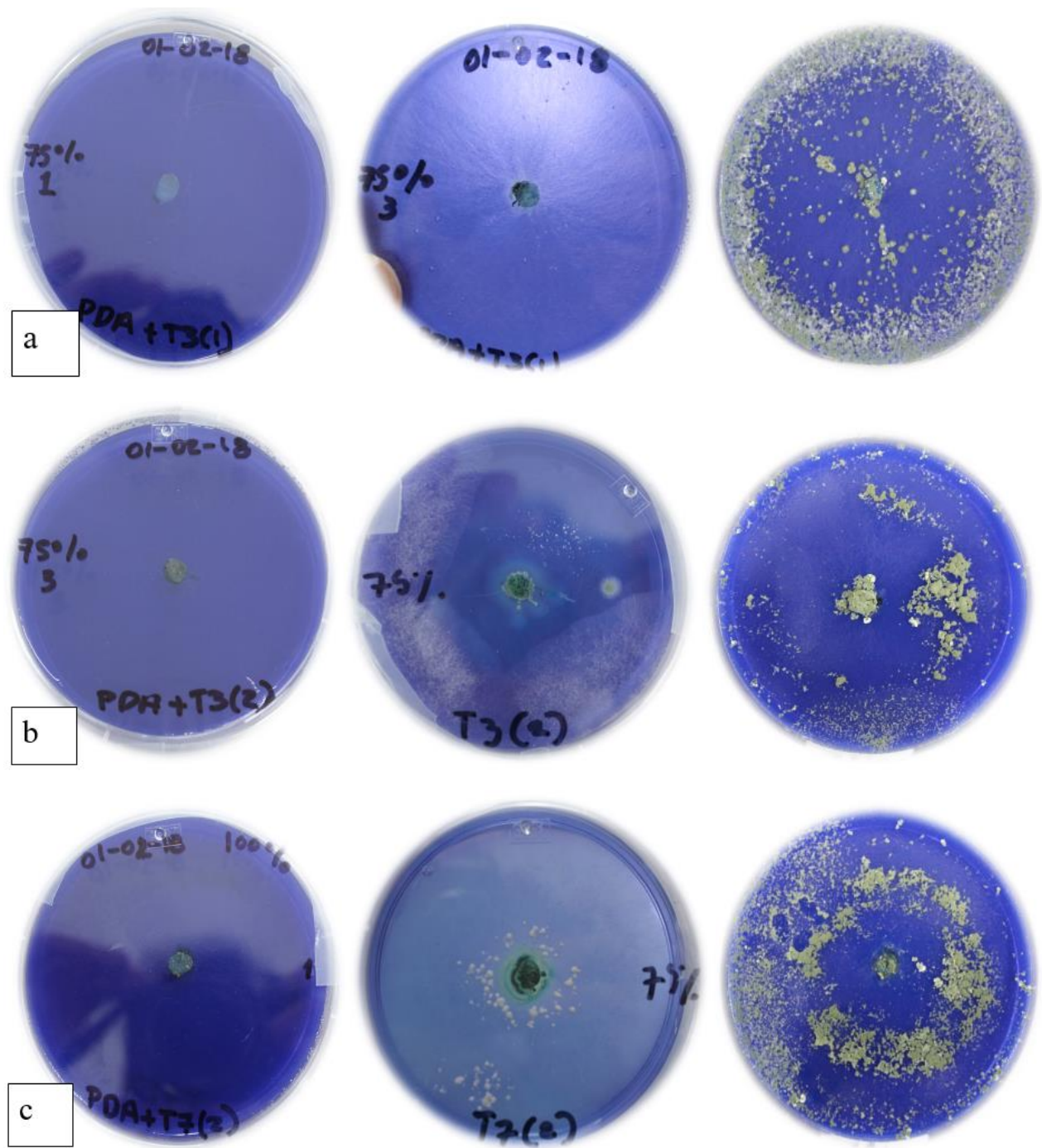
### Crecimiento y desarrollo del micelio

La velocidad en el crecimiento del micelio registrado en los tratamientos hechos con azul índigo (pH: 7.7) fue más lento en comparación a la velocidad del crecimiento observado en los otros dos colorantes. *Trichoderma viride* y *Trichoderma harzianum* lograron invadir completamente el agar de la placa a los 7 días después de la inoculación, a excepción de la cepa *T. atroviride*, la cual termino de cubrir la placa de PDA a los 6 días.

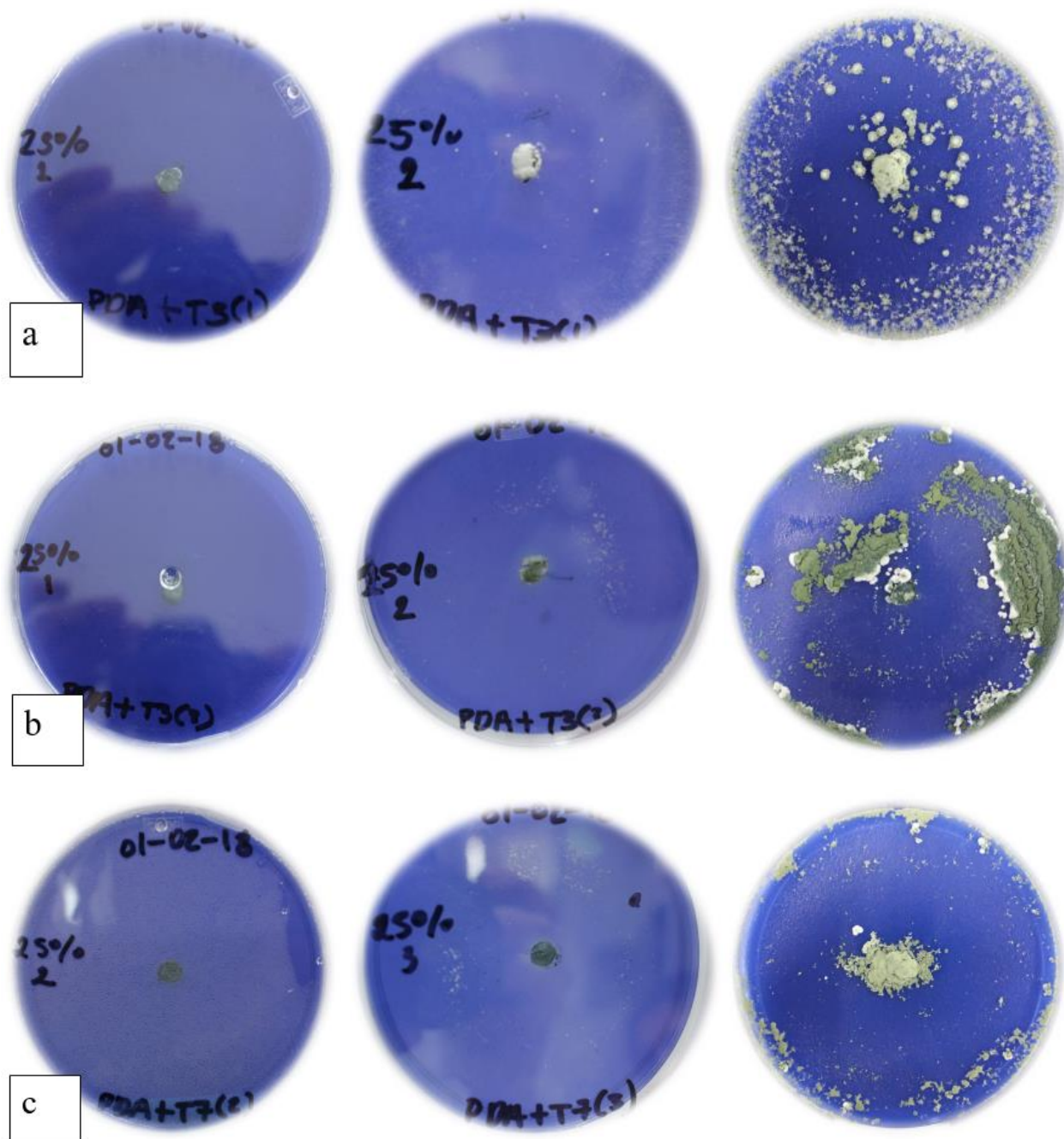
La biomasa acumulada fue menor en la concentración más alta del colorante (**Fig. 36**) sin embargo, vale la pena recalcar que los tratamientos correspondientes a las concentraciones de azul índigo al 75 y 25%, mostraron un mayor crecimiento (**Fig. 37 y 38**). La biomasa generada en todos los tratamientos fue de acuerdo a lo registrado en otros estudios; ya que la coloración del micelio pasó de tener un color blanco a un color verde, resultando en tener un crecimiento normal.



**Figura 36.** Decoloración de azul índigo en medio de PDA: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum* en una concentración al 100%



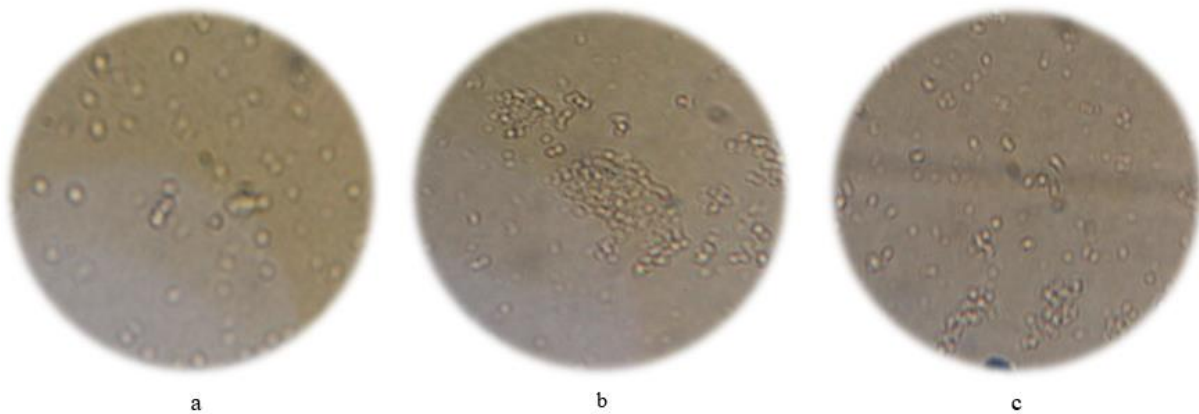
**Figura 37.** Decoloración de azul índigo en medio de PDA: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum* en una concentración al 75%



**Figura 38.** Decoloración de azul índigo en medio de PDA: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum* en una concentración al 25%

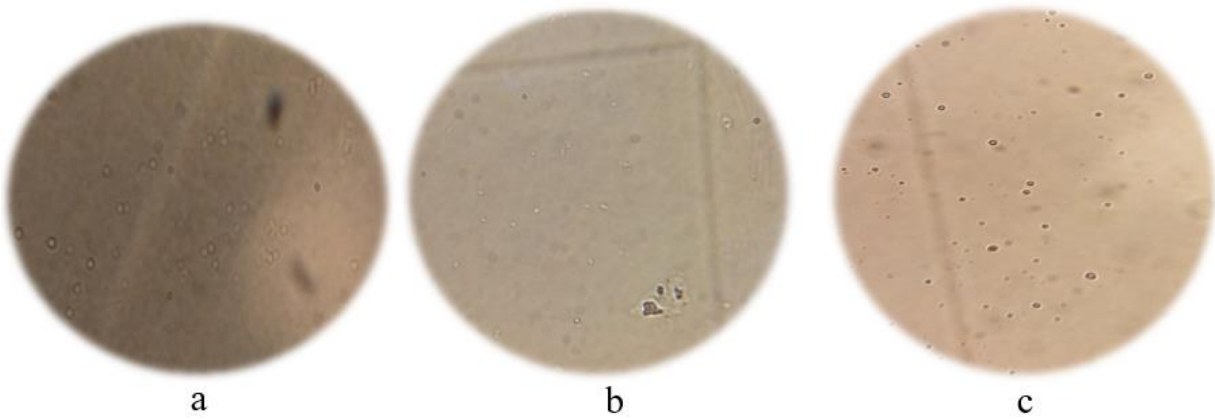
## Conteo de esporas

El número de producción de esporas encontrado en los tratamientos hechos con azul índigo arrojó números menores que aquellos encontrados en los otros colorantes. Los resultados obtenidos en los tratamientos al 100% dieron un número total de esporas para *T. atroviride* de 631 esporas y en *T. harzianum* se contaron 406 esporas. Aunque existió una diferencia pronunciada en los tratamientos hechos en concentraciones al 100% en *T. viride*, ya que se observó un total 889 espora (**Fig. 39**).



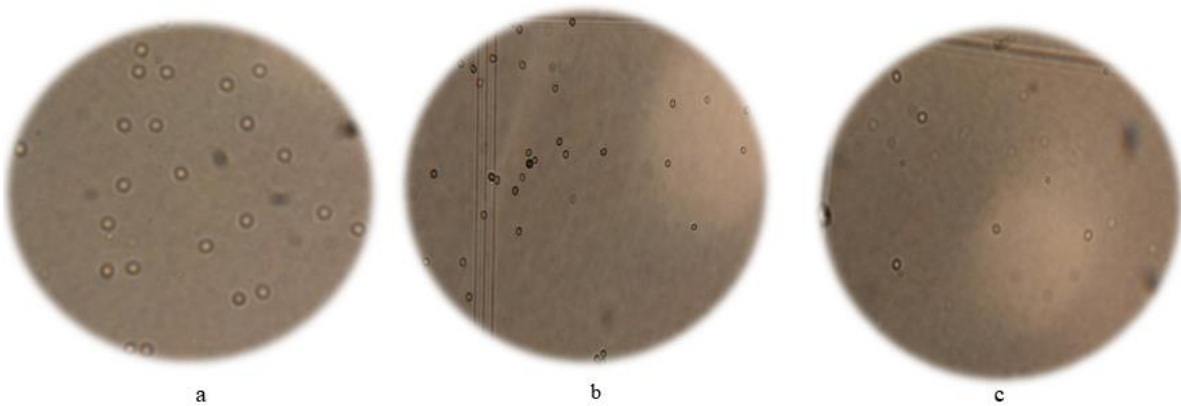
**Figura 39.** Esporas de: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum*, en Azul índigo al 100%

*T. viride* en la concentración al 75% generó un total de 189 esporas, *T. harzianum* no tuvo un cambio importante en relación al número de esporas, presentando 174. Mientras que *T. atroviride* mostró un total de 247 esporas, teniendo como resultado, que las cepas actuaron de forma similar en la producción de esporas (**Fig. 40**).



**Figura 40.** Esporas de: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum*, en Azul índigo al 75%

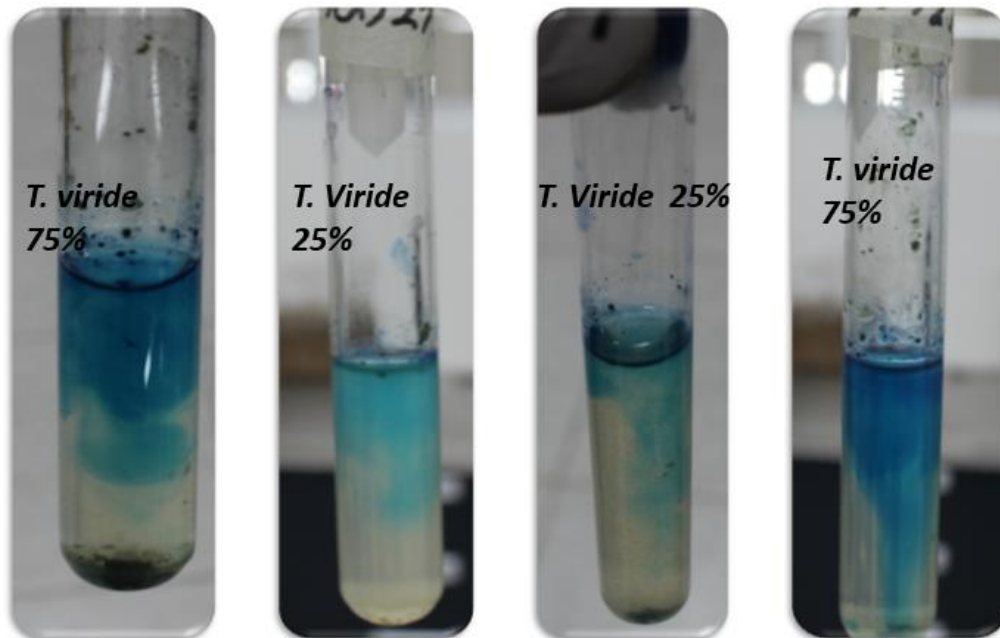
*Trichoderma viride* a una concentración del 25%, tuvo como resultado ser la cepa con una generación de esporas más baja dentro de todos los tratamientos; debido a que solo generó 139 esporas. *T. harzianum* generó un total de 163 esporas y la cepa que presentó el valor más alto fue *T. atroviride* con 358. Con estos resultados es fácil inferir que a mayores concentraciones del colorante Azul índigo, la producción de esporas aumenta para todas las cepas; ya que los tratamientos al 100% mostraron mejores respuestas al momento de formar esporas (**Fig. 41**).



**Figura 41.** Esporas de: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum*, en Azul índigo al 25%

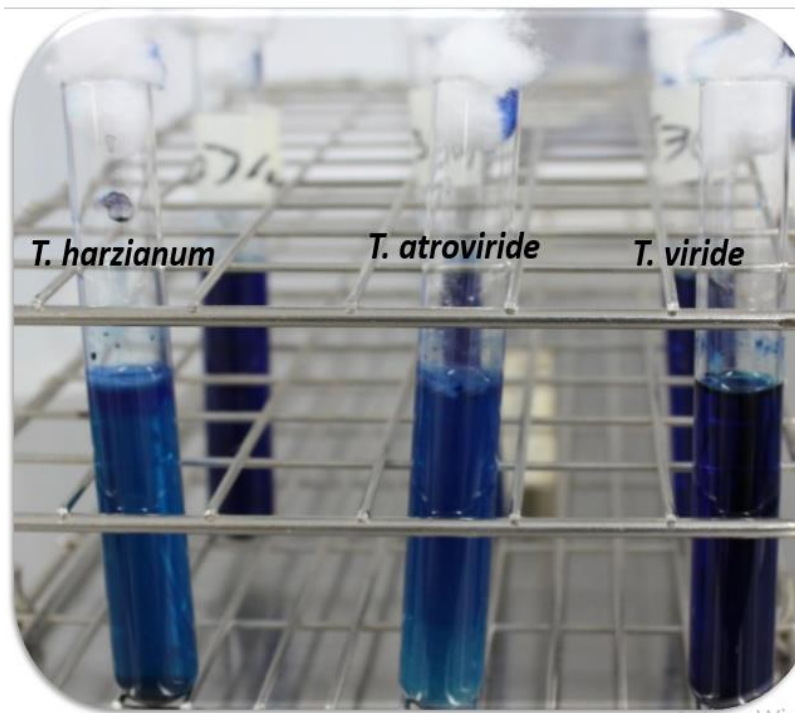
## Espectrofotometría

Al igual que en el resto de colorantes utilizados, las cepas del genero *Trichoderma* tuvieron la capacidad de actuar como quelato para la precipitación y acumulación de azul índigo (266.27 P.M., a 1 M), pero solo en algunas concentraciones (75% y 25%) fue más notoria esta capacidad (**Fig. 42**).

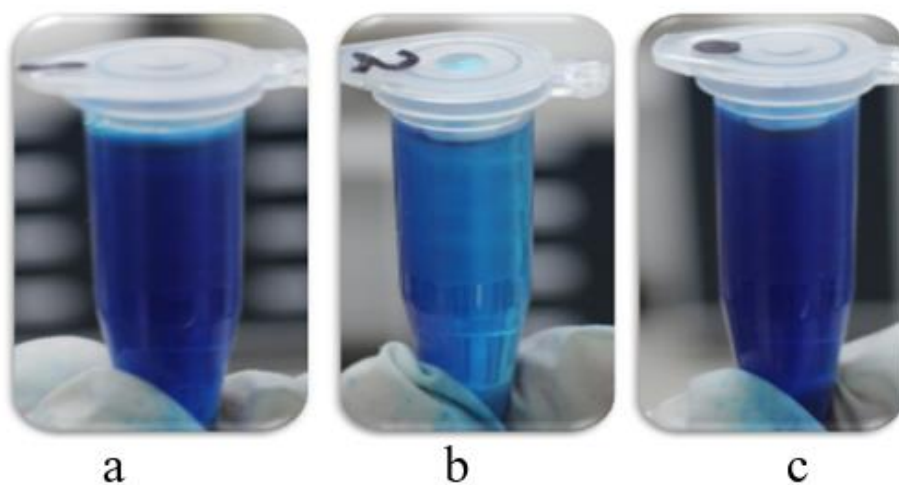


**Figura 42.** Absorción y remoción de azul índigo (266.27 P.M., a 1 M) con la cepa *Trichoderma viride* al 75% y 25% de colorante.

Los datos recabados para analizar los porcentajes de absorbancia en el azul índigo señalan resultados similares en los tratamientos al 100% de colorante, ya que la cepa *T. harzianum* y *T. viride* muestran un 46% de remoción, teniendo un resultado diferente en la cepa *T. atroviride* con un 50% (**Figuras 43 y 44**).



**Figura 43.** *T. atroviride*, *T. viride* y *T. harzianum* en una concentración al 100% de azul índigo.



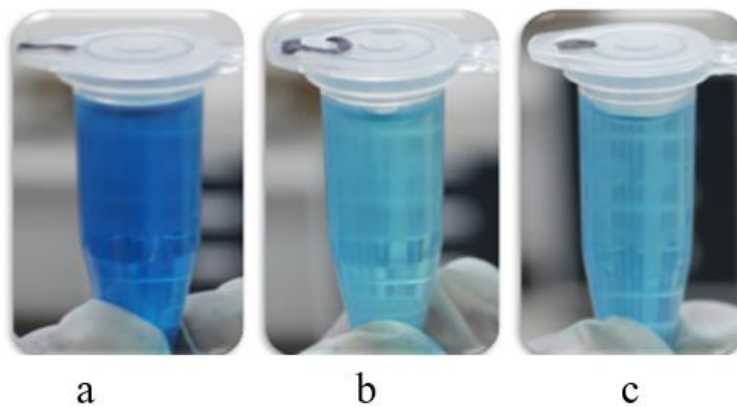
**Figura 44.** Cepas: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum* en azul índigo al 100%

Los resultados encontrados en los tratamientos realizados con 75% de colorante, señalaron una mayor decoloración, ya que *T. atroviride* tuvo un 66% de remoción, mientras que la cepa *Trichoderma harzianum* mostro un 75% de remoción del colorante. La cepa *Trichoderma viride*,

tuvo el valor más alto de remoción al tener un 87% en los registros hechos con el espectrofotómetro (Fig. 45 y 46).



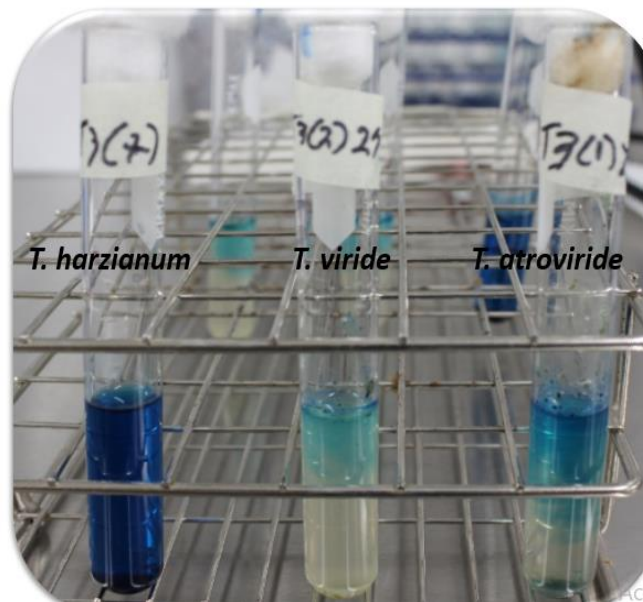
**Figura 45.** *T. atroviride*, *T. viride* y *T. harzianum* en una concentración al 75% de azul índigo.



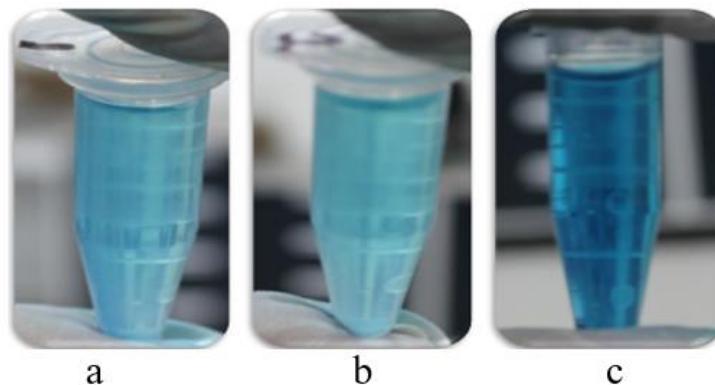
**Figura 46.** Cepas: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum* en azul índigo al 75%

Los tratamientos constituidos a una concentración del 25% de azul índigo, presentaron un mayor porcentaje de decoloración y por lo tanto de remoción, encontrándose la cepa *T. harzianum* con un 70% de remoción, siendo esta la de menor efectividad en comparación a las cepas

*T. atroviride* y *Trichoderma viride*, ya que estas fueron capaces de obtener un 86% de remoción (Fig. 47 y 48).



**Figura 47.** *T. atroviride*, *T. viride* y *T. harzianum* en una concentración al 25% de azul índigo.



**Figura 48.** Cepas: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum* en azul índigo al 25%

Para verificar los resultados presentes en esta tesis, vale la pena realizar una comparación con la tesis realizada por Sánchez (2014), en donde los resultados obtenidos arrojaron una decoloración del 100% con la cepa H-2 de *Trichoderma* sp., mientras que la cepa H-12 de *Trichoderma* sp., mostró una decoloración del 95% y finalmente la cepa H-11 de *Trichoderma* sp., tuvo una

remoción del 67%, teniendo como parámetro de tiempo un total de 12 días para llevar a cabo las mediciones.

Con un enfoque diferente, teniendo como base bacterias anaerobias, Ajibola *et al.* (2005) encontró diferentes grados de decoloración con la bacteria *Clostridium perfringens* sp., tuvo el 50% de decoloración en un efluente diluido, mientras que con agua destilada obtuvo un 58% de reducción en azul índigo.

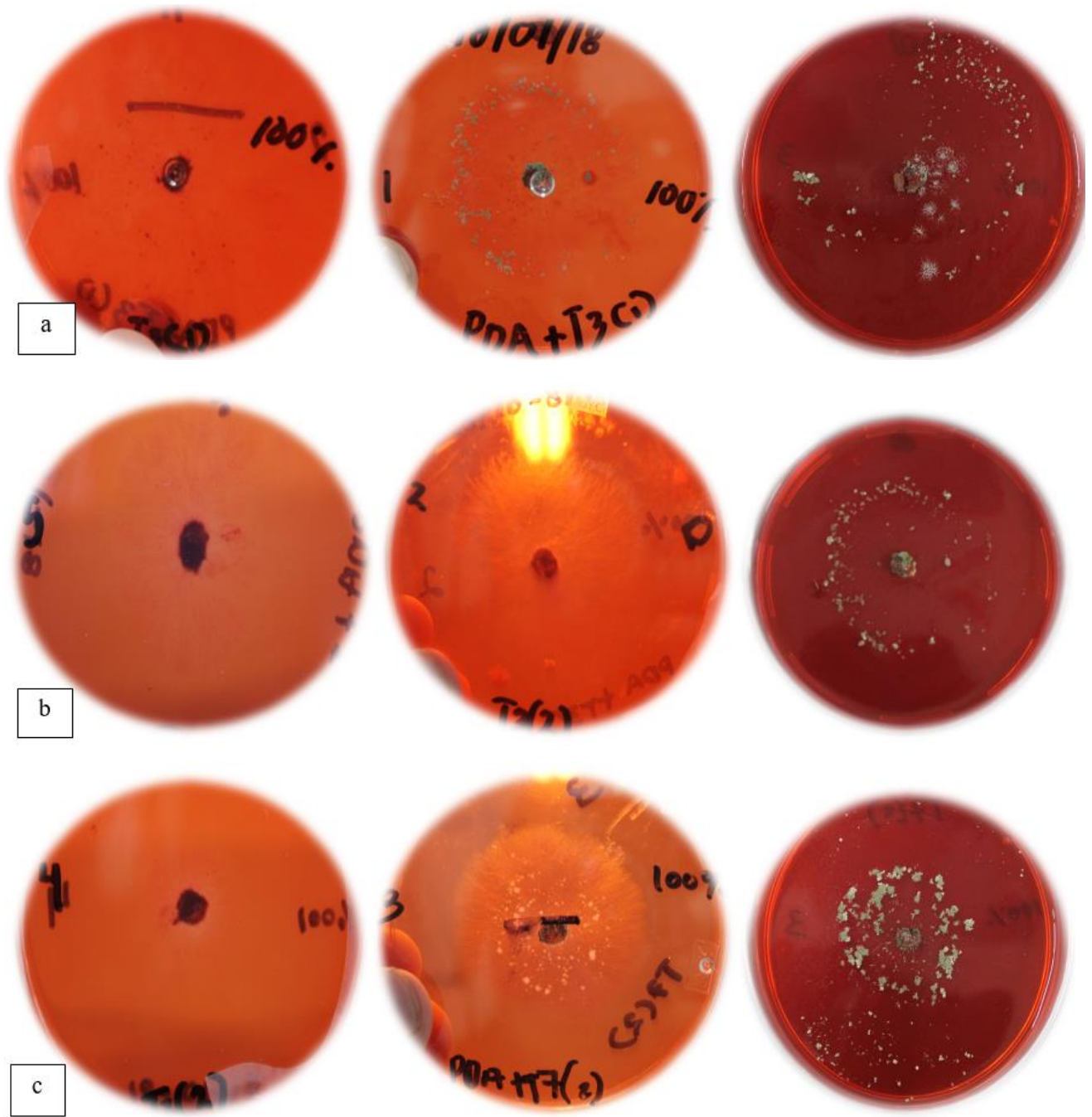
El estudio realizado por Herrera y Rincón (2010), mostraron niveles de decoloración del 70% para el azul índigo (4 g de índigo aforado con agua destilada a 500 mL) dentro de un plazo de 11 días, trabajando con *Pleurotus ostreatus*. Además de registrar la decoloración, Herrera y Rincón documentaron mediciones en relación al crecimiento micelial en un medio constituido por Radha con Glucosa y Radha sin Glucosa. Pudiendo observar que en aquellos medios sin suplemento (glucosa), el micelio del microorganismo fue delgado y poco abundante, mientras que los medios con dicho suplemento, presentaron micelio abundante y aéreo.

El estudio hecho por Dellamatrice *et al.* (2017) registro la decoloración del azul índigo en frascos de Erlenmeyer utilizando las cianobacterias (*Cyanobacterium Phormidium*), mostrando que la eliminación del color mejora después de 14 días, acoplándose a un período de aclimatación. Así obtienen el 91% de decoloración a los 19 días de incubación, resultados muy similares a los obtenidos con el género *Trichoderma* en la presente investigación.

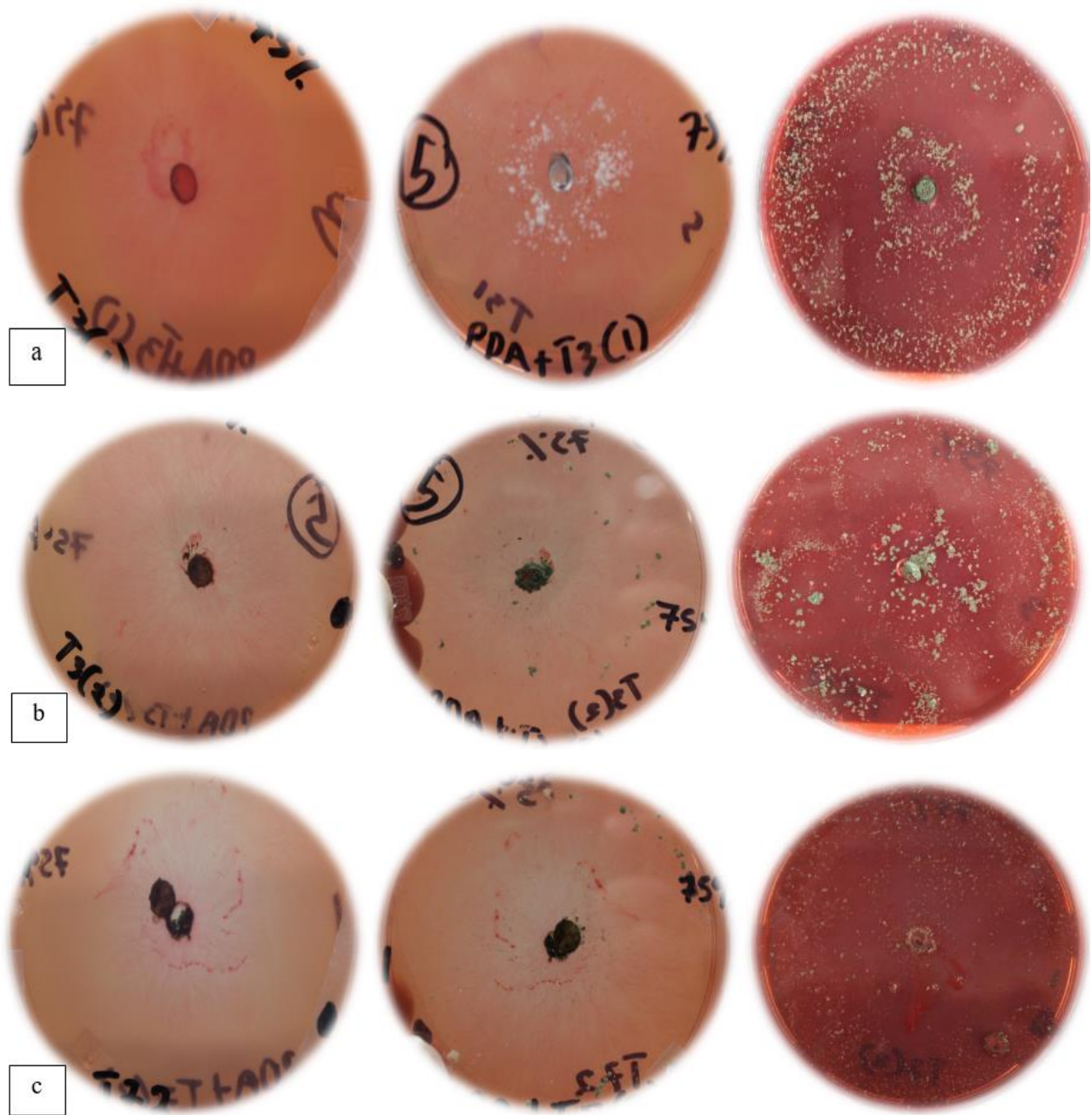
## ROJO CONGO

### Crecimiento y desarrollo del micelio

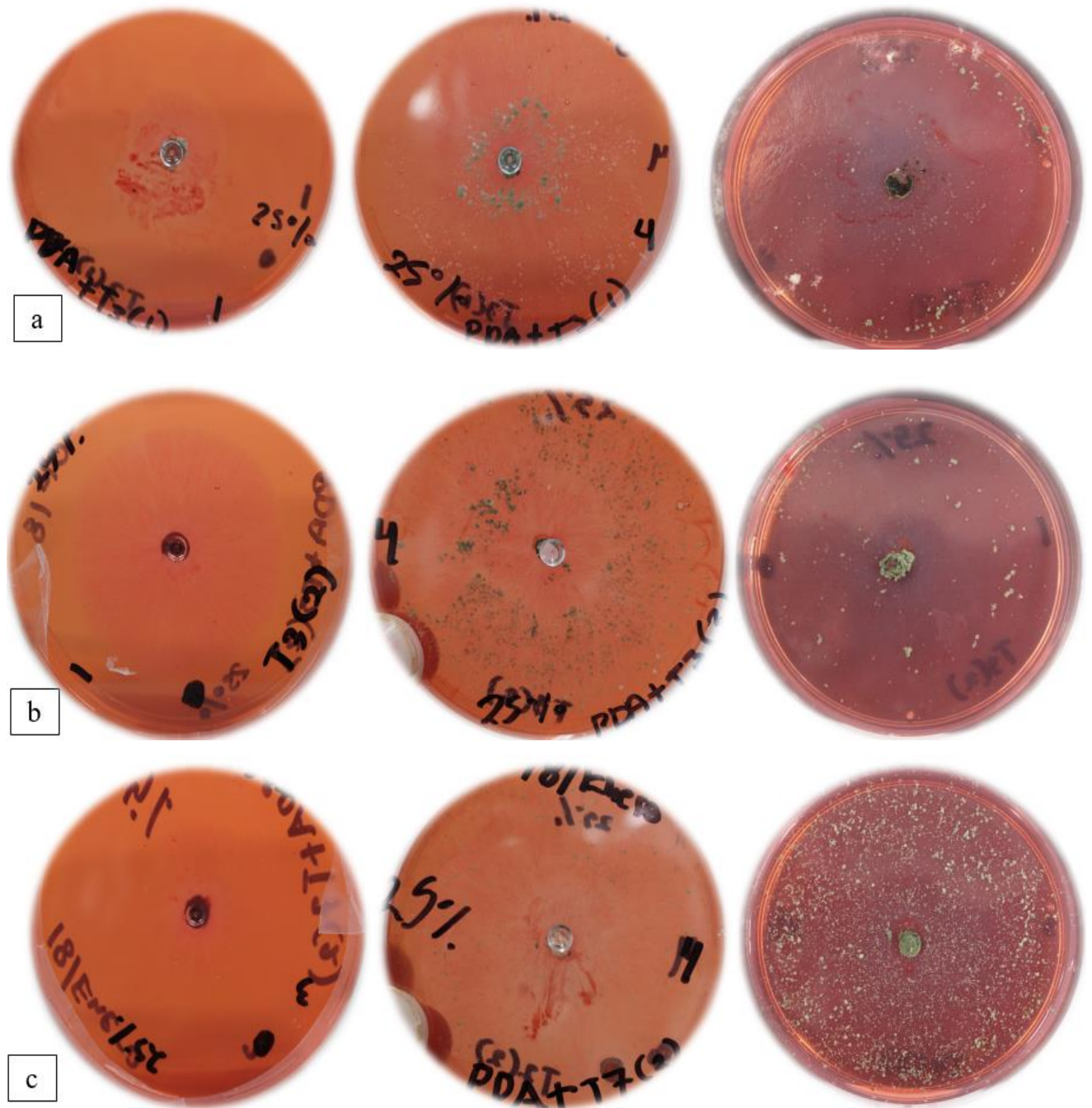
Las mediciones hechas relacionadas al colorante rojo congo (pH: 6.1), mostraron resultados más visibles que el resto de los colorantes. La diferencia en cuanto a velocidad de crecimiento no se diferenció en gran medida de los otros dos colorantes, sin embargo la decoloración observada fue más evidente, ya que después de tres días de haber dejado crecer el micelio en agar, este no solo empezaba a aclararse, también se podía observar el paso de luz a través de las partes que habían sido invadidas por el micelio, lo cual lo convierte en el colorante más susceptible a ser absorbido. Aunque la formación de biomasa fue escasa, en algunos casos se pudieron observar algunos brotes. Además se pudo apreciar una coloración rojiza de la hifa (**Fig. 49, 50 y 51**). Esto indica que la decoloración del rojo congo se produce en las etapas iniciales de crecimiento debido a la biosorción del colorante dentro de las células que a su vez comienzan la biodegradación del rojo congo en las etapas finales de crecimiento (Tatarko *et al.*, 1997).



**Figura 49.** Decoloración de rojo congo en medio de PDA: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum* en una concentración al 100%



**Figura 50.** Decoloración de rojo congo en medio de PDA: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum* en una concentración al 75%

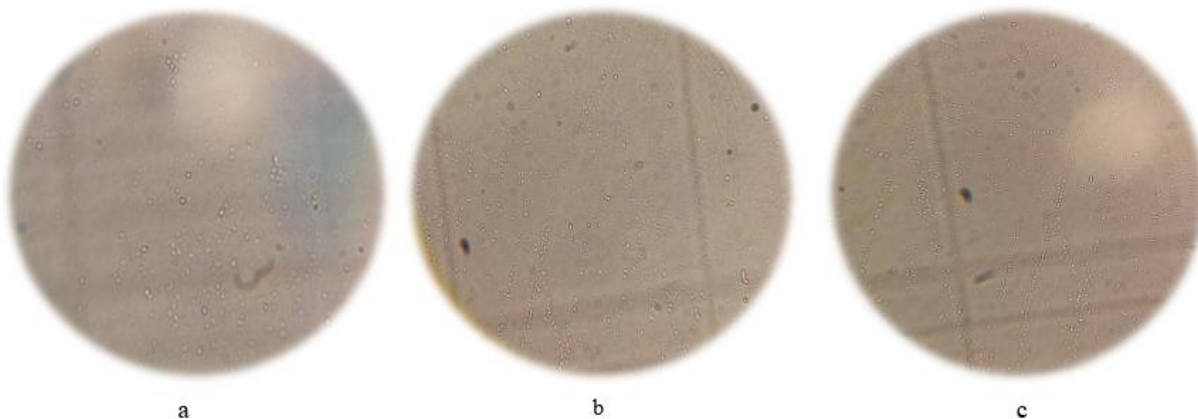


**Figura 51.** Decoloración de rojo congo en medio de PDA: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum* en una concentración al 25%

## Conteo de esporas

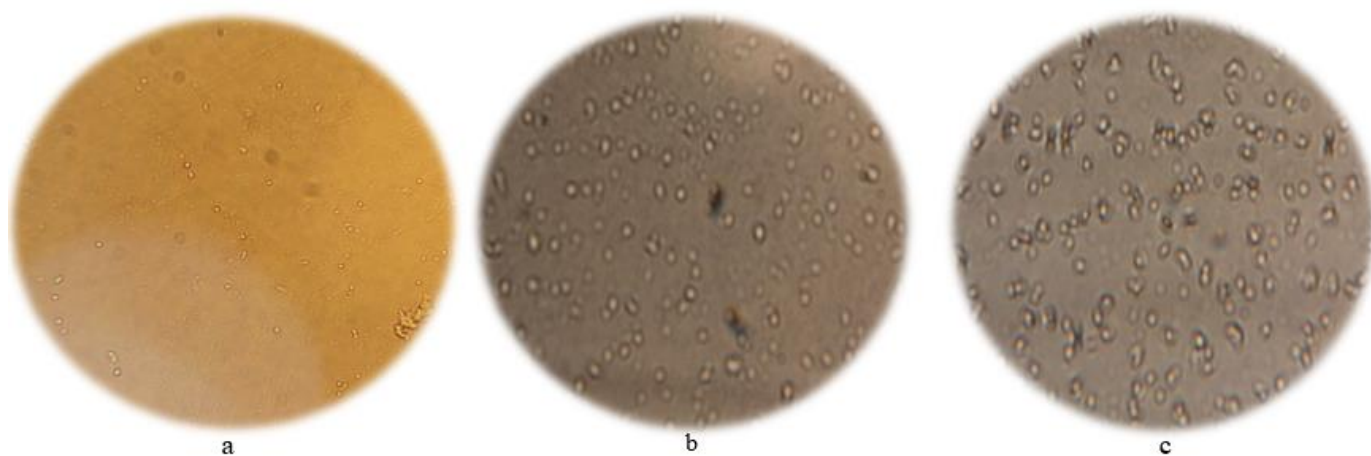
La producción de esporas en rojo congo fue la más alta dentro de los tres colorantes estudiados. Las observaciones en microscopio demostraron que un gran número de ellas no se encontraban en el mejor estado posible, ya que presentaban deformidades o tamaños pequeños indicando un pobre crecimiento, en especial aquellas observadas en concentraciones altas de colorante, lo cual indica que la absorción de rojo congo por parte del micelio provocó el desarrollo de células en un estado hipotónico.

El tratamiento correspondiente al 100% en concentración de rojo congo muestra un alto número de esporas entre *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* teniendo un total de 2095 y 2479 respectivamente, sin poder observarse una diferencia de alto grado entre ambas cepas, pero la cepa *T. atroviride* mostro una diferencia significativa en el número de esporas al solo contarse 537 de estas, mostrando una baja viabilidad (**Fig. 52**).



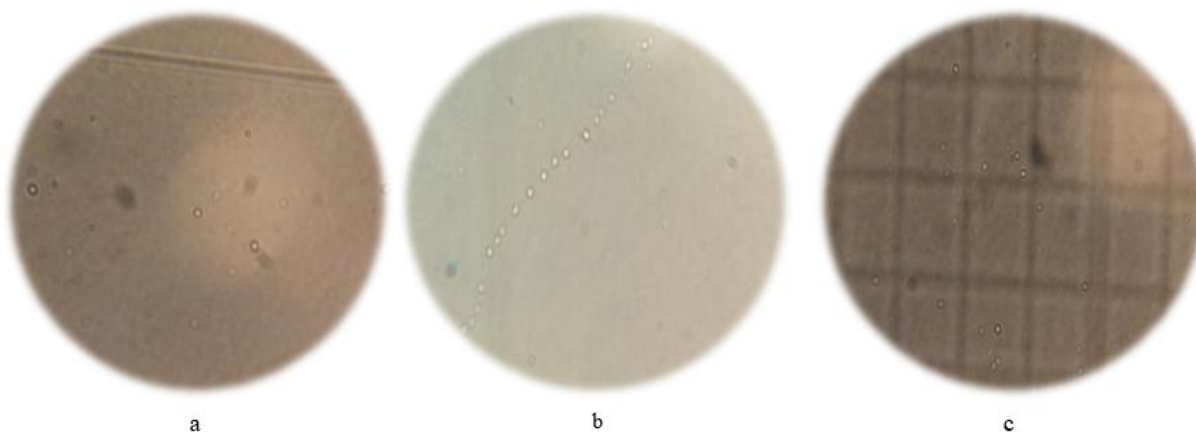
**Figura 52.** Esporas de: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum*, en rojo congo al 100%

Los tratamientos hechos en concentraciones del colorante al 75% señalan resultados realmente parecidos ya que *Trichoderma harzianum* tuvo un total de 2326 esporas y *Trichoderma viride* por su parte logro desarrollar 2652 esporas, mientras que *Trichoderma atroviride* volvió a mostrar una disminución pronunciada en el numero de esporas, con un total de 574 (**Fig. 53**).



**Figura 53.** Esporas de: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum*, en rojo congo al 75%

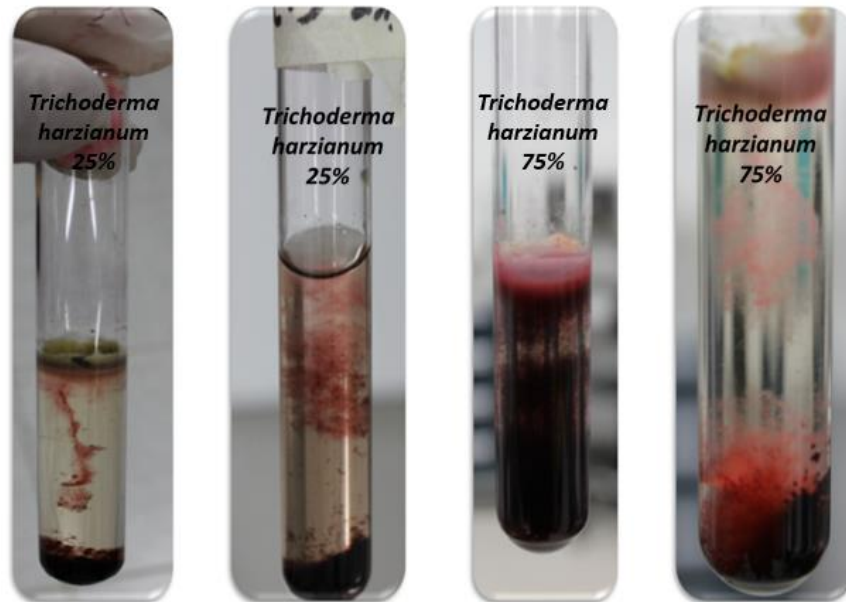
El 25% de colorante mostró una producción de esporas bastante similar en número, aunque muy bajo en comparación con las concentraciones más altas. En conjunto *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma atroviride* y *Trichoderma viride* tuvieron números totales de 237, 220 y 162 esporas respectivamente, demostrando que a menor cantidad de colorante existe poca generación de esporas (**Fig. 54**).



**Figura 54.** Esporas de: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum*, en rojo congo al 25%

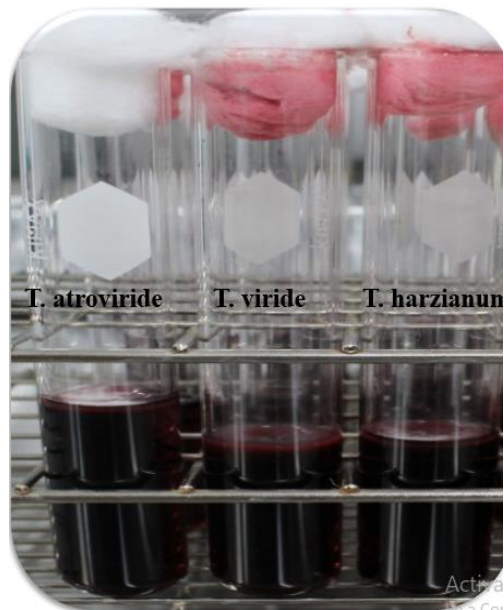
## Espectrofotometría

El colorante rojo congo (696.665 P.M., a 1 M), dentro del medio hecho con extracto de malta, fue precipitándose y reuniéndose, todos esto debido a las tres cepas del genero *Trichoderma* ya que este actuaba como un quelato al reunir el colorante alrededor del micelio (Fig. 55).

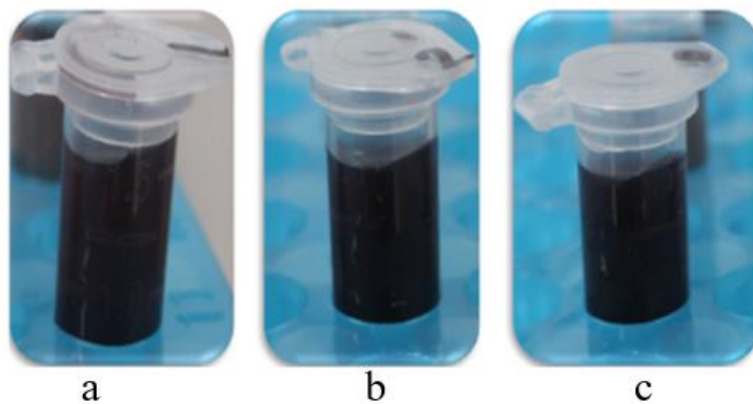


**Figura 55.** Absorción y remoción de rojo congo (696.665 P.M., a 1 M) con la cepa *Trichoderma harzianum* al 75% y 25% de colorante.

Una vez ajustado el espectrofotómetro, los resultados presentados para la concentración al 100% de colorante señalaron una menor eficacia en *Trichoderma viride* con respecto a las otras dos, mostrando una degradación del 59%. La cepa *Trichoderma harzianum* fue la segunda más efectiva con una degradación del 80%, mientras que la cepa con mejores resultados fue *T. atroviride* registrando un 91% de remoción (Fig. 56 y 57).



**Figura 56.** Cepas: *T. atroviride*, *T. viride* y *T. harzianum* actuando en una concentración al 100% de rojo congo.

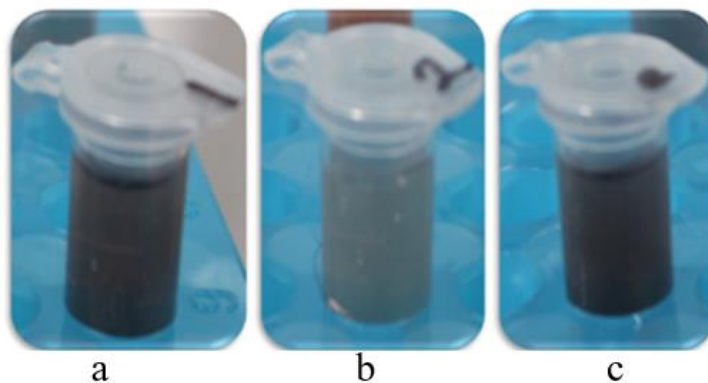


**Figura 57.** Cepas: a) *T. atroviride* b) *T. viride* y c) *T. harzianum* en rojo congo al 100%

Aquellos trabajos realizados con los tratamientos del colorante a una concentración aplicada al 75%, presentaron en contraste porcentajes más bajos de decoloración en contraparte con las concentraciones al 100%, ya que las cepas *T. atroviride* y *Trichoderma viride* mostraron un total de 58% y 74% respectivamente, no obstante la cepa *Trichoderma harzianum* mostro el mayor grado de remoción con un 84% en el medio (**Fig. 58 y 59**).



**Figura 58.** Cepas: *T. atroviride*, *T. viride* y *T. harzianum* actuando en una concentración al 75% de rojo congo.

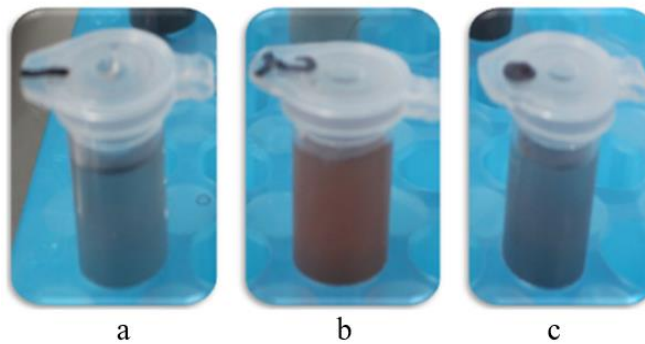


**Figura 59.** Cepas: a) *T. atroviride* b) *T. viride* y c) *T. harzianum* en rojo congo al 75%

La concentración al 25% mostró valores aún más bajos, teniendo a la cepa *Trichoderma viride* con un registro del 49% en remoción, *T. atroviride* mostro un 69% en las lecturas y la cepa de mayor eficacia se observó en el trabajo realizado con *Trichoderma harzianum* al presentar un 73% de remoción. De esta forma es importante mencionar que *Trichoderma* spp., crece mejor en pH ácido, razón por la cual su decoloración pudo haber sido mayor si se le compara con el resto de los colorantes, aun cuando no haya generado una gran cantidad de biomasa (**Fig. 60 y 61**).



**Figura 60.** Cepas: *T. atroviride*, *T. viride* y *T. harzianum* actuando en una concentración al 25% de rojo congo.



**Figura 61.** Cepas: a) *T. atroviride* b) *T. viride* y c) *T. harzianum* en rojo congo al 25%

El hongo *Aspergillus flavus* utilizado por Bhattacharya *et al.* (2011) mostro resultados positivos en la tasa de decoloración, obteniendo un 98.86% de decoloración en el rojo congo, dentro del plazo de 96 horas por biosorción simultánea y biodegradación adicional. De la misma forma Tatarko *et al.* (1997) probó la decoloración de rojo congo (50 mg/L) con el hongo basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium*, el cual registro una adsorción rápida del colorante referente a un lapso de cinco horas, debido a la acción de los gránulos miceliales, obteniendo una tasa máxima de decoloración del 26.7 +/- 0.6% por día. Sin embargo aquellos tratamientos que

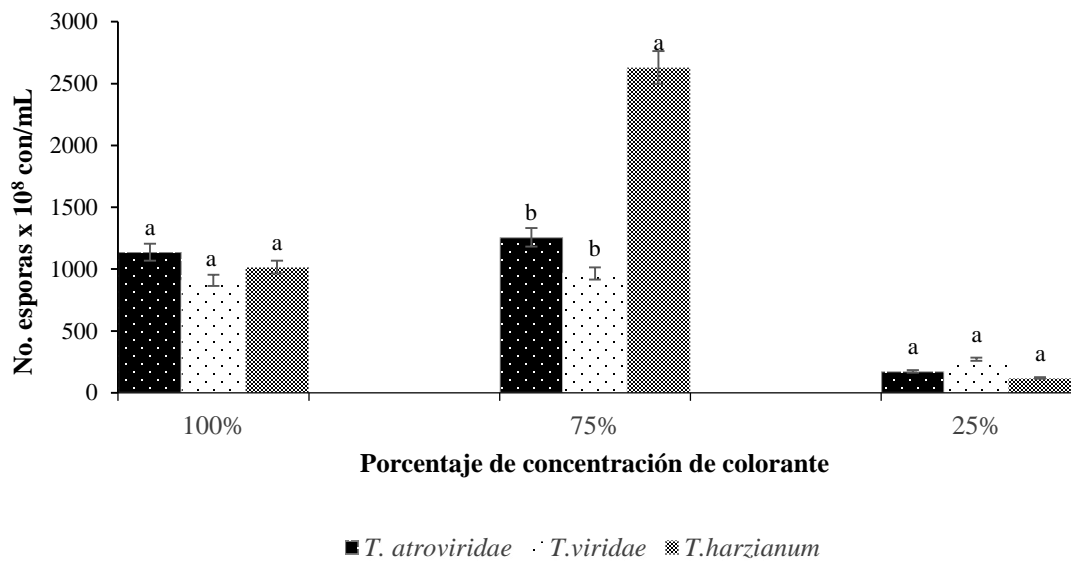
contenían 500 mg/L de colorante, pasaron por un tiempo de inactivación (aproximadamente dos días) para después alcanzar una tasa máxima de decoloración del 31.2 +/- 0.9% entre 3 a 5 días.

Singh *et al.* (2012) empleo solamente la cepa *Trichoderma harzianum* con la finalidad de medir la remoción del colorante rojo congo, documentando los grados iniciales de decoloración después de 24 horas en 17%, y terminando el tiempo establecido de 10 días; la decoloración total alcanzo un grado del 70%. Sin embargo la diferencia entre el trabajo presentado en esta tesis y el de Singh estriba en la inoculación de los medios, ya que este utilizó una suspensión de esporas ajustada a  $1 \times 10^8$  para trabajar sobre el colorante.

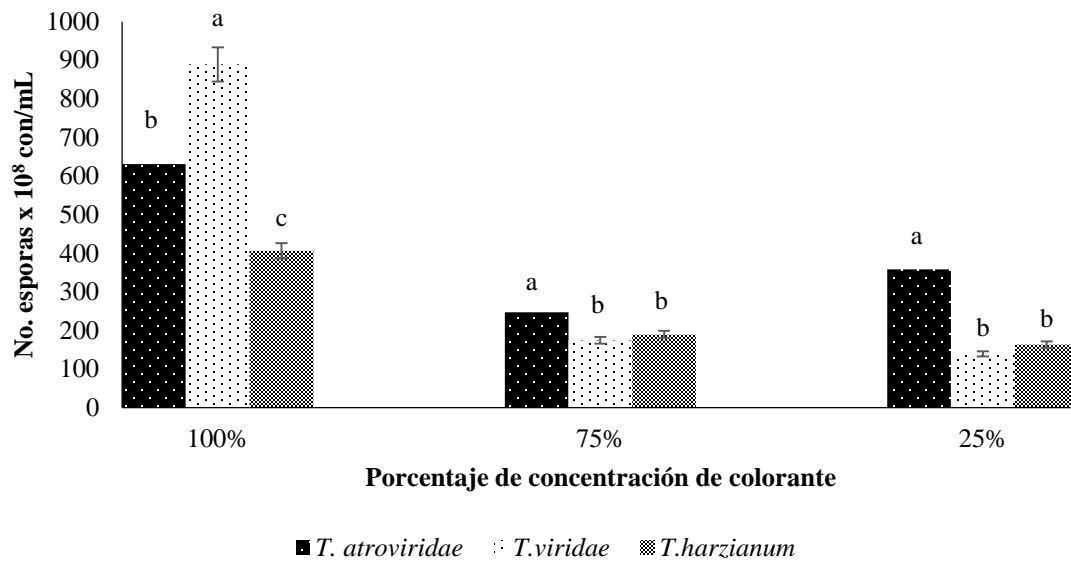
Otro estudio hecho con respecto a la comparación decolorante de rojo congo entre dos hongos fue hecho por Mohammed (2015), en el cual explica que la cantidad de absorbancia disminuye con el el tiempo de tratamiento. Los registros hechos en un tratamiento compuesto por una solución de rojo congo a 100 mL, muestra la función absorbente del hongo *Aspergillus flavus* con un porcentaje de decoloración señalada en 46.89% en una duración de 72 horas. El segundo hongo en ser utilizado en el estudio fue *Aspergillus terreus* el cual también tuvo un plazo de 72 horas para actuar, dando un resultado final de 34.59% de absorbancia.

## **Comparación entre cepas con diferentes concentraciones de colorantes**

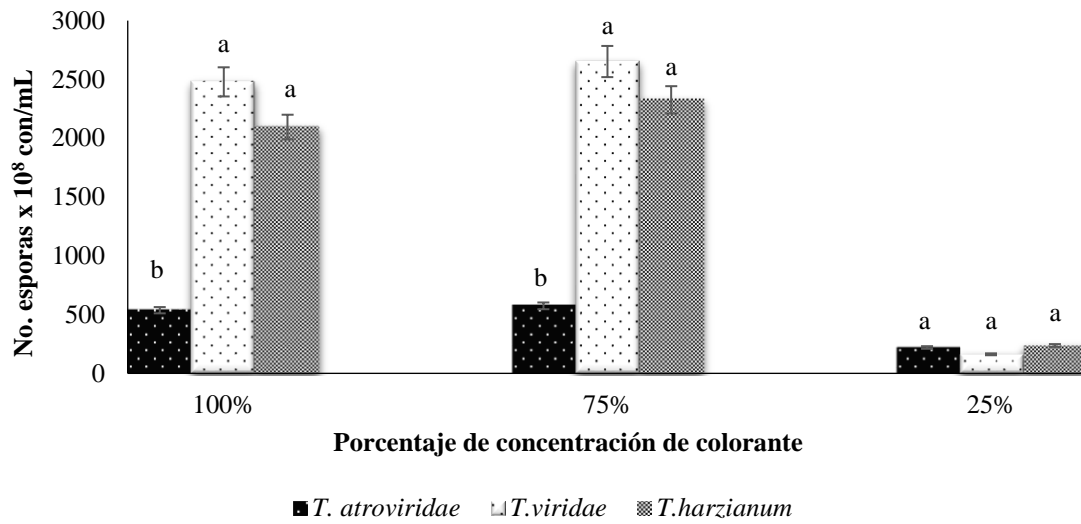
Los siguientes gráficos muestran las tendencias que se desarrollaron en los tres distintos colorantes a diferentes concentraciones. En las siguientes tablas se pueden apreciar las diferencias marcadas por una letra como a, b, y c; mostrando los grados de similitud o disparidad en producción de esporas (**Fig. 62, 63 y 64**) y degradación de colorantes (**Fig. 65, 66 y 67**) que presentaron las tres cepas.



**Figura 62.** Comparación de No. de esporas en diferentes concentraciones de negro de eriocromo T  
 \*Letras en diferentes columnas, muestran diferencia estadística ( $p < 0.05$ ).

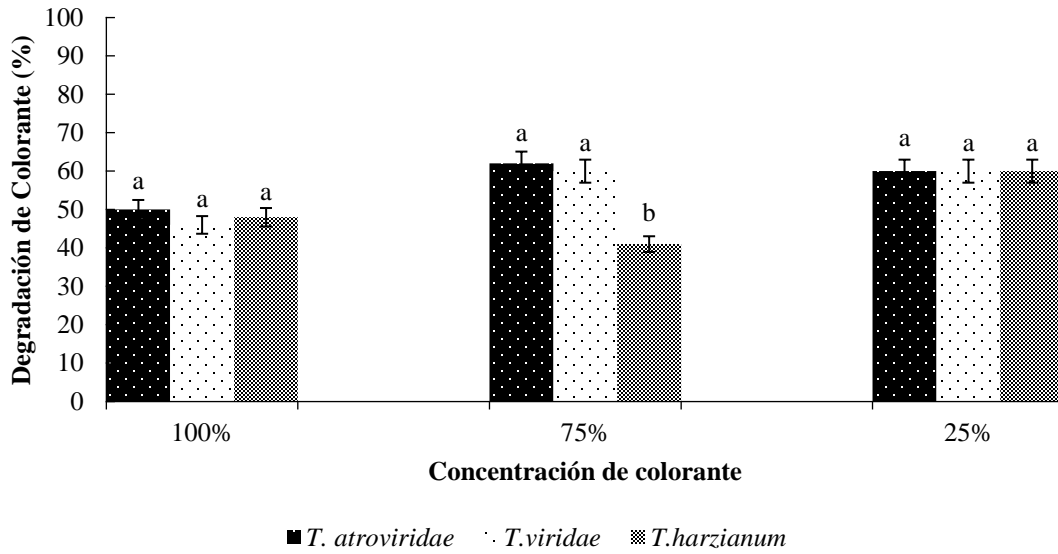


**Figura 63.** Comparación de No. de esporas en diferentes concentraciones de azul índigo.  
 \*Letras en diferentes columnas, muestran diferencia estadística ( $p < 0.05$ ).

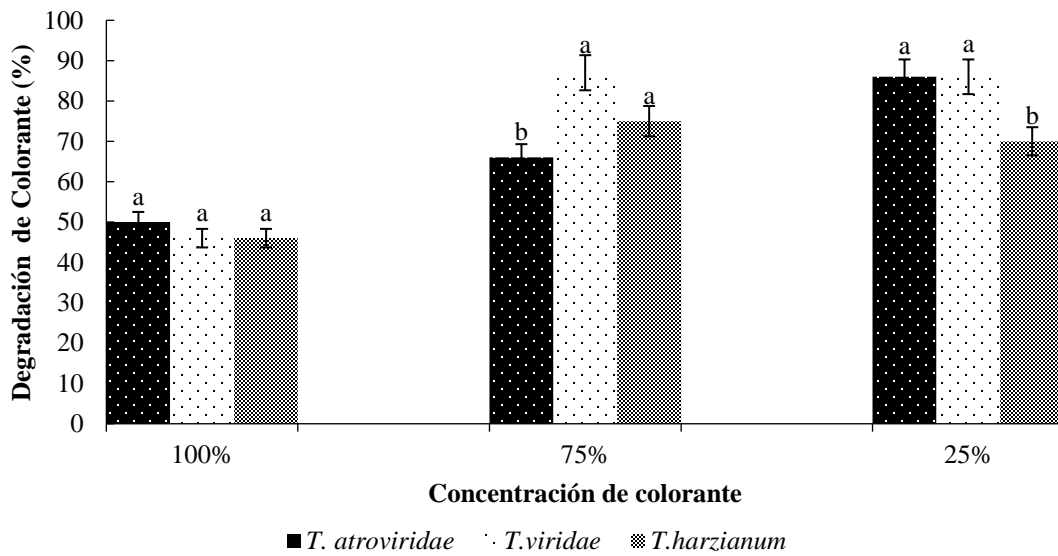


**Figura 64.** Comparación de No. de esporas en diferentes concentraciones de rojo congo  
 \*Letras en diferentes columnas, muestran diferencia estadística ( $p < 0.05$ ).

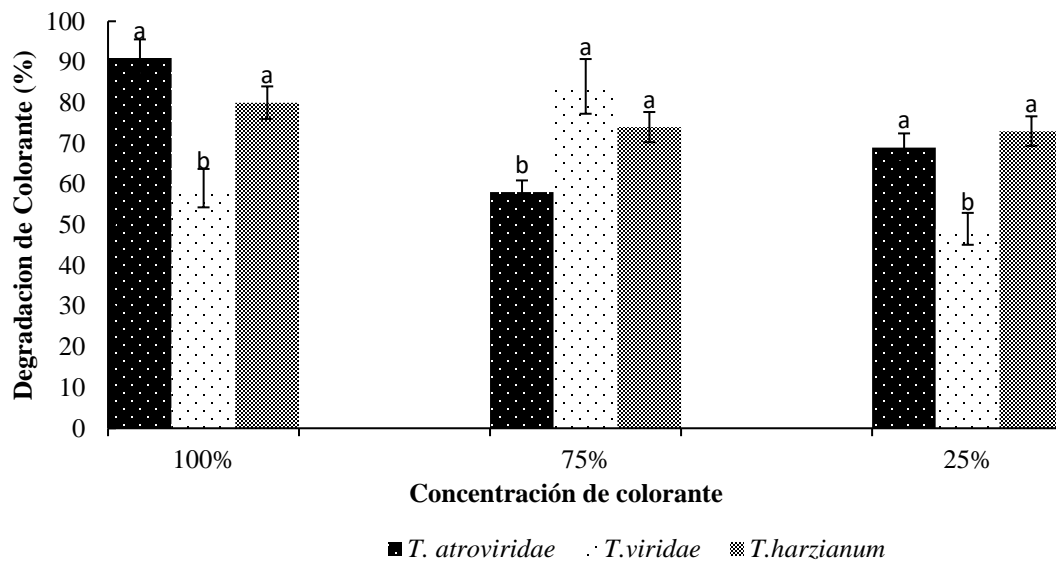
**TABLAS DE COMPARACIÓN ENTRE PORCENTAJES DE DEGRADACIÓN EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE COLORANTES.**



**Figura 65.** Degradación de diferentes concentraciones de Negro de eriocromo T  
\*Letras en diferentes columnas, muestran diferencia estadística (p<0.05).



**Figura 66.** Degradación de diferentes concentraciones de Azul índigo  
\*Letras en diferentes columnas, muestran diferencia estadística (p<0.05).



**Figura 67.** Degradación de diferentes concentraciones de rojo congo  
 \*Letras en diferentes columnas, muestran diferencia estadística ( $p < 0.05$ ).

## **Absorción de colorante de acuerdo a la concentración de colorante**

Los siguientes resultados fueron graficados con la finalidad de comparar los niveles de remoción por concentración de colorante para obtener una idea más clara de que colorante fue degradado en mayor grado y por lo tanto cual es el más fácil de tratar por las tres cepas del genero *Trichoderma*.

### **CONCENTRACIONES AL 100%**

Los tratamientos hechos al 100% de colorante muestran resultados similares de comportamiento (**Fig. 68**), ya que azul índigo y negro de eriocromo T muestran porcentajes de decoloración que rondan el 50%. Sin embargo el colorante que marca una diferencia notable se ve representado en el rojo congo al tener porcentajes de degradación que oscilan entre el 59% y 91%.

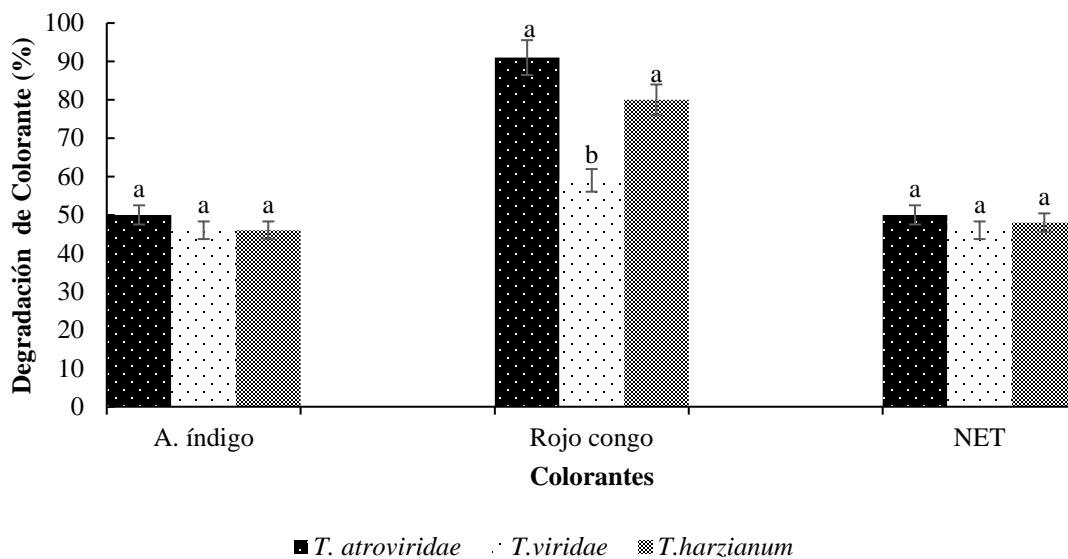
### **CONCENTRACIONES AL 75%**

En las concentraciones al 75% de colorante en un medio con negro de eriocromo T mostró disminuciones en porcentaje de degradación que se mantenían entre 41 y 62%, mientras que rojo congo y azul índigo mostraron los comportamientos de cepas más similares, al tener un rango de degradación que iba del 58% al 74% para el primero y de 66% a 87% por parte del segundo (**Fig. 69**).

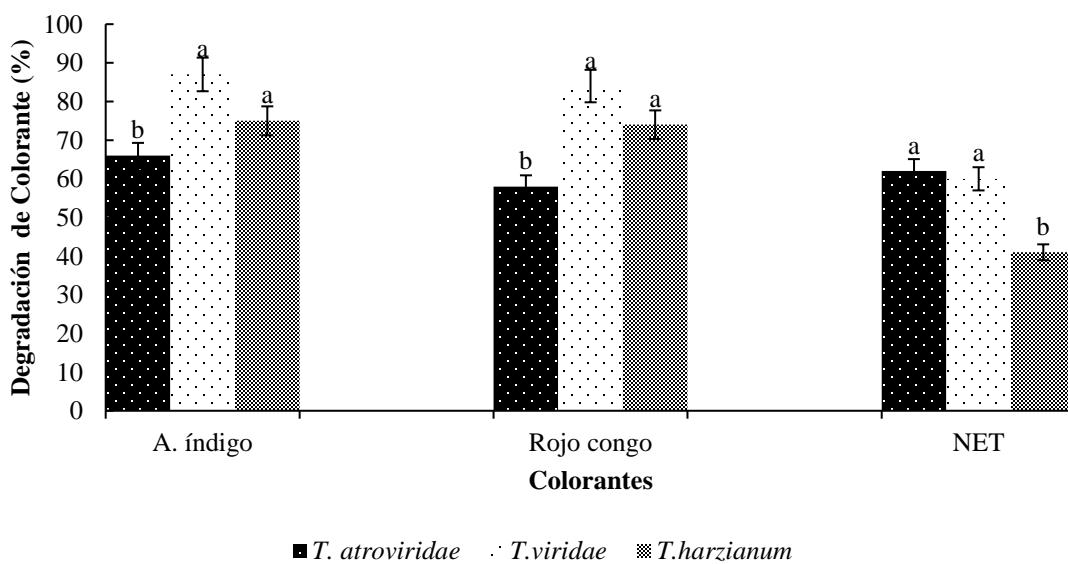
### **CONCENTRACIONES AL 25%**

En el grafico correspondiente a los tratamiento con 25% de colorante, se observa un porcentaje de absorción igual (60%) para las tres cepas de *Trichoderma* spp., siendo el negro de eriocromo T el que menos porcentaje de degradación mostro. Rojo congo se posiciona en segundo lugar de degradación al tener resultados entre 49 y 73% de decoloración. Azul índigo tuvo los mejores resultados al tener porcentajes que oscilaban entre 70 y 86% de degradación (**Fig. 70**).

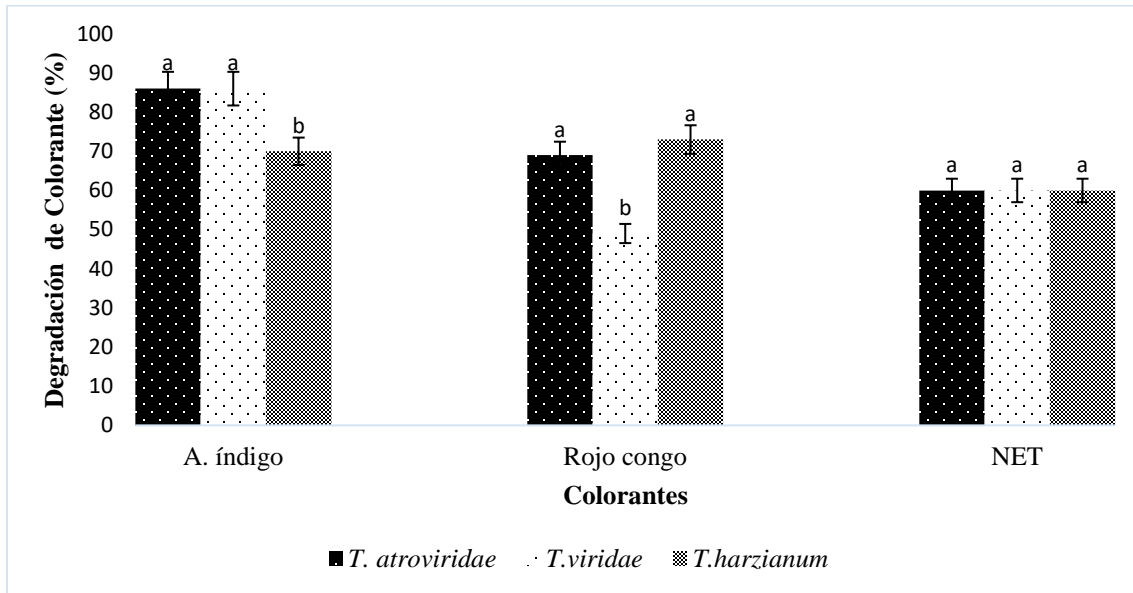
## Tablas de comparación entre colorantes y grados de absorción



**Figura 68.** Comparación de absorción en A. índigo, R. congo y Negro de eriocromo T al 100%  
\*Letras en diferentes columnas, muestran diferencia estadística ( $p < 0.05$ ).



**Figura 69.** Comparación de absorción en A. índigo, R. congo y Negro de eriocromo T al 75%  
\*Letras en diferentes columnas, muestran diferencia estadística ( $p < 0.05$ ).



**Figura 70.** Comparación de absorción en A. índigo, R. congo y Negro de eriocromo T al 25%  
 \*Letras en diferentes columnas, muestran diferencia estadística ( $p < 0.05$ ).

## Numero de esporas de acuerdo a la concentración de colorante

Los gráficos hechos para las tres diferentes concentraciones de cada color también fueron realizados para establecer la relación en cuanto a número de esporas por concentración de colorantes, teniendo en cuenta que los números podían ser diferentes debido a la concentración. Se debe indicar que se realizó un grupo testigo hecho solamente de PDA en placas Petri, el cual mostro números similares entre las tres cepas, observando 274 esporas para *Trichoderma viride*, 541 esporas para *T. atroviride* y la de mayor numero *Trichoderma harzianum*, con un total de 739 esporas. Este grupo testigo se utilizó como punto de comparación para analizar las esporas contadas en los tres diferentes colorantes.

### CONCENTRACIONES AL 100%

El menor número de esporas se vio reflejado en el colorante azul índigo, ya que este mostro un índice de esporas entre 406 esporas a 889. El negro de eriocromo T mostro resultados casi a la par, teniendo un promedio de esporas que iba de 909 a 1138 esporas. Por último el rojo congo mostro una diferencia significativa al presentar valores que llegaron hasta las 2479 esporas, indicando que a mayor concentración de rojo congo, cada una de las cepas esporulan más (**Fig. 71**).

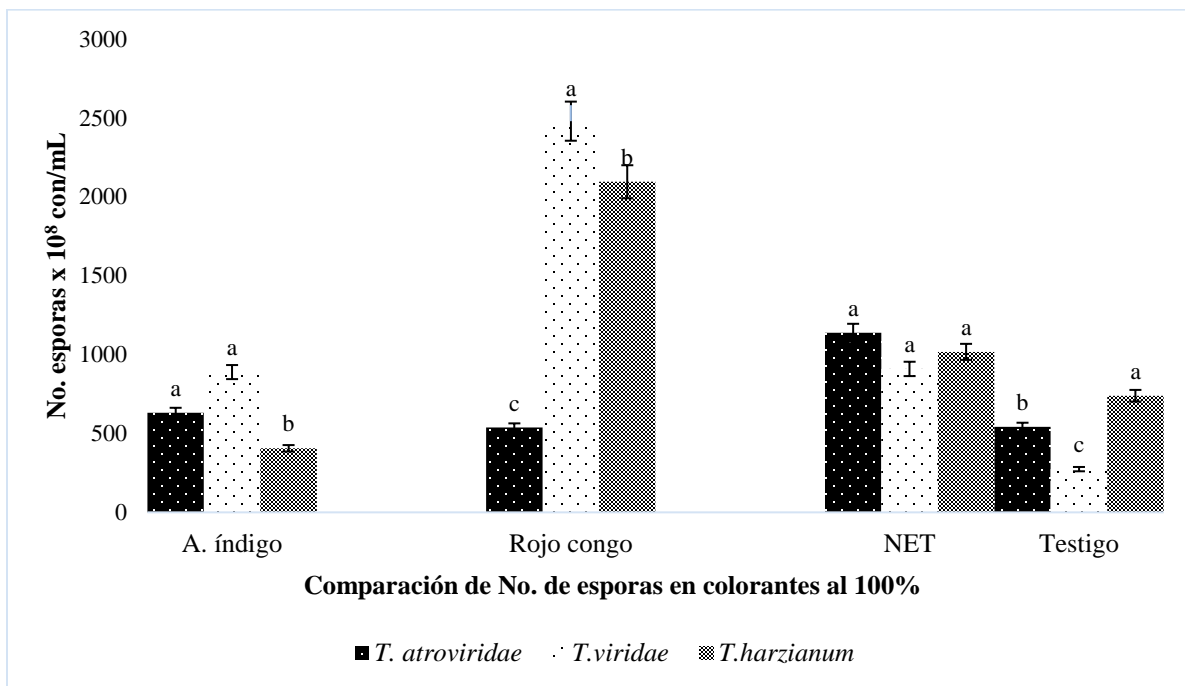
### CONCENTRACIONES AL 75%

Aquellos tratamientos conformados por una concentración al 75% mostraron resultados bastante dispares, por una parte la esporulación de azul índigo fue bastante pobre ya que ninguna cepa rebaso el umbral de las 250 esporas, mientras que negro de eriocromo T y rojo congo llegaron a mostrar números de esporas bastante altos pero no necesariamente similares en todas sus cepas. El NET se pudo observar que el número de esporas iba de 965 a 2631, rojo congo presentó una esporulación que llegó a alcanzar hasta las 2652 esporas. Estos fueron los resultados más dispares, pero también fueron los que obtuvieron un mayor número de esporas en NET y rojo congo (**Fig. 72**).

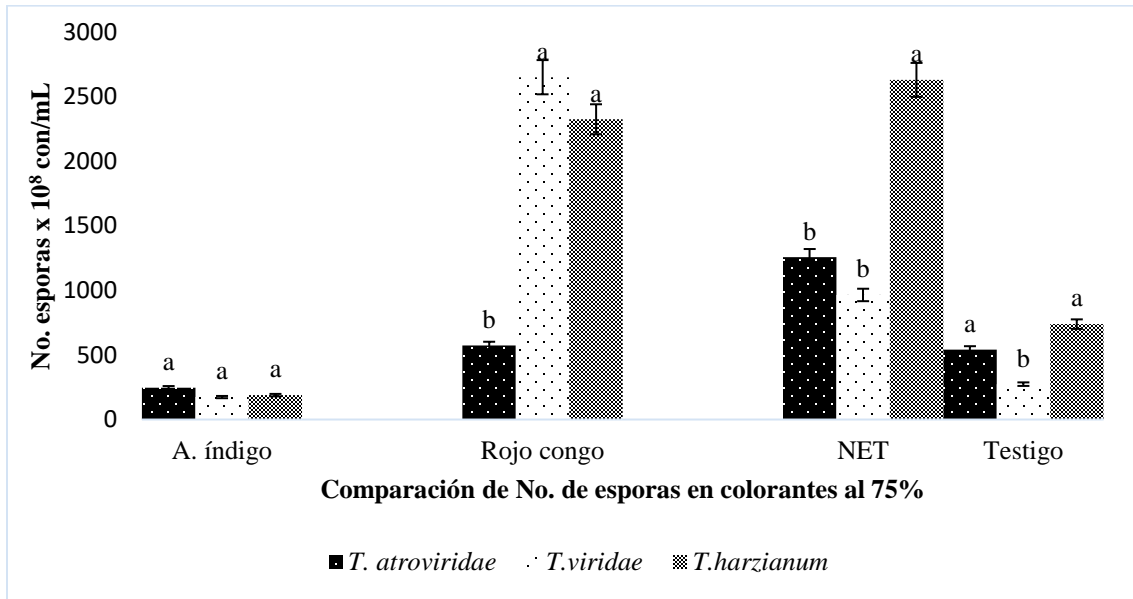
## CONCENTRACIONES AL 25%

En estos tratamientos vale la pena decir que la caída en cuanto el número de esporas en todas las cepas y en todos los colorantes fue demasiado notoria pues ninguno de los colorantes pudo superar el número de esporas contadas en los tratamientos testigo, probando así que a mayor cantidad de colorante en el medio existe una mejor respuesta para la esporulación de las tres cepas. En este caso, solamente la cepa *T. atroviride* dentro del colorante azul índigo fue la que reacciono mejor en una concentración del 25%, mientras que el resto de cepas no solamente en azul índigo, sino también en rojo congo y NET, no pudieron rebasar la cantidad de 280 esporas y en algunos casos, tampoco las 200 esporas (**Fig. 73**).

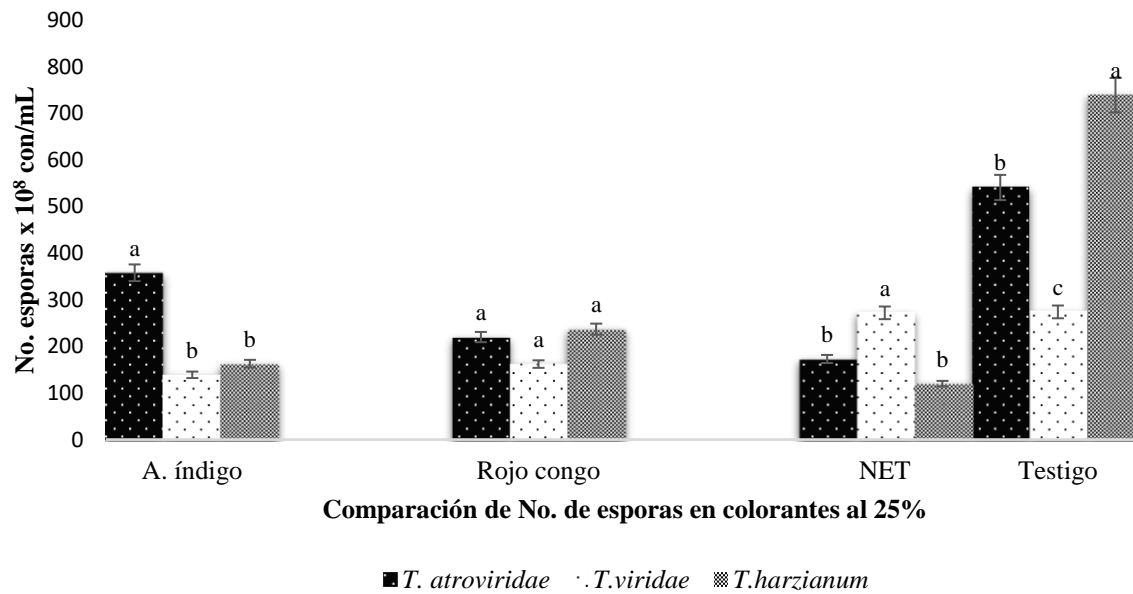
### Tablas de comparación entre colorantes y numero de esporas



**Figura 71.** Comparación de No. de esporas en A. índigo, R. congo y Negro de eriocromo T al 100%  
\*Letras en diferentes columnas, muestran diferencia estadística ( $p < 0.05$ ).



**Figura 72.** Comparación de No. de esporas en A. índigo, R. congo y Negro de eriocromo T al 75%  
 \*Letras en diferentes columnas, muestran diferencia estadística ( $p < 0.05$ ).



**Figura 73.** Comparación de No. de esporas en A. índigo, R. congo y Negro de eriocromo T al 25%  
 \*Letras en diferentes columnas, muestran diferencia estadística ( $p < 0.05$ ).

## Conclusiones

El micelio de las 3 cepas del género *Trichoderma* spp., crece más rápido y genera una mayor cantidad de biomasa en los tratamientos hechos con el colorante negro de eriocromo T.

La biomasa generada de las 3 cepas del género *Trichoderma* spp., en negro de eriocromo T termina tornándose amarillenta debido al pH.

El micelio de las 3 cepas del género *Trichoderma* spp., genera poca cantidad de biomasa cuando crece en el colorante rojo congo

El empleo de las 3 cepas del género *Trichoderma* spp., para la decoloración de azul índigo, rojo congo y negro de eriocromo T es eficiente.

La mejor respuesta de absorción obtenida en los tres colorantes por parte de las tres cepas de *Trichoderma* spp., fue en colorante Rojo Congo en general.

La 3 cepas de *Trichoderma* spp., tienen un mejor rendimiento de absorción en la concentración más alta (100%) de rojo congo.

Las mejores respuestas de absorción en el colorante negro de eriocromo T, fueron en las concentraciones al 75% y 25%.

Las mejores respuestas de absorción en el colorante azul índigo, fueron en las concentraciones al 75% y 25%.

La cepas de *Trichoderma* spp., tienen un bajo rendimiento de absorción en la concentración más alta (100%) de azul índigo y negro de eriocromo T.

La mayor cantidad de esporas generadas por las cepas de *Trichoderma* spp., se encuentran en aquellas concentraciones hechas al 100% y 75% de rojo congo.

La menor cantidad de esporas generadas por las cepas de *Trichoderma* spp., se encuentran en general en los tratamientos hechos con el colorante azul índigo.

## Bibliografía

- Agamez, E., Zapata, R., Oviedo, L., Barrera, J. 2008. Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* sp. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 10(2): 23-34.
- Ahmad, B., Bodha, R., Wani, A. 2010. Nutritional and medicinal importance of mushrooms. *Journal of Medicinal Plants Research.* 4(24): 2598-2604
- Ajibola, V., Oniye, S., Odeh, C., Olugbodi, T., Umeh, U. 2005. Biodegradation of Indigo Containing Textile Effluent Using Some Strains of Bacteria. *Journal of Applied Sciences.* 5: 853-855.
- Anastasi, A., Spina, F., Romagnolo, A., Tigini, V., Prigione, V., Varese, G. 2012. Integrated fungal biomass and activated sludge treatment for textile wastewaters bioremediation. *Bioresource Technology.* 123: 106–111.
- Arenas, R. 2013. *Micología Médica Ilustrada.* 5ª ed. México. Interamericana. McGraw-Hill, ISBN 13-978-970-10-6567-9; 10-970-10-6567-0
- Barrera, J., Suárez, D. Melgarejo, L. 2010. Análisis de crecimiento en plantas. *Experiments in plant Physiology*, 1(2):25-38
- Bhattacharya, S., Das, A., Mangai, G., Vignesh, K. y Sangeetha, J. 2011. Mycoremediation of congo red dye by filamentous fungi. *Brazilian Journal of Microbiology.* 42: 1526-1536
- Bissett, J. 1991. A revision of the genus *Trichoderma*. spp., Infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany*, 69: 2357-2372.
- Bissett, J. 1992. *Trichoderma atroviride.* *Canadian Journal of Botany*, 70(3): 639-641.
- Bonifaz, A. 2010. *Micología medica básica.* 3ra Ed. Mexico. *McGraw Hill:* pp. 1-5, 31-35.
- Boopathy, R. 2000. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology.* 74:63-67
- Buchert, J., Ranua, M., Siika-aho, M., Pere, J., Viikari, J. 1994. *Trichoderma reesei* cellulases in bleaching of kraft pulp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40:941-945.
- Cardona, M. Osorio, J. Quintero, J. 2009. Degradación de colorantes industriales con hongos ligninolíticos. *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia.* 48:27-37.

- Carreño, S.; Capello, S.; Gaitán, R.; Cifuentes, J.; Rosique, J. 2013. Caracterización del crecimiento miceliar in vitro de *Pleurotus albidus* Pegler 1983 y *Pleurotus djamor Boedijn* 1959, en Tabasco, México. *Kuxulkab' revista de divulgación: División 69*. 19 (37): 37-45.
- Chatterjee, S., Lee, D., Lee, M., Woo, S. 2009. Enhanced adsorption of congo red from aqueous solutions by chitosan hydrogel beads impregnated with cetyl trimethyl ammonium bromide. *Bioresource Technology*. 100(11):2803-2809.
- Chatterjee, S., Lee, M., Woo, S. 2010. Adsorption of congo red by chitosan hydrogel beads impregnated with carbon nanotubes. *Bioresource Technology*. 101(6): 1800-1806.
- Chekroun, B., Baghour, M. 2013. The role of algae in phytoremediation of heavy metals: A review *J. Mater. Environ. Sci.* 4(6): 873-880.
- Chen, Y., Huang, Y., Bai, Y., Fu, C., Zhou, M., Gao, B., Wang, C., Li, D., Hu, Y., Xu, N. 2017. Effects of mixed cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* in alcoholic fermentation on the physicochemical and sensory properties of citrus vinegar, *LWT - Food Science and Technology*. (84):753-763.
- Coventry, E., Noble, R., Mead, A., Marin, F., Perez, J., Whipps, J. 2006. Allium White Rot Suppression with Composts and *Trichoderma viride* in Relation to Sclerotia Viability. *Phytopathology*. 96(9):1009-20
- Cruz-Rizo, A., Gutiérrez-Granados, S., Salazar, R., Peralta-Hernández, J. 2016. Application of electro-Fenton/BDD process for treating tannery wastewaters with industrial dyes. *Separation and Purification Technology*. (172):296-302.
- Delgadillo-López, A., González-Ramírez, C., Prieto-García, F., Villagómez-Ibarra, J., Acevedo-Sandoval, O. 2011. Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 14 (2)
- Delira, R., Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R., Peña-Cabriales, J. 2009. Los géneros fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 25(4): 2009
- Dellamatrice, P. Silva-Stenico, M. Beraldo de Moraes, L. Fiore, M, Monteiro R. 2017. Degradation of textile dyes by cyanobacteria. *Brazilian journal of microbiology* 48. 25–31

- Fazal, T., Mushtaq, A., Rehman, F., Khan, A., Rashid, N., Farooq, W., Rehman, M., Xu, J. 2017. Bioremediation of textile wastewater and successive biodiesel production using microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 82(3): 3107-3126
- Ferreira, E., Hulme, A., McNab, H., Quye, A. 2004. The natural constituents of historical textile dyes. *Chemical Society Reviews*. 33(6):329-36.
- Gartland, K, Gartland, J. 2018. Opportunities in biotechnology. *Journal of Biotechnology*. (18)30-48.
- Gavrilescu, M. 2004. Removal of Heavy Metals from the Environment by Biosorption. *Engineering in Life Sciences*. 4(3): 219-232.
- Gerhardt, K., Gerwing, P., Greenberg, B. 2016. Opinion: Taking Phytoremediation from Proven Technology to Accepted Practice. *Plant Science*. 256:170-185.
- Gholami, A., Golestaneh, M., Andalib, Z. 2018. A new method for determination of cocamidopropyl betaine synthesized from coconut oil through spectral shift of Eriochrome Black T. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 192. 192:122-127.
- Gravesen, S. 1994. Allergic and non-allergic manifestations related to indoor fungal exposure—management of cases. In: Samson, R.A., Flannigan, B., Flannigan, M.E., Verhoeff, P. (Eds.), pp. 241–248.
- Gupta, C., Sharma, D., Aggarwal, S., Nagpal, N. 2013. Pigment production from *Trichoderma* spp., for dyeing of silk and wool. International. *Journal of Science and Nature*. 4(2): 351-355.
- Haia, F., Yamamoto, K., Fukushib, K. 2006. Development of a submerged membrane fungi reactor for textile wastewater treatment. *Desalination*. 192 (1–3): 315-322.
- Hawksworth, D.L.1991. The fungal dimension of the biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*. 95(6): 641-655.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., Monte, E. 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*. 158(1): 17-25.
- Herrera Sastoque, E. y Rincón Chisino, L. 2010. Evaluación in vitro de la decoloración de Índigo, Mediante el uso del hongo de podredumbre blanca, *Pleurotus ostreatus* sp. Pontifica Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias departamento de Microbiología Carrera de Microbiología Industrial. Bogotá. Colombia. 19(1): 179-187.

- Hunger, K. 2003. *Industrial Dyes: Chemistry, Properties, Applications*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, Cambridge, pp.27-28.
- Husain, Q. 2006. Potential applications of the oxidoreductive enzymes in the decolorization and detoxification of textile and other synthetic dyes from polluted water: a review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 26(4):201-21.
- Jalali, F., Zafari, D., Salari, H. 2017. Volatile organic compounds of some *Trichoderma* spp., increase growth and induce salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Fungal Ecology.* 29: 67-75.
- Jiang, X., Cao, L., Zhanga, R., Yana, L., Maoa, Y., Yanga, Y. 2014. Effects of nitrogen addition and litter properties on litter decomposition and enzyme activities of individual fungi. *Applied Soil Ecology.* 80: 108-115.
- Karimi-Shamsabadi, M., Mohsen, B., Babaheidari, A., Zeinab, S. 2017. Efficiently Enhancing Photocatalytic Activity of NiO-ZnO doped onto nanozeolite X by synergistic effects of pn heterojunction, supporting and zeolite nanoparticles in photo-degradation of Eriochrome Black T and Methyl Orange. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry.* 346: 133-143.
- Kaushal, S. and Chandel, S. 2017. Enhancing the shelf life of *Trichoderma* species by adding antioxidants producing crops to various substrates. *J. Crop Prot.* 6 (3): 307-314.
- Kendrick, B. 2007. Kingdom, Classification and Biodiversity. En: The Fifth Kingdom. <http://www.mycolog.com/CHAP1.htm>.
- Khataeea, A., Kasiri, M. 2010. Photocatalytic degradation of organic dyes in the presence of nanostructured titanium dioxide: Influence of the chemical structure of dyes. *Journal of Molecular Catalysis.* 7(5): 253–259.
- Krupke, O.A., Castle, A.J., Rinker, D.L. 2003. The North American mushroom competitor, *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, produces antifungal compounds in mushroom compost that inhibit mycelial growth of the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Mycol. Res.* 107(12):1467–1475.
- Kumari, A. 2015. Biodegradation of dyes by Basidiomycetes fungi using HPLC and UV –Visible Spectrophotometer. *Journal of Chemistry.* 4(1): 31-742.

- Lieckfeldt, E., Samuels, G., Nirenberg, H., Petrini, O. 1999. A Morphological and Molecular Perspective of *Trichoderma viride*: Is It One or Two Species? *Applied and Environmental Microbiology*. 65(6): 2418–2428.
- Méndez Vivar, J. 2009. Influencia de la química en el arte pictórico. *Contactos 74*, pp. 21–27.
- Mendoza, J. Pérez, M. Olivares, J. Pérez, N. González Prieto, J. Quiroz, J. 2011. Caracterización molecular y agronómica de aislados de *Trichoderma* spp nativos del noreste de México. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 13(2):176-185.
- Mohammed, H. A. 2015. Biodecolorization of Congo red Dye by using two species of Fungi. *Mesop. Environ.* 1(4):50-56.
- Namasivayam, C., Kavitha, D. 2002. Removal of congo red from water by adsorption onto activated carbon prepared from coir pith, an agricultural solid waste. *Dyes and Pigments*. 54(1): 47-58.
- Nascimento C, Paiva Magalhães D, Brandão M, Santos A, Chame M, Baptista D, Nishikawa M and Silva M. 2011. Degradation and Detoxification of Three Textile Azo Dyes by Mixed Fungal Cultures from Semi-Arid Region of Brazilian Northeast. *Braz. Arch. Biol. Technol*, 54. (3): 621-628.
- Navarro, M., González, M. 2013. Automatic Prediction of Poisonous Mushrooms. *Connectionist Systems*, pp. 341–349. DOI: 10.1007/978-3-319-00551-5\_42.
- O'Brien, B., Parrent, J., Jackson, J., Moncalvo, J., Vilgalys, R. 2005. Fungal community analysis by largescale sequencing of environmental samples. *Appl Environ Microbiol.* 71(9): 44-50.
- Paz, A., Carballo, J., Pérez, M.J y Domínguez, J.M. 2017. Biological treatment of model dyes and textile wastewaters. *Chemosphere*. 181:168-177.
- Pieper, D., Reineke, W. 2000. Engineering bacteria for bioremediation. *Environmental biotechnology*. 11(3):262-70.
- Quintero, L., Cardona, S. 2010. Tecnologías para la decoloración de tintes índigo e índigo carmín. *Revista DYNA*. 77 (162): 371-386.
- Rajendran, R.K. 2017. Enrichment, isolation, and biodegradation potential of long-branched chain alkylphenol degrading non-ligninolytic fungi from wastewater. *Marine Pollution Bulletin*. 125(1-2):416-425.

- Romero, O., Tello, I, Damián, M., Villareal, O., Aragón, A and Parraguirre, C. 2013. Identification and Evaluation of *Trichoderma* spp., Native, Present on eroded soils in Tetela de Ocampo, Puebla-Mexico. *Int. Res. J. Biological Sci*, 2(4): 1-7.
- Romero-Arenas O, Rivera J, Damián M. A, Villareal O, Márquez Specia M. and López Olguín F. J. 2013. Massive production of Mexican strains of *Trichoderma* spp., in different agricultural substrates. *European Journal of Experimental Biology*. 3(6):73-79.
- Romero-Arenas, O., Damián, M., Hernández, I., Parraguirre, J., Aragón, A y Victoria, A. 2012. Effect of pH on growth of the mycelium of *Trichoderma viride* and *Pleurotus ostreatus* in solid cultivation mediums. *African Journal of Agricultural Research*. 7 (34): 4724-4730.
- Romero-Arenas, Omar., Huerta, M., A., Domínguez, F., Arellano, D. 2009. Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 11(2):143-151.
- Ruggiero, E., Boukhalfa, H., Forsythe, H., Lack, G., Hersman, E., Neu, P. 2004. Actinide and metal toxicity to prospective bioremediation bacteria. *Environmental Microbiology*. 7(1):88-97.
- Saleh. T., Muhammad, A y Ali, S. 2016. Synthesis of hydrophobic cross-linked polyzwitterionic acid for simultaneous sorption of Eriochrome black T and chromium ions from binary hazardous waters. *Journal of Colloid and Interface Science*. 468: 324–333.
- Sankaran, S., Kumar, S., Jasti, N., Jin, B., Pometto, A., Van Leeuwen, J. 2010. Use of Filamentous Fungi for Wastewater Treatment and Production of High Value Fungal Byproducts: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 40(5):400-449.
- Schuster, A., Schmoll, M. 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 87(3): 787–799.
- Sharma, S., Malaviya, P. 2015. Bioremediation of tannery wastewater by chromium resistant novel fungal consortium. *Ecological Engineering*. 91: 419–425.
- Sindhuja, S., Samir, Khanal. Nagapadma, J., Bo, Jin. Anthony, L., Pometto, III. Van Leeuwen, H. 2010. Use of Filamentous Fungi for Wastewater Treatment and Production of High Value Fungal Byproducts: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 40(5): 400-449.

- Singh, A., Srivastava, S., Singh, H. 2007. Effect of substrates on growth and shelf life of *Trichoderma harzianum* and its use in biocontrol of diseases. *Bioresource Technology*. 98(2):470-3.
- Singh, L., and Singh, V. 2012. Microbial Decolourization of Textile Dyes by the Fungus *Trichoderma harzianum*. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 6(4):1829-1833.
- Singh, L., Singh, V. 2017. Decolourization of Azo (Acid Red) and Anthraquinonic (Basic Blue) Dyes by the Fungus *Aspergillus flavus*. *International Journal of Biomedical Engineering and Clinical Science*. 3(1): 1-5.
- Singh, R., Singh, C. 2018. A comprehensive study of eco-friendly natural pigment and its applications. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 13: 22–26.
- Sivakumar, G., Xu, J., Thompson, R., Yang, Y., Randol-Smith, P., Weathers, P. 2012. Integrated green algal technology for bioremediation and biofuel. *Bioresource Technology*. 107: 1-9.
- Skoneczny, D., Oskiera, M., Szczech, M., Bartoszewski, G. 2015. Genetic diversity of *Trichoderma atroviride* strains collected in Poland and identification of loci useful in detection of within-species diversity. *Breeding and Biotechnology*. 60(4):297-307.
- Tatarko, M., y Bumpus J. 1997. Biodegradation of congo red by phanerochaete chrysosporium. *Wat. Res.* 32(5): 1713-1717.
- Torres, E. 2014. Remoción del colorante azul índigo por cuatro cepas fúngicas del género *Trichoderma*. Universidades Veracruzana, Xalapa, Ver., pp. 47-52
- Vázquez, A. Martínez, G. Estrada, A. 2002. Influencia del pH en el crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorrizógenos. *Anales del Instituto de Biología. Serie Botánica*. 73(1): 1-15.
- Verma M., Brar S.K., Tyagi R.D., Surampalli R.Y. y Valéro J.R. 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp. Panoply of biological control. *Biochem. Eng. J.* 37(1): 1-20.
- Vidali, M. 2001. Bioremediation. An overview. *Pure Appl. Chem.* 73(7): 1163–1172.
- Wang, L., Ji, B., Hu, Y., Liu, R., Sun, W. 2017. A review on in situ phytoremediation of mine tailings. *Chemosphere*. 184:594-600.
- Wang, R., Jin, X., Wang, Z., Gu, W., Wei, Z., Huang, Y., Qiu, Z., Jin, P. 2017. A multilevel reuse system with source separation process for printing and dyeing wastewater treatment: a case study. *Bioresource Technology*. 247: 1233-1241.

- Wang, X., Xu, S., Wu, S., Feng, S., Bai, Z., Zhuang, G., Zhuang, X. 2017. Effect of *Trichoderma viride* biofertilizer on ammonia volatilization from an alkaline soil in Northern China. *Journal of Environmental Sciences*. 66: 199-207.
- Zaharia, C., and Suteu, D. 2012. Textile Organic Dyes – Characteristics, Polluting Effects and Separation/Elimination Procedures from Industrial Effluents – A Critical Overview, Organic Pollutants Ten Years After the Stockholm Convention. *Environmental and Analytical Update.*, DOI: 10.5772/32373. Available from: <https://www.intechopen.com/books/organic-pollutants-ten-years-after-the-stockholm-convention-environmental-and-analytical-update/textile-organic-dyes-characteristics-polluting-effects-and-separation-elimination-procedures-from-in>
- Zaragoza, O. 2017. Reference Module in Life Sciences. Chapter: *Mycology*. Elsevier. Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. ISBN: 978-0-12-809633-8.
- Zhang, C., Druzhinina, I., Kubick, C.P., Xu, T. 2005. *Trichoderma* biodiversity in China: evidence for a north to southern distribution of species in East Asia. *FEMS Microbiol.* 251(2):251-7.

## **Imágenes (Fuentes)**

- Gürses, A., Açıkyıldız, M., Güneş, K. 2016. Dyes and Pigments. *Green Chemistry for Sustainability*, p. 13-29. DOI 10.1007/978-3-319-33892-7\_2
- Madouh., S. Masoud, H., Hanan., B. 2002. Dissociation constants of eriochrome black T and eriochrome blue black RC indicators and the formation constants of their complexes with Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Cd(II), Hg(II), and Pb(II), under different temperatures and in presence of different solvents. *Thermochimica Acta*. 381(2): 119-131.
- Mahmoud, M.E. 2017. Sustainable super-fast adsorptive removal of Congo red dye from water by a novel technique based on microwave-enforced sorption process. *J. Ind. Eng. Chem.* 57: 28-36.

- Osorio-Concepción, M., Casas-Flores, S., Cortés-Penagos, C. 2013. Efecto de la limitación de fosfato sobre la conidiación de *Trichoderma atroviride* y mutantes ciegas a la luz. *Revista mexicana de micología*. 37: 41-50.
- Romero-Arenas, Omar., Huerta, M., A., Domínguez, F., Arellano, D. 2009. Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 11 (2): 143-151.
- Saleh. T., Muhammad, A y Ali, S. 2016. Synthesis of hydrophobic cross-linked polyzwitterionic acid for simultaneous sorption of Eriochrome black T and chromium ions from binary hazardous waters. *Journal of Colloid and Interface Science*. 468: 324–333.
- Vigo-Quiñones A. 2011. Hongos Entomopatogenos. En: <https://es.slideshare.net/alfvigo/hongos-entomopatgenos>. Consultado: 01 de enero del 2018.
- Zhang, C., Druzhinina, I., Kubick, C.P., Xu, T. 2005. Trichoderma biodiversity in China: evidence for a north to southern distribution of species in East Asia. *FEMS Microbiol* 251(2):251-7.
- Zhu, X., Bao, L., Wei, Y., Ma, J., Kong, Y. 2016. Removal of toxic indigo blue with integrated biomaterials of sodium carboxymethyl cellulose and chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*. 91:409-15.

# Índice de figuras

**Figura 1.** Espectro electromagnético. Pag. 6

**Figura 2.** Estructura química de Azul Índigo. Pag. 9

**Figura 3.** Estructura química de Rojo Congo. Pag. 10

**Figura 4.** Estructura química de Negro de Eriocromo T. Pag. 10

**Figura 5.** Conidióforos de *T. harzianum*. Pag. 16

**Figura 6.** Conidióforos de *Trichoderma atroviride*. Pag. 16

**Figura 7.** Conidióforos de *Trichoderma viride*. Pag. 17

**Figura 8.** Preparación de agar dextrosa de papa gelificado e inoculación del grupo testigo con tres cepas de *Trichoderma spp.*, Pag. 23

**Figura 9.** Preparación del agar de dextrosa de papa gelificado con colorantes a diferentes concentraciones. Pag. 24

**Figura 10.** Vertido del agar de dextrosa de papa con el colorante azul índigo en cajas Petri. Pag. 24

**Figura 11.** Grupo testigo, PDA inoculado con *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* y *Trichoderma atroviride*, con repeticiones de tres placas por cada cepa. Pag. 25

**Figura 12.** Grupos experimentales PDA + Rojo congo (696.665 P.M., a 1 M) inoculado con *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* y *Trichoderma atroviride*, a concentraciones de 100 %, 75%, y 25% con repeticiones de tres placas por cada cepa. Pag. 26

**Figura 13.** Grupos experimentales PDA + Azul índigo (266.27 P.M., a 1 M) inoculado con *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* y *Trichoderma atroviride*, a concentraciones de 100 %, 75%, y 25% con repeticiones de tres placas por cada cepa. Pag. 26

**Figura 14.** Grupos experimentales PDA + Negro de eriocromo T (461,381 P.M., a 1 M) inoculado con *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* y *Trichoderma atroviride*, a concentraciones de 100 %, 75%, y 25% con repeticiones de tres placas por cada cepa. p. 27

**Figura 15.** Mediciones de pH de los tres colorantes a diferentes concentraciones. Pag. 28

**Figura 16.** Filtración del colorante. Pag. 29

**Figura 17.** Colorante en placa de plástico. Pag. 30

**Figura 18.** Lecturas en espectrofotómetro. Pag. 30

**Figura 19.** Distribución de datos relacionados a la velocidad de crecimientos para las diferentes cepas de *Trichoderma* spp. En los colorantes azul índigo, rojo congo y negro de eriocromo T hechos en tres diferentes concentraciones (100%, 75%, 25%,). Pag. 36

**Figura 20.** Grupos testigos: a) *T. atroviride* b) *T. viride* y c) *T. harzianum* en medio PDA. Pag. 37

**Figura 21.** No. Esporas: a) *Trichoderma atroviride*, b) *Trichoderma viride* y c) *Trichoderma harzianum*, vistas en cámara de Neubauer “Grupo testigo”. Pag. 38

**Figura 22.** Decoloración de NET en medio de PDA: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum*, en una concentración al 100%. Pag. 40

**Figura 23.** Decoloración de NET en medio de PDA: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum*, en una concentración al 75%. Pag. 41

**Figura 24.** Decoloración de NET en medio de PDA: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum*, en una concentración al 25%. Pag. 42

**Figura 25.** Esporas de: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum*, en NET al 100%. Pag. 43

**Figura 26.** Esporas de: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum*, en NET al 75%. Pag. 44

**Figura 27.** Esporas de: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum*, en NET al 25%. Pag. 44

**Figura 28.** Absorción y remoción de NET (461,381 P.M., a 1 M), con *Trichoderma atroviride* al 75 y 25% de concentración. Pag. 45

**Figura 29.** *T. atroviride*, *T. viride* y *T. harzianum* en una concentración al 100% de NET. Pag. 46

**Figura 30.** Cepas: a) *T. atroviride* b) *T. viride* y c) *T. harzianum*, en NET al 100%. Pag. 46

**Figura 31.** *T. atroviride*, *T. viride* y *T. harzianum* en una concentración al 75% de NET. Pag. 47

**Figura 32.** Cepas: a) *T. atroviride* b) *T. viride* y c) *T. harzianum*, en NET al 75%. Pag. 47

**Figura 33.** *T. atroviride*, *T. viride* y *T. harzianum* en una concentración al 25% de NET. Pag. 48

**Figura 34.** Cepas: a) *T. atroviride* b) *T. viride* y c) *T. harzianum*, en NET al 25%. Pag. 48

**Figura 35.** Degradación de Negro eriocromo T documentada por Saleh *et al.* (2016). Pag. 49

**Figura 36.** Decoloración de azul índigo en medio de PDA: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum* en una concentración al 100%. Pag. 51

**Figura 37.** Decoloración de azul índigo en medio de PDA: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum* en una concentración al 75%. Pag. 52

**Figura 38.** Decoloración de azul índigo en medio de PDA: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum* en una concentración al 25%. Pag. 53

**Figura 39.** Esporas de: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum*, en Azul índigo al 100%. Pag. 54

**Figura 40.** Esporas de: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum*, en Azul índigo al 75%. Pag. 55

**Figura 41.** Esporas de: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum*, en Azul índigo al 25%. Pag. 55

**Figura 42.** Absorción y remoción de azul índigo (266.27 P.M., a 1 M) con la cepa *Trichoderma viride* al 75% y 25% de colorante. Pag. 56

**Figura 43.** *T. atroviride*, *T. viride* y *T. harzianum* en una concentración al 100% de azul índigo. Pag. 57

**Figura 44.** Cepas: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum* en azul índigo al 100%. Pag. 57

**Figura 45.** *T. atroviride*, *T. viride* y *T. harzianum* en una concentración al 75% de azul índigo. Pag. 58

**Figura 46.** Cepas: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum* en azul índigo al 75%. Pag. 58

**Figura 47.** *T. atroviride*, *T. viride* y *T. harzianum* en una concentración al 25% de azul índigo. Pag. 59

**Figura 48.** Cepas: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum* en azul índigo al 25%. Pag. 59

**Figura 49.** Decoloración de rojo congo en medio de PDA: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum* en una concentración al 100%. Pag. 62

**Figura 50.** Decoloración de rojo congo en medio de PDA: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum* en una concentración al 75%. Pag. 63

**Figura 51.** Decoloración de rojo congo en medio de PDA: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum* en una concentración al 25%. Pag. 64

**Figura 52.** Esporas de: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum*, en rojo congo al 100%. Pag. 65

**Figura 53.** Esporas de: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum*, en rojo congo al 75%. Pag. 66

**Figura 54.** Esporas de: a) *T. atroviride*, b) *T. viride* y c) *T. harzianum*, en rojo congo al 25%.  
Pag. 66

**Figura 55.** Absorción y remoción de rojo congo (696.665 P.M., a 1 M) con la cepa *Trichoderma harzianum* al 75% y 25% de colorante. Pag. 67

**Figura 56.** Cepas: *T. atroviride*, *T. viride* y *T. harzianum* actuando en una concentración al 100% de rojo congo. Pag. 68

**Figura 57.** Cepas: a) *T. atroviride* b) *T. viride* y c) *T. harzianum* en rojo congo al 100%. P. 68

**Figura 58.** Cepas: *T. atroviride*, *T. viride* y *T. harzianum* actuando en una concentración al 75% de rojo congo. Pag. 69

**Figura 59.** Cepas: a) *T. atroviride* b) *T. viride* y c) *T. harzianum* en rojo congo al 75%. Pag. 69

**Figura 60.** Cepas: *T. atroviride*, *T. viride* y *T. harzianum* actuando en una concentración al 25% de rojo congo. Pag. 70

**Figura 61.** Cepas: a) *T. atroviride* b) *T. viride* y c) *T. harzianum* en rojo congo al 25%. Pag. 70

**Figura 62.** Comparación de No. de esporas en diferentes concentraciones de negro de eriocromo T. Pag. 72

**Figura 63.** Comparación de No. de esporas en diferentes concentraciones de azul índigo. Pag. 72

**Figura 64.** Comparación de No. de esporas en diferentes concentraciones de rojo congo. Pag. 73

**Figura 65.** Degradación de diferentes concentraciones de Negro de eriocromo T. Pag. 74

**Figura 66.** Degradación de diferentes concentraciones de Azul índigo. Pag. 74

**Figura 67.** Degradación de diferentes concentraciones de rojo congo. Pag. 75

**Figura 68.** Comparación de absorción en A. índigo, R. congo y Negro de eriocromo T al 100%.  
Pag. 77

**Figura 69.** Comparación de absorción en A. índigo, R. congo y Negro de eriocromo T al 75%.  
Pag. 77

**Figura 70.** Comparación de absorción en A. índigo, R. congo y Negro de eriocromo T al 25%.  
Pag. 78

**Figura 71.** Comparación de No. de esporas en A. índigo, R. congo y Negro de eriocromo T al 100%. Pag. 80

**Figura 72.** Comparación de No. de esporas en A. índigo, R. congo y Negro de eriocromo T al 75%. Pag. 81

**Figura 73.** Comparación de No. de esporas en A. índigo, R. congo y Negro de eriocromo T al 25%. Pag. 81

## **Índice de tablas**

**Tabla 1.** Clasificación de los tintes por uso o método de aplicación. **Pag P. 7**

**Tabla 2.** Jerarquía taxonómica de *Trichoderma* spp. Pag. 14

**Tabla 3.** Velocidad de crecimiento de tres cepas del genero *Trichoderma* en los colorantes azul índigo, rojo congo y negro de eriocromo T a diferentes concentraciones. Pag. 34

**Tabla 4.** Tasa desarrollo de tres cepas del genero *Trichoderma* en los colorantes azul índigo, rojo congo y negro de eriocromo T a diferentes concentraciones. Pag. 35