



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES



"La Tierra no es de nosotros, nosotros somos de la Tierra"

"Utilización de Lacasa de *Pleurotus ostreatus* y su Biomasa Residual para la Degradación de Colorantes Azoicos y la Remoción de Metales en Aguas Residuales"

TESIS

Que para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS AMBIENTALES

Presenta

MARÍA DE LA LUZ ANGÉLICA VALLEJO AGUILAR

Director de tesis:

Dr. José Víctor Rosendo Tamariz Flores



Febrero 2021



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
PUEBLA**



INSTITUTO DE CIENCIAS

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

"La Tierra no es de nosotros, nosotros somos de la Tierra"

"Utilización de Lacasa de *Pleurotus ostreatus* y su Biomasa Residual para la Degradación de Colorantes Azoicos y la Remoción de Metales en Aguas Residuales"

TESIS

Que para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS AMBIENTALES

Presenta

MARÍA DE LA LUZ ANGÉLICA VALLEJO AGUILAR

Comité tutorial:

Director	Dr. José Víctor Rosendo Tamariz Flores
Co-Director	Dr. Marco Antonio Marín Castro
Integrante Comité Tutorial	Dra. María Elena Ramos Cassellis
Integrante Comité Tutorial	Dra. Sonia Emilia Silva Gómez
Integrante Comité Tutorial	Dr. Fernando Hernández Aldana

Febrero 2021



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

TESIS DOCTORAL

“Utilización de lacasa de *Pleurotus ostreatus* y su biomasa residual para la degradación de colorantes azoicos y la remoción de metales en aguas residuales”.

PRESENTA

María de la Luz Angélica Vallejo Aguilar

DIRECTOR

Dr. José Víctor Tamaríz Flores

CODIRECTOR

Dr. Marco Antonio Marín Castro

DEDICATORIAS

A mis padres Guillermo Vallejo Tépo x y Sara Aguilar Avendaño con todo mi amor por su educación predicando siempre con el ejemplo.

A mis hermanos con todo cariño por su apoyo incondicional en especial a mi hermana Ana María Vallejo Aguilar y a mi hermano Octavio Javier Vallejo Aguilar.

A mis hijas Aurea Angélica Madero Vallejo y Tania Luz de Carmen Madero Vallejo por todo el amor y respeto brindado.

Mis sobrinos y sobrinas en particular a mi sobrino Rael David Vallejo Guerra por su valioso cariño.

A mis amigos con todo mi amor en especial a mi ángel Rocío Gilbón Rosete.

A mi director de tesis el doctor José Víctor Tamariz Flores, a mi codirector Marco Antonio Marín Castro al comité tutorial: Dra. Dra. Sonia Emilia Silva Gómez, Dr. Fernando Hernández Aldana QEPD y a la Dra. María Elena Ramos Cassellis.

Una mención especial a la doctora María Elena Ramos Cassellis y al doctor Marco Antonio Marín Castro por su invaluable dirección.

Al posgrado en Ciencias Ambientales al coordinador Dr. Eduardo Torres Ramírez, así como a la planta docente.

ÍNDICE

RESUMEN	8
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUCCIÓN	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
3. DEFINICIÓN DE CONCEPTOS.....	5
3.1. Biorremediación.....	5
3.2. Fitorremediación	5
3.3. Biorremediación bacteriana.....	6
3.4. Biorremediación enzimática.....	6
3.5. Micorremediación	6
3.6. Hongos ligninolíticos	7
3.7. Lacasas	8
3.8. Sustrato residual	8
3.9. Metales pesados y salud.....	10
3.10. Metales pesados definición.....	11
3.11. Los colorantes	11
3.12. Biofiltro.....	14
4. PREGUNTAS GENERALES DE INVESTIGACIÓN	15
5. PREGUNTAS PARTICULARES	15
6. OBJETIVOS GENERALES.....	16
7. OBJETIVOS PARTICULARES	16
8. JUSTIFICACIÓN	17
8.1. Justificación Teórica	17
8.2. Justificación metodológica.....	18
8.3. Justificación ambiental.....	18
9. MARCO TEÓRICO.....	19

9.1. El reino fungí	19
9.2. Micorremediación	20
9.3. Contaminación del agua.....	22
9.4. Metales pesados.....	24
9.5. Colorantes azoicos.....	27
10. HIPÓTESIS.....	31
11. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	31
12. MATERIALES Y MÉTODOS	32
12.1. Material biológico.....	33
12.2. Reactivos.....	33
12.3. Obtención del micelio vegetativo	33
12.4. Preparación del micelio activado	33
12.5. Obtención de biomasa (adsorbente) en medio líquido.....	33
12.6. Soluciones para evaluar la adsorción de metales en medio líquido (adsorbato).....	34
12.7. Medio de cultivo para evaluar la tolerancia e inhibición del crecimiento miceliar	34
12.8. Descripción del efecto de las concentraciones metálicas sobre el micelio de <i>P. ostreatus</i> por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).	35
12.9. Construcción del biofiltro.	35
12.10. Eficiencia del biofiltro con el material residual del cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i> y la cinética de retención de las concentraciones metálicas.	37
13. CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DEL COLORANTE AZOICO POR LA ENZIMA LACASA DE LA CEPA DE <i>P. ostreatus</i> EN MEDIO LÍQUIDO.	37
13.1. Etapa I ensayos cualitativos en placa-agar de la decoloración del rojo 23 por la enzima lacasa.....	38
13.1.1 Método cualitativo	38
13.1.2. Evaluación en medio líquido de la decoloración del rojo 23 por la enzima lacasa .	38
13.1.3. Inoculación de agua artificialmente coloreada con biomasa miceliar de <i>Pleurotus ostreatus</i>	39
13.1.4. Curva de calibración de colorante rojo 23	39
13.2 Etapa II. Evaluación de la Decoloración del Colorante	40
13.3.1 <i>Determinación de lacasa</i>	41
13.3.2 <i>Actividad enzimática</i>	42
14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EL ENSAYO DE RETENCIÓN O BIOSORCIÓN DE METALES.....	43

15. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
15.1. Evaluación de la Adsorción de Metales en Medio Líquido	43
15.2. Evaluación de Concentraciones Metálicas Inhibitorias del Crecimiento Miceliar	49
15.3. Descripción del Efecto de la Concentración Metálica en la Morfología de Estructuras Miceliales por Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)	53
15.4. Resultados del Biofiltro con el Material Residual de <i>P. ostreatus</i>	56
15.5. Curva de Calibración del Colorante Rojo 23	¡Error! Marcador no definido.
15.6. Resultados Degradación del Colorante Azoico por la Enzima Lacasa de la Cepa de <i>Pleurotus ostreatus</i>	57
15.7. Resultados de la Actividad Enzimática de la Enzima Lacasa.....	59
16. CONCLUSIONES	60
17. AGRADECIMIENTOS	64
18. BIBLIOGRAFÍA	64
Solución Buffer de Acetato de Sodio a 0.1 M y pH 5	80
Solución de ABTS a 1mM.....	80

RESUMEN

La contaminación de las aguas residuales por metales y colorantes azoico provenientes de la industria textil, ha ocasionado una gran preocupación a nivel mundial por los daños sociales, económicos, ambientales y de salud, estas aguas residuales se han convertido en un recurso hídrico vital de utilidad en la agricultura, además de que este tipo de contaminantes no son biodegradables, son bioacumulables, llevan un proceso de biomagnificación y son altamente tóxicos. En este trabajo es importante establecer una metodología para su descontaminación a través de procesos biológicos. En particular, con hongos del filo *basidiomycota*, los basidiomicetos ejecutores de la pudrición blanca de la madera que utilizan enzimas extracelulares degradadoras de la lignina y que han demostrado que pueden degradar una serie de contaminantes orgánicos persistentes (COP) entre los que destacan los colorantes azoicos textiles, también con su micelio o biomasa pueden eliminar metales disueltos en agua mediante procesos de biosorción, actuando como intercambiadores innatos al remover metales. Se debe mencionar, además que la producción de estos hongos específicamente *Pleurotus ostreatus* incrementa la obtención de sustrato residual el cual tiene la característica de contener materiales lignocelulósicos los cuales están relativamente degradados y contienen biomasa fúngica que pueden ayudar a la absorción de productos contaminantes.

PALABRAS CLAVE: Aguas Residuales, Biosorción, *Pleurotus ostreatus*, colorantes azoicos, metales pesados.

ABSTRACT

Worldwide, the contamination of wastewater by metals and azo dyes from different types of industries, especially textiles, has caused great concern on a large scale for social, economic, environmental and health damages, furthermore, these wastewaters have become a vital water resource used in agriculture, since these types of pollutants are not biodegradable, they are bioaccumulative, carry a biomagnification process and are highly toxic, therefore, it is important to establish a methodology for its decontamination through biological processes. In particular, with fungi of the phylum *Basidiomycota*, basidiomycetes, executors of white rot of wood, since they have shown that they can degrade a series of persistent organic pollutants (POP_s) among those that stand out the textile azo dyes, also with their mycelium or biomass they can eliminate metals dissolved in water through biosorption processes, acting as innate exchangers by removing metals. It should also be mentioned that the production of these fungi specifically *Pleurotus ostreatus* increases the obtaining of residual substrate which has the characteristic of containing lignocellulosic materials which are relatively degraded and they contain fungal biomass that can help the absorption of polluting products.

KEYWORDS: Wastewater, biosorption, *Pleurotus ostreatus*, azo dyes, heavy metals.

1. INTRODUCCIÓN

El estado de Puebla se encuentra localizado en el centro de la República Mexicana, limita al este con el estado de Veracruz; al poniente con los estados de Hidalgo, México, Tlaxcala y Morelos y al sur con los estados de Oaxaca y Guerrero. Tiene una superficie continental de 34,290 Km², agua renovable de 11,578 hm³ por año al 2016 así mismo su población en ese mismo año era de 6.25 millones de habitantes, su aportación al PIB nacional en el año 2015 fue de 3.24% (CONAGUA, 2017). Puebla es el quinto estado más poblado del país viven aproximadamente 5 millones de personas, sus recursos hídricos son principalmente fuentes de agua superficial como ríos, arroyos y cuerpos de agua como lagos y presas y aguas subterráneas como manantiales (INEGI, 2010).

Se reconocen cuatro áreas hidrológicas una se encuentra en Pánuco al noroeste del estado; la segunda en Tuxpan- Nautla al norte; el tercero en Papaloapan al este y sureste y el cuarto en Balsas en el centro (INEGI, 2010; Ramos y Moran, 2016).

El INEGI (2010) reporta que en el estado de Puebla, el 24.84% del agua que se utiliza es subterránea y el 75.16% es agua superficial, además CONAGUA (2014) calculo que el agua disponible sería superior a 5 000 Mm³ anuales pero dicha agua que ingresa no se encuentra bien distribuida.

Martínez- Morales *et al.* (2015) nos dicen que en el Estado existen 19 acuíferos, pero de estos dos se encuentran sobreexplotados como son los del Valle de Tecamachalco de la cuenca del río Atoyac y el de Tepalcingo- Axochiapan de la cuenca del río Amacuzac. Existen casos de contaminación extrema por descargas de aguas residuales de industrias y de hogares en los ríos

Atoyac y Alseseca se debe agregar también que las aguas residuales que corren por el drenaje de Valsequillo contiene metales pesados como zinc, plomo, cobre, níquel, selenio, cadmio cromo y mercurio (Puga, 2011; Pérez *et al.*, 2018).

Los metales pesados son bioacumulables y no biodegradables y provocan toxicidad a bajas concentraciones por ello causan riesgo a la salud y al equilibrio de los ecosistemas esto es provocado por depositar residuos industriales en cuerpos de agua y suelos (Tejada *et al.*, 2015; Strokal *et al.*, 2018)

Entre los metales pesados que están en el ambiente en pequeñas cantidades, pero se pueden acumular en vegetales por contaminación de suelos contaminados y llegar a los seres vivos es el níquel, y el plomo el cual se encuentra en la corteza terrestre y entre sus propiedades destacan que es un metal blando y que se ocupa en productos como cables, tuberías pinturas y pesticidas de igual modo el cadmio que tiene una vida media de 20 años y es un metal no esencial. Estos metales se absorben por vías respiratorias y digestivas y llegan a depositarse en ciertos órganos como el pulmón, riñón, hígado páncreas y tiroides además de provocar infertilidad en mamíferos, enfermedades cardiovasculares y cáncer por ello es importante crear tecnologías nuevas que sean accesibles en los procesos de remediación de aguas contaminadas (Tejada *et al.*, 2015)

Por otro lado, la contaminación de aguas por la industria textil se puede llevar a cabo por sustancias recalcitrantes que imposibilitan la fotosíntesis e incrementan la demanda química de oxígeno y la demanda biológica de oxígeno además de contener elevadas concentraciones de sólidos suspendidos (Sánchez y Uribe, 2018). Llyas *et al* (2012) citan que durante el proceso de teñido de telas el 50% de colorante sintético diseñados especialmente para resistir tanto la degradación microbiana como la decoloración por luz o sustancias químicas son difíciles de degradar y estos se pierden en los efluentes acuáticos por ello los tratamientos que se ocupan para

descontaminar aguas residuales resultan poco eficientes además de ser costosos y requerir mucho tiempo. Por todo esto es necesario investigar métodos alternativos con la finalidad de tratar estas aguas residuales como la micorremediación, mediante el uso de hongos de podredumbre blanca que secretan enzimas no específicas y que se ha comprobado que actúan en la biodegradación de lignina y en la remoción de colorantes (Cortázar *et al.*,2012).

La biorremediación (bio= vida, remediación= arreglo o remediación) es un proceso de degradación de contaminantes utilizando organismos vivos (bacterias, hongos y plantas) y/o sus derivados metabólicos, la biorremediación es muy utilizada en ecosistemas terrestres y acuáticos al mineralizar a los compuestos es decir transformarlos en compuestos menos tóxicos, ya sea de forma parcial o bien alterando su estado REDOX de los metales. Cuando se usan bacterias recibe el nombre de biorremediación, cuando se usan hongos recibe el nombre de micorremediación y cuando se usan plantas recibe el nombre de fitorremediación (Covarrubias, 2015).

Los hongos de podredumbre blanca tienen la capacidad de degradar lignina, este es un polímero compuesto por anillos aromáticos (fenólicos), y estos hongos se han venido estudiado a partir de los años ochenta. Se ha demostrado que los hongos degradan contaminantes orgánicos persistentes (COP) haciendo uso de sus enzimas extracelulares y que también un proceso de biosorción actúan como un intercambiador al remover metales en solución tal como lo indicaron Morales-Fonseca *et al.* (2010) al explicar que tienen un mecanismo enzimático que no presenta una especificidad alta, por ello pueden actuar sobre diferentes sustratos fenólicos y azoicos. En particular el proceso de biosorción se lleva a cabo por la composición de su pared celular y a la afinidad de los compuestos que se encuentran en esta con los colorantes diluidos.

Dentro de la familia de los hongos de podredumbre blanca se encuentra el *Pleurotus ostreatus* que tiene un complejo enzimático dentro del cual se localiza la enzima lacasa (Camacho,

2017). Las lacasas son glucoproteína que cataliza la oxidación de sustratos tanto orgánicos como inorgánicos interviniendo en la reducción del oxígeno a agua, estas enzimas intervienen en los procesos biotecnológicos para el tratamiento de aguas contaminadas ya que tienen la propiedad de degradar colorantes (Hoegger *et al.*, 2007).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A nivel mundial se tiene la problemática de contaminación de las aguas residuales por metales y colorantes azoicos a causa de que dichos compuestos tienen la propiedad de ser no biodegradables y permanecer en el ambiente perennemente o degradarse paulatinamente perjudicando gravemente el medio ambiente y la salud humana. Es decir, los colorantes que provienen de las aguas residuales de diferentes industrias textiles, tienen la particularidad de estabilizarse y permanecer en el ambiente largo tiempo además de generar variaciones de pH, DQO, DBO, salinidad y sobre todo color, estas características provocan efectos dañinos a la salud debido a que son tóxicos y mutagénicos. Entre los colorantes azoicos se encuentra el blue 19 el cual es ocupado en la tinción de la mezclilla y tiene una existencia de 46 años (Siddique *et al.*, 2011). Se ha demostrado que, al usar métodos biotecnológicos, en las aguas contaminadas por colorantes se ha logrado la eliminación de estos, no obstante, los tratamientos son costosos y presentan limitaciones ya que generan subproductos que son difíciles de degradar, ejemplos de estos tratamientos tenemos: filtración, oxidación química, floculación, electrolisis, entre otros (López y Crespi., 2015).

Basados en las propuestas de Marín (2015) y Lorenzini (2013), en el presente trabajo se propuso generar en primera instancia una metodología propia, económica y accesible en laboratorio, que permita incrementar en el hongo de pudrición blanca específicamente del género

Pleurotus, la generación de la enzima lacasa, para degradar colorantes residuales azoicos generados por la industria textil.

Conjuntamente se planteó desarrollar en laboratorio un biofiltro que retenga metales contenidos en aguas residuales, utilizando la matriz residual, sustrato residual o sustrato gastado del hongo (SMS spent mushroom substrate) generado durante el cultivo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*.

3. DEFINICIÓN DE CONCEPTOS

3.1. Biorremediación

“La biorremediación se define como el empleo de organismos vivos, como microorganismos y plantas con el objetivo de reducir o eliminar, degradar y transformar contaminantes tanto en ecosistemas terrestres y acuáticos”. (Kumar, Shahi y Singh, 2018; De Lorenzo, 2018). La biorremediación se clasifica por el agente utilizado en fitorremediación (álamos, arábidopsis, girasoles, pastos, sauces entre otras), lombricultivo y compostaje (lombrices de tierra), ficorremediación (microalgas), biorremediación bacteriana (bacterias), biorremediación enzimática (Enzimas hidrolíticas) y micorremediación (setas, levaduras y mohos de diferente especie).

3.2. Fitorremediación

La fitorremediación utiliza las características naturales de las plantas de absorber, acumular y tolerar concentraciones altas de contaminantes como los metales pesados, así como compuestos orgánicos además de su capacidad de crecer en suelos contaminados, dicho tratamiento ayuda a asimilar, inmovilizar o extraer los contaminantes o degradarlos, existen diferentes métodos dependiendo del proceso involucrado: fitoextracción, rizofiltración, fitoestabilización,

fitoestimulación, fitovolatilización, fitodegradación (López *et al.*, 2004; Covarrubias y Cabriaes, 2017)

3.3. Biorremediación bacteriana

Es el uso de bacterias *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Lysinibacillus* estos pueden ser inoculados en el sitio contaminado (proceso de inoculación), para ello se administran nutrientes para acelerar el proceso o bien ya pueden encontrarse en el sitio. Se ha demostrado que existen bacterias y hongos que degradan petróleo y sus derivados, además de benceno, tolueno, acetona, pesticidas, éteres, alcoholes, así como arsénico, selenio y ciertos metales pesados. Estas bacterias tienen la capacidad de aislarlos para posteriormente eliminarlos (Zhang *et al.*, 2010).

3.4. Biorremediación enzimática

La biorremediación o degradación enzimática radica en utilizar enzimas con el fin de degradar sustancias nocivas o dañinas al medio ambiente y a la salud, estas enzimas son producidas por bacterias modificadas genéticamente, este método es costoso por su fabricación (Ramírez y Cocha, 2003).

3.5. Micorremediación

En la micorremediación se utiliza la capacidad de los hongos de descomponer la materia orgánica y por ello se utilizan para descontaminar de una manera económica y efectiva con el uso de sus micelios (Statment, 1983).

Los hongos tienen la capacidad de degradar la lignina, la cual es parte de la pared celular de las plantas, así como la celulosa y la hemicelulosa, pectina, proteínas, cutina, suberina y sales minerales. La lignina es un biopolímero que refuerza y proporciona rigidez a los tejidos vegetales y constituye una barrera física contra fitopatógenos (Chávez y Domine, 2013).

3.6. Hongos ligninolíticos

Son hongos de podredumbre blanca, pertenecen al grupo de los Basidiomicetos producen basidiosporas en un basidio, su reproducción es asexual y sexual (Silva *et al.*, 2010), estos degradan la lignina y la mineralizan a bióxido de carbono y agua, producen diferentes productos naturales como las enzimas lignina peroxidasa, la manganeso peroxidasa y la lacasa las cuales tienen un peso molecular (600 y 1000 KDa), crecen en sustratos lignocelulósicos como la madera y residuos agrícolas, tienen un sistema ligninolítico oxidativo extracelular que degrada la lignina (Figura 1), esta propiedad hace que mineralicen contaminantes orgánicos similares a la estructura de la lignina (Sánchez y Royce, 2001). (V, s.f.) (V, s.f.)

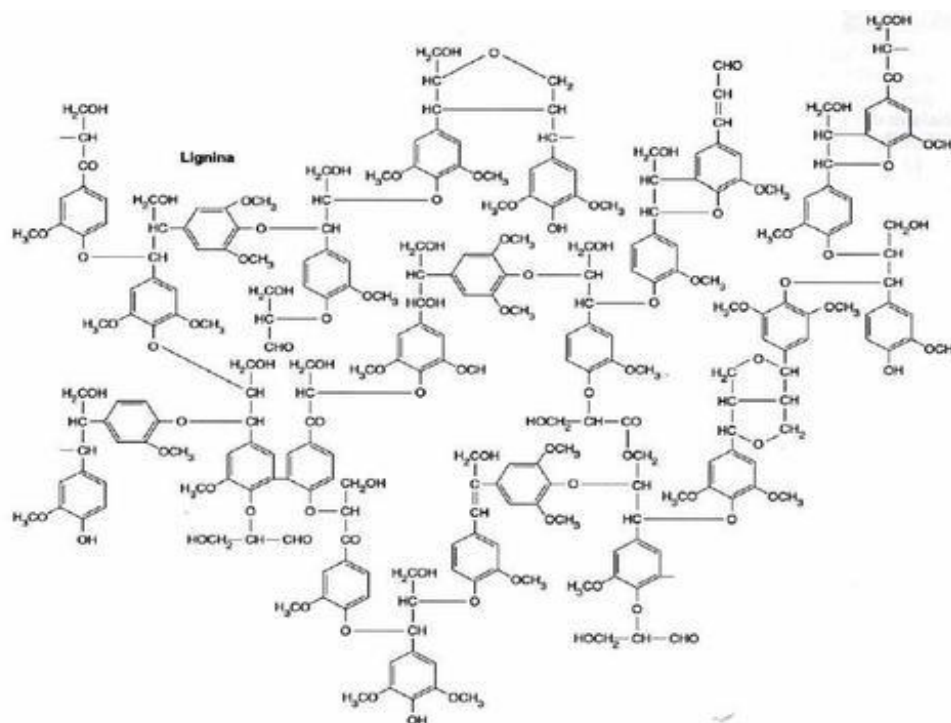


Figura 1. Modelo Estructural de la Lignina (Lu & John, 2010)

3.7. Lacasas

Las lacasa son glucoproteínas, enzimas extracelulares producidas por hongos ascomicetos, basidiomicetos, y deuteromicetos además de encontrarse en plantas, bacterias e insectos. El primer reporte de extracción de la lacasa se realizó de un árbol del Japón llamado *Rhus vernicifera* (árbol de la laca). Su clasificación según la comisión de enzimas de la unión internacional de bioquímica es **E.C. 1.10.3.2** por ello pertenece al grupo de las óxido-reductasas. Son enzimas multicobre azules contienen 4 átomos de cobre en su sitio activo. Además que catalizan la oxidación de sustratos como: compuestos fenólico orto y para difenoles además de aminas aromáticas, tienen actividad fenol-oxidasa y se distingue de las otras enzimas porque en la reducción del oxígeno produce agua en lugar de peróxido de hidrogeno, su peso molecular oscila entre 60 y 80 KDa, son termoestables, su intervalo óptimo de temperatura es de 50-70°C su punto isoeléctrico es de 2.6-4.5, su actividad se presenta en un pH de 2.0-8.5, las enzimas lacasas producidas por los basidiomicetos de podredumbre blanca ayudan en la degradación de la lignina y estas enzimas catalizan la oxidación de diferentes sustratos conciliando la transferencia de un electrón produciendo un electrón libre por ello resulta un radical libre que llega a reaccionar con el mismo sustrato o con otros compuestos reduciéndose y recuperando así el electrón para su estabilidad (Rühl, 2009; Hoegger *et al.*, 2006; Hoegger *et al.*, 2007).

3.8. Sustrato residual

Los sustratos residuales del cultivo de *P. ostreatus* pueden ser paja de trigo, paja de cebada o restos de maíz, así como residuos del tipo forestales como madera o aserrines. Todos estos sustratos están compuestos por una matriz orgánica la cual está combinada por materiales lignocelulósicos y estos se encuentran relativamente degradados por los hongos y pueden contener exoenzimas fúngicas, proteínas, celulosa entre otras sustancias (Martínez- Carrera, 2007).

Manterola *et al.*, (1999) reportaron que los residuos de cereales contienen entre 30-40% de celulosa, hemicelulosa entre 24-29% y de lignina 10-20%.

Cañizares (2000) y Morales- Fonseca (2010) reportaron que la matriz residual puede ser usada como parte de filtros para retener los metales provenientes de aguas residuales. Al mismo tiempo se ha reportado que la comercialización de hongos comestibles se ha incrementado a nivel mundial genera aproximadamente 500 000 toneladas anuales de sustratos residuales, los cuales contienen cantidades elevadas de biomasa viva o muerta (Kapahi *et al.*, 2017).

Dichos sustratos provienen de diferentes residuos agrícolas, pero también provienen de residuos industriales como por ejemplo bagazos de caña de azúcar, o bien cascarillas de cereales, todos con un alto contenido de materiales lignocelulósicos, el empleo que se les da a estos residuos es por lo regular como abono orgánico al cual le pueden adicionar nutrientes para incrementar su calidad, sin embargo, el resto de estos sustratos no se utilizan (Martínez-Carrera, 2000; Kapahi *et al.*, 2017).

Servicios de Información Agroalimentaria y pesquería SIAP. (2017) reportaron que se producen en México 27 955 407 toneladas por año de residuos agropecuarios y de ellos 864 144 toneladas son residuos agrícolas además que Veracruz, Chiapas, Oaxaca y Puebla aportan el 25% de los residuos del país.

Martínez *et al.* (2007) reportaron que hoy en día la producción de hongos comestibles tiene una gran importancia social y económica en el país. Por lo tanto, al incrementarse la producción se incrementa el sustrato residual que es una materia prometedora como recurso natural y renovable.

3.9. Metales pesados y salud

Los metales han existido desde el inicio de nuestra creación, intensificando su uso y convirtiéndose en una herramienta necesaria para el hombre, sobre todo en la revolución industrial. Pero esto ha generado contaminación sobre todo de los llamados metales pesados. Los daños que ocasionan dichos metales van desde una leve intoxicación o afección en órganos vitales hasta daños más severos como el cáncer, por el contrario, se conoce que algunos de estos metales se encuentran como elementos trazas en nuestro organismo y son necesarios para llevar a cabo ciertas reacciones metabólicas vitales (Reyes *et al.*, 2016).

La contaminación ya sea por medios antropogénicos o naturales de los recursos hídricos y suelo por estos metales pesados involucra la seguridad alimentaria y por lo tanto la salud pública por su elevada toxicidad y por bioacumularse y esto depende del tipo de metal. (Huang *et al.*, 2014)

Se han reportado contaminación por cadmio, níquel, zinc en hortalizas, papa, calabaza, brócoli, también en peces, ostras, mariscos, por plomo, cadmio, zinc, níquel, cromo, mercurio (Singh *et al.*, 2010).

Reyes *et al.* (2016) reportan que es necesario realizar mayores estudios sobre el contenido de metales en alimentos para evitar daños en la salud y el ambiente como los reportados en Japón y México por contaminación de alimentos por metales pesados provenientes de zonas mineras, o de actividades industriales ya que incorporan dicho metal a la cadena alimentaria y al agua como fue el caso donde se presentó daños en el sistema óseo provocada por cadmio (Japón) y en México en el estado de Coahuila donde hubo envenenamiento por plomo.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido límites permisibles máximos de metales pesados en aguas residuales y sobre todo para uso de dicha agua en riego, así como

también la FAO y la Unión europea ha establecido límites permisibles de metales en alimentos variando de acuerdo al tipo de alimento. Actualmente la distribución, movilidad, disponibilidad y toxicidad de los elementos químicos depende principalmente de la forma en que se encuentren en el agua y el suelo y no tanto de la concentración (Caruso y Montes, 2003).

3.10. Metales pesados definición

Los metales pesados han tenido varias definiciones pero no han resultado muy específicas, una de ellas menciona que los metales pesados son aquellos que se encuentran en la tabla periódica de los elementos y su número atómico es mayor a 20 así como su peso sea mayor a 5 g/cm³ sin incluir a los metales alcalinos y a los alcalinotérreos (Breckle, 1991). Otra definición propuesta por Tiller (1989) indica que un metal pesado en términos generales se refiere a aquellos metales que son clasificados como contaminantes ambientales. Otra descripción es en cuanto a sus concentraciones de elementos presentes no detectables que van en un rango de 100 a 0.01 mg/Kg a estos se les llama elementos traza y estos son requeridos en el organismo para cumplir funciones importantes. También es conocida otra definición en cuanto a su concentración presente en la biosfera macroelementos y microelementos. En general los metales pesados son importantes en el mundo en general, pero también han resultado ser grandes contaminantes de los recursos naturales.

3.11 Los colorantes

Los colorantes naturales son extraídos como su nombre lo indica de la naturaleza y existen en menor proporción que los colorantes sintéticos y estos son polímeros que están constituidos por grupos funcionales y estructuras químicas orgánicas complejas del tipo aromático que afectan al ser humano, así como a sus ecosistemas (Han *et al.*, 2009)

Los colorantes sintéticos tienen diferentes propiedades como las siguientes: alta solidez en medios húmedos, bajos costos, generan tonos brillantes, excelente solubilidad, resistencia a la luz solar, resistente al ataque de compuestos químicos (Barrios *et al.*, 2015).

Garzón y Barragan. (2009) reportan que los colorantes son sustancias que al ser aplicadas a un sustrato dan color y son retenidos por diferentes mecanismos como son la absorción, retención mecánica, o también por enlaces del tipo iónico o covalente y que estos colorantes al colocarse en una fibra textil tienen la particularidad de no verse afectados por factores como la luz, el agua y los jabones y que estos son usados en la industria textil, alimentaria, de papel y en el curtido de pieles.

Los colorantes están constituidos por un grupo cromóforo que como lo indica las raíces de su nombre es el portador del color y un grupo auxocromo que le da intensidad al color. El Color Index clasifica a los colorantes por sus propiedades químicas en: Azo, nitroso, nitro, azoico, tiazol, antraquinona, ftalocianina entre otros. El diccionario de química de la universidad de Oxford dice que los colorantes se clasifican de acuerdo a sus propiedades físico-químicas de sus grupos funcionales y de la forma en que se apliquen en:

a). Ácidos cuya característica radica en que son muy solubles en agua, son utilizados para teñir fibras proteicas como la lana y la seda o poliamidas y fibras sintéticas, así como en la industria de alimentos, imprenta, cuero, madera y nylon.

b). Básicos solubles en agua, utilizados para teñir fibras acrílicas, poliéster modificado, y en medicamentos

c). Dispersos, estos son insolubles y se usan para teñir acetato de celulosa, fibras sintéticas como poliéster y fibras de acrílico

d) Reactivos, son aquellos que reaccionan con el sustrato formando enlaces covalentes, se usa en el teñido de fibras de celulosa y algodón

e) Baño son sustancias insolubles, se usa en el teñido de algodón y fibras de celulosa.

Saratale *et al.* (2011) Mencionaron que los colorantes más utilizados en la industria son los colorantes sintéticos llamados AZO (Figura 2) que contienen el grupo funcional azo (...N=N...) que representan el 70% de los colorantes encontrados en las aguas municipales y que esa propiedad que tiene de poseer el grupo AZO hace que sea sustituido por una variedad de estructuras orgánicas e inorgánicas que le otorgan propiedades químicas específicas a cada molécula así mismo existen 3000 variedades de estos colorantes.

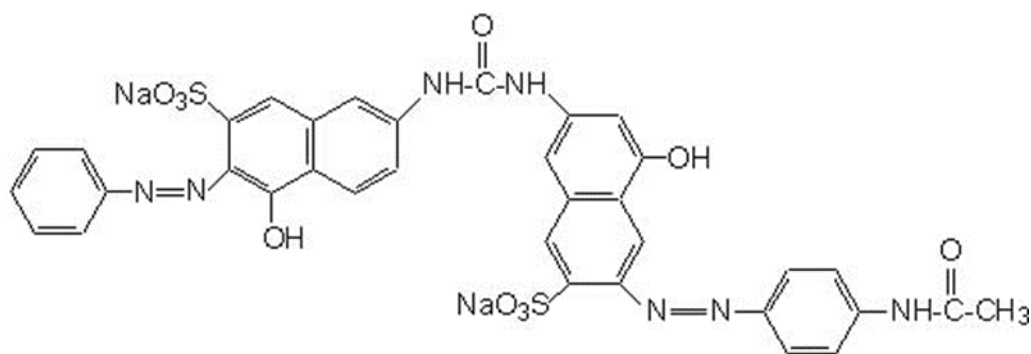


Figura 2. Estructura de un Colorante Azoico. (McMurry, 2004)

Existen diferentes procesos de tratamiento para la remoción de colorantes y pigmentos (adsorción, filtración, oxidación y biológicos), pero, así como tienen muchas ventajas también existen desventajas como sus altos costos y producción de nuevos residuos como un alto volumen de lodos. Entre los tratamientos utilizados para la remoción de colorantes y pigmentos se encuentran los sistemas de oxidación y mineralización como la reacción de fenton la cual es

perfecta para la decoloración de efluentes de colorantes y pigmentos, la ozonación la cual es aplicada en estado gaseoso, la electrocoagulación, oxidación por hipoclorito de sodio, y como tratamientos físicos como el tratamiento con carbón activado, membrana de filtración entre otros. (Robinson *et al.*, 2001; Barrios *et al.*, 2015).

3.12 Biofiltro.

Los filtros biológicos o biofiltros surgieron a partir de 1950, como opción de tratamiento de aguas residuales, son también llamados reactores de lecho fijo y son utilizados en la reducción de materia orgánica disuelta con la ayuda de microorganismos que se encuentran sobre la superficie de material de soporte, proporcionan libertad de diseño, construcción y operación pueden ser aplicadas al tratamiento de aguas residuales concentradas o diluidas, el material de soporte que se deposita en los biofiltros está conformado por sólidos de alta porosidad la principal finalidad del material de soporte es permitir la acumulación de grandes cantidades de biomasa con un consecuente aumento de tiempos de retención y actuar como una barrera física. (Galindo *et al.*, 2016).

Cañizares (2000) reportó el uso de biofiltro con biomasa microbiana para la retención de metales provenientes de efluentes industriales teniendo resultados favorables. Así mismo Galindo *et al* (2016) construyeron un filtro biológico en acrílico transparente con un volumen de 530 L repartido en 5 cámaras divididas y su material de soporte fue de conchas. Las cuales fueron ocupadas como material de soporte filtrante logrando depurar las aguas residuales municipales por su alta porosidad, su estructura calcárea y composición.

4. PREGUNTAS GENERALES DE INVESTIGACIÓN

- ❖ ¿Cómo utilizar la matriz residual (sustrato residual) del cultivo del hongo *Pleurotus ostreatus* para la biorremediación de aguas contaminadas con metales?
- ❖ ¿Cómo hacer propicia la degradación del colorante azoico utilizando el efecto enzimático del hongo de pudrición blanca?

5. PREGUNTAS PARTICULARES

Para metales:

1. ¿El hongo *Pleurotus ostreatus* podrá tolerar diferentes concentraciones metálicas en su crecimiento en medio sólido?
2. ¿Cuál es el efecto de la concentración metálica en la morfología o estructuras miceliales de la cepa de *P. ostreatus*?
3. ¿Cuál es la cinética de adsorción de la cepa de *P. ostreatus* en medios líquidos de plomo, cromo y cadmio respectivamente a una concentración de 20 mg/L?
4. ¿Qué eficiencia presentara un biofiltro construido con el sustrato residual del cultivo de *Pleurotus ostreatus*?
5. ¿Cuál es la cinética de retención o adsorción de las concentraciones metálicas en dicho biofiltro?

Para colorantes:

6. ¿Cuál será la cinética de producción de la enzima lacasa de la cepa de *P. ostreatus* en medio líquido?

7. ¿Cuál es la cinética de decoloración del colorante rojo 23 por el efecto enzimático?

6. OBJETIVOS GENERALES

❖ Diseñar una metodología para demostrar la eficiencia del uso de la matriz residual del cultivo del hongo *Pleurotus ostreatus* para la adsorción de metales contenido en aguas residuales

❖ Elaborar una propuesta metodológica, que propicie la degradación de colorantes azoicos utilizando el efecto enzimático de hongos de pudrición blanca específicamente *Pleurotus ostreatus*

7. OBJETIVOS PARTICULARES

Para la biosorción de metales:

1. Valorar las concentraciones metálicas inhibitorias de crecimiento miceliar de la cepa de *Pleurotus ostreatus*.

2. Evaluar el efecto de la concentración metálica en su morfología.

3. Evaluar la cinética de adsorción de la cepa de *Pleurotus ostreatus* en medio líquido a una concentración metálica.

4. Diseñar y valorar la retención metálica en el biofiltro con el material residual del cultivo de *Pleurotus ostreatus*

5. Calcular la cinética de retención de las concentraciones metálicas con el biofiltro propuesto.

Para la degradación enzimática de colorantes:

6. Determinar la cinética de producción de la enzima lacasa en la cepa de *P. ostreatus* en medio líquido.
7. Determinar la cinética de decoloración del colorante rojo 23 por el efecto enzimático.

8. JUSTIFICACIÓN

El agua residual se ha convertido en un recurso hídrico necesario para la agricultura en toda Latinoamérica y en México, se utiliza en una gran cantidad de hectáreas sin un tratamiento previo lo cual afecta la calidad de vida de la población, dañando su salud y degradando el ambiente (De la Peña *et al.*, 2013).

8.1. Justificación Teórica

La contaminación que sufren nuestros efluentes por metales y colorantes azoicos ha traído gran preocupación mundial y local ya que no solo se trata de una vista estética, sino que conlleva a daños severos en la salud por la cantidad de sustancia tóxicas causantes de diferentes tipos de enfermedades por ello se tiene que recurrir a tratamientos alternativos que no suplan los ya existentes sino como complementos de estos tratamientos una de estas opciones son los métodos biológicos para la descontaminación de aguas provenientes de las industrias textil, del papel, zonas mineras.

Una alternativa biotecnológica es la del uso de hongos del género *Pleurotus ostreatus* de pudrición blanca que tiene la capacidad de crecer en sustratos económicos como los residuos agrícolas, más aún tener un complejo enzimático extracelular como las oxidoreductasas que le da la capacidad de degradar polímeros como la lignina y celulosa, así como contaminantes ambientales por lo que le proporciona una gran alternativa biotecnológica como la decoloración de efluentes industriales. Las enzimas lacasas de baja especificidad reducen el oxígeno molecular

a agua, además tienen la aptitud de oxidar los compuestos fenólicos (monofenoles, difenoles, polifenoles, aminofenoles) y diaminas así mismo los vinculados con la lignina (Manjarrés *et al.*, 2010). Otro aspecto importante que tienen los hongos es que su pared celular está constituida fundamentalmente por glucanos β 1-3 y β 1-6, mananos y quitina, también tienen una gran capacidad de adsorción de metales gracias a los grupos carboxílicos, amino, tiol, fosfatos e hidróxido existentes en su pared celular. Se debe agregar que brinda una barrera primaria contra dichos metales (Baldrian, 2003; Cañizares, 2000; Bánfalvi, 2011) resultando un material prometedor en la biosorción de metales pesados presentes en aguas contaminadas incluso sin necesidad de someter al *Pleurotus ostreatus* a condiciones de estrés, sino que puede utilizarse la biomasa muerta.

8.2. Justificación metodológica

Por todo esto se considera a los hongos de la pudrición blanca del género *Pleurotus* un método eficaz de biorremediación de sustancias recalcitrantes aunque como lo indica la literatura a nivel comercial son más utilizados los métodos de biorremediación con bacterias (Bou *et al.*, 2018) sin embargo los hongos tienen la capacidad de oxidar una mayor variedad de compuestos como es el caso de hidrocarburos aromáticos policíclicos de un alto peso molecular con la ayuda de sus enzimas modificadoras de lignina sin obtener una ganancia total de energía (Domínguez *et al.*, 2011).

8.3. Justificación ambiental

La Comisión Nacional del Agua (2018) expone que existen grandes problemas de abastecimiento de agua a nivel mundial a pesar de que el planeta está constituido por más del 75% del vital líquido solo el 3% se puede consumir esta agua también llamada dulce esta almacenada

en los casquetes polares en un 75%, en aguas subterráneas en un 21% y en los lagos y los ríos en un 4%.

Por lo que se refiere a garantizar la salud pública, así como conservar nuestro ambiente es necesario que las aguas residuales que se reutilizan deben ser tratadas por medio de un método biológico adecuado. En particular el caso de contaminación del río Atoyac Alseseca que recibe las descargas de aguas residuales industriales como municipales sin un tratamiento previo, así como desechos sólidos afectando el equilibrio ecológico además de provocar afectaciones a la salud de las poblaciones que viven cerca de dicho río por otro lado existe afectación ya que el agua potable no se distribuye equitativamente (Rivera, 2011; SEMARNAT-CONAGUA, 2018).

Así por ejemplo Sánchez y Uribe (2018) refieren que la industria textil es la segunda industria más contaminante del medio ambiente ya que tiene altos consumos de agua y altas descargas de contaminantes para ilustrar mejor este hecho, en el proceso de tinción de la fibra del algodón se ocupan de 30 a 150 L/Kg de material textil, por lo que un par de pantalones “jeans” requiere un mínimo de 42 litros en su proceso de teñido.

9. MARCO TEÓRICO

9.1. El reino fungí

Los organismos pertenecientes al reino Fungí, son eucariotas y pueden ser microscópicos y macroscópicos. Estos organismos tienen una distribución muy amplia en la naturaleza y se pueden localizar en el suelo, agua, aire y sobre superficies. Entre sus características principales destacan que poseen núcleos organizados, citoplasma, se reproducen de forma sexual y asexual no sintetizan clorofila y no almacenan almidón como sustancia de reserva. Los hongos están clasificados como heterótrofos y pueden actuar como saprofitos y/o parásitos. Su nutrición la llevan a cabo por el proceso de absorción de nutrientes y esta depende de la producción de enzimas

cuyo propósito es degradar los substratos creando micro partículas internadas por proceso de transporte activo y pasivo. Entre su demanda nutricional está el nitrógeno que lo encuentra en (sales de amonio, aminoácidos), el carbono (glucosa, celulosa), azufre (sulfatos) y el fosforo (fosfato de potasio) así como elementos esenciales son requeridos como el manganeso y el cobre. Otro rasgo de los hongos es su pared celular que está compuesta por quitina y β - glucanas, sus componentes principales son hexosas y hexoaminas, que forman las mananas, glucanas y galactomananas (Godoy, 2019).

Hibbett *et al.* (2007) mencionan una clasificación taxonómica donde clasifican a los hongos en el Reino Fungi con un subreino *Dicarya* (aquí aparecen las divisiones *Ascomycota* y *Basidiomycota*) y siete divisiones (*phyla*); de donde derivan 35 clases, 12 subclases y 129 órdenes.

Además, existen hongos que tienen la propiedad de degradar los polímeros de la madera inclusive los componentes de la lignina con ayuda de sus enzimas extracelulares esta particularidad induce tres tipos de degradación del sustrato podredumbre blanda, podredumbre parda y podredumbre blanca (Carbajo, 2015). Los hongos que se encuentran en la naturaleza sobre todo en bosques de pino y encino son los de podredumbre blanca y son *Basidiomycetes*. Los basidiomicetos tienen estructuras reproductivas llamadas basidios pertenecientes a la clase *Hymenomyces* así por ejemplo tenemos a *Trametes versicolor*, *Phanaerochaete chrysosporium*, *Pleurotus pulmonarius*, y *Pleurotus ostreatus*. Todavía cabe señalar que el Género *Pleurotus* de la especie *ostreatus* pertenece a la familia *Corticaceae* (Montoya *et al.*, 2010; Lutzoni y Miadlikowske, 2009).

9.2. Micorremediación

La micorremediación es la capacidad metabólica que tienen los hongos de transformar o eliminar los contaminantes orgánicos e inorgánicos a compuestos menos tóxicos, así tenemos a los

hongos de podredumbre blanca (Figura 3) que son *Basidiomycetes* pertenecientes a la clase *Hymenomycetes* comunes en bosque de pino y encino ejemplo de ellos tenemos a *Lentinus hirtus*, *Irpex lacteus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Bjerkardera adusta*, *Trametes versicolor* y *Pleurotus ostreatus* entre otros que ofrecen una herramienta multifuncional en los procesos de detoxificación gracias a sus propiedades como: hipertolerancia y acumulación de metales en su pared celular, presencia de diferentes sistemas enzimáticos para la degradación de compuestos xenobióticos y su activo crecimiento (Martínez *et al.*, 2005), tienen la característica de degradar la lignina cuya estructura química es un polímero con gran cantidad de anillos aromáticos (Martínez *et al.*, 2009; Manavalan *et al.*, 2015), esta propiedad de disminuir materiales lignocelulósicos se debe a su sistema enzimático ya que dichos hongos tienen dos tipos de vías enzimáticas extracelulares como describe Sánchez, (2009) el sistema hidrolítico, el cual produce hidrolasa estas degradan polisacáridos y un sistema lignolítico oxidativo extracelular que degrada la lignina y abre los anillos de fenilo. En cuanto a su complejo enzimático está constituido por lignina per-oxidasa (E.C. 1.11.1.14) (LiP) proteínas extracelulares, hemo glicosiladas catalizan la oxidación dependiente de peróxido; manganeso per-oxidasa (E.C. 1.11.1.13) (MnP) son hemoproteínas catalizan la oxidación dependiente de peróxido y la lacasa (benceno-diol oxígeno oxido-reductasa, E.C. 1.10.3.2), contienen cobre en su sitio activo, catalizan la reducción de cuatro electrones y no generan peróxido, se debe agregar que estos 3 tipos de enzimas son oxidativas no específicas (Jurado *et al.*, 2016).



Figura 3. Hongo de la Podredumbre Blanca *P. ostreatus* (Marín, 2015)

9.3. Contaminación del agua

La contaminación del agua es el exceso de materia o energía (calor) que desencadena daño a los seres vivos y que afecta las actividades que se desarrollan dentro del agua (Figura 4). El hablar de contaminación de las aguas residuales (producto de la actividad humana) es un tema de interés ya que este se ha convertido en un recurso hídrico para la agricultura debido al crecimiento demográfico y al aumento de la urbanización pero que afecta directamente a la salud, así como al ambiente además de que en. “América Latina el 70% de las aguas residuales no son tratadas y estas son extraídas, usadas y devueltas contaminadas a los ríos” como lo indica la autora Yee-Batista (2013) de igual modo México no es la excepción como lo reporta CONAGUA (2015) que “México posee la mayor superficie agrícola regada con aguas residuales sin tratar en el mundo 90 000 hectáreas en un solo sistema de riego”.

Las aguas residuales ayudan a la agricultura por su alto contenido de nutrientes disminuyendo así el uso de fertilizantes, pero sin embargo en forma excesiva afecta la calidad de los cultivos, del suelo y de la salud por la acumulación de sustancias de alta toxicidad en el suelo, plantas, animales además de su ingreso en la cadena alimentaria. A pesar de la instalación de plantas de tratamiento de aguas residuales en América Latina y México estas no han sido suficientes para los campos y lo que grandes urbes requieren (Bouchez, 2016).

Hay que mencionar además que las composiciones de las aguas residuales provenientes de las industrias textil, papelera, curtiembre, farmacéutica entre otras impiden los procesos de fotosíntesis que elaboran los microorganismos involucrados, estas sustancias son colorantes, surfactantes, sales inorgánicas además de distintos compuestos químicos como fenoles, sulfuros, cromo entre otros más aun requieren una gran cantidad de agua en sus procesos productivos que van de 100 a 200 L de agua para producir 1 Kilogramo de producto textil (Garay y Gómez, 2016; Gilpavas et al., 2018).

Como lo refiere Vilanova y Pedret (2017) “Disponer de agua de calidad es esencial para la salud humana, protección del medio ambiente y el desarrollo económico”. Para evaluar la contaminación de aguas residuales se usan los siguientes parámetros: Contenido de materia orgánica (Demanda Química de Oxígeno DQO y Demanda Biológica de Oxígeno DBO), sólidos en suspensión, nitrógeno y fosforo total (Vilanova y Pedret, 2017).



Figura 4. *Contaminación del Agua Industrial textil (Marín, 2015)*

9.4. Metales pesados

Los metales pesados son aquellos que tienen una densidad mayor o igual a 5 g/cm^3 o como los define Tiller (1989) metal pesado es todo aquel metal clasificado como contaminante ambiental, ejemplo de ellos tenemos plomo, cobre, cadmio, níquel entre otros (Figura 5). Aunque también son considerados esenciales en el metabolismo celular como el Na, K, Mg, Ca, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn y Mo, pero en cantidades llamadas “traza”. Se debe agregar que los metales pesados se pueden descubrir en su estado elemental o enlazados en complejos con sales. Conforme a lo escrito por Cañizares (2000). La contaminación por metales pesados se manifiesta a partir del progreso en la ciencia y la tecnología específicamente por la industria (minera, del cemento, colorantes, curtiduría, galvanoplastia, producción de acero, material fotográfico, pinturas

corrosivas, producción de energía, fabricación de textiles, conservación de la madera, anodizado de aluminio, refrigeración de agua entre otros), y por ciertas actividades antropogénicas como la agricultura. La eliminación de residuos coopera a la contaminación de la atmósfera, ambientes fluviales y terrestres. A causa de su movilidad y a su toxicidad se han convertido los metales pesados en contaminantes inorgánicos importantes, tiene la propiedad de no ser biodegradables, ser bioacumulables llevan el proceso de biomagnificación, persistir indefinidamente, ingresar a la cadena trófica y desnaturalización de proteínas. En particular al cambiar las propiedades físicas, químicas y biológicas y encontrarse en proporciones elevadas inducen a la turbidez, viscosidad, incremento de DBO, Y DQB, cambios de pH en los cuerpos de agua. Es por esto que son considerados nocivos a la salud humana, flora y fauna ocasionando daños al humano como erupciones cutáneas, úlceras gástricas, problemas respiratorios, afección en los riñones e hígado, alteraciones neurológicas, cáncer e incluso la muerte, en el caso de las plantas necrosis en sus hojas, inhibición de crecimiento de raíces hasta la muerte de las plantas (Tejada *et al.*, 2015; Lara, 2008). Así mismo entre los mecanismos moleculares que describen la toxicidad de los metales pesados se encuentran: el desplazamiento de iones metálicos esenciales de biomoléculas y bloqueo de sus grupos funcionales; la modificación y ruptura de biomoléculas; modificación de otros agentes activos (Cañizares, 2000). En consecuencia, la OMS estableció límites máximos permisibles de iones de metales pesados en el agua y su concentración máxima debe estar en un rango no máximo de 0.01 a 1 ppm (Tejada *et al.*, 2015).

Tabla 1*Industrias que Generan Metales Pesados*

INDUSTRIA	Sustancias y Metales Pesados Encontrados
Acumuladores y baterías	Plomo, cromo, níquel, cadmio y arsénico
Refinerías	Aceite, diésel, plomo
Curtidos	Disolventes, arsénico, cromo, cobre, cadmio, zinc, estaño
Galvanizados	Disolventes, cromo, cobre, cadmio, zinc, arsénico, plomo y cianuro
Gasolineras	Aceite, diésel, disolventes clorados
Textiles	Cromo, cadmio, níquel, disolventes clorados
Fundiciones	Cadmio, cobre, cromo, níquel, plomo, zinc, molibdeno

Fuente: (Montreal *et al.*, 2006).



Figura 5. Algunos metales Fuente: (recuperado de <https://www.ecured.cu>)

9.5. Colorantes azoicos

Los colorantes están formados por un grupo cromóforo (grupo encargado de la absorción de la luz otorgando la propiedad de color) y un grupo auxocromo (otorga la afinidad por la fibra e intensifica el color), y un grupo solubilizador (da la afinidad a solventes diversos dados por los iones SO_3 , NH_3 , Cl entre otros (Barrios *et al.*, 2015).

Los colorantes azoicos abarcan una de las categorías más grandes de los colorantes sintéticos fundamentados en derivados de hidrocarburos se emplean considerablemente en la industria textil, representando el 80% de los colorantes producidos en el mundo, con una producción anual de 7×10^5 toneladas métricas (Das y Mishra, 2016).

Así mismo este tipo de colorantes se clasifican de acuerdo a su estructura, origen, color, solubilidad y métodos de aplicación.

En particular en base a su estructura química (grupo cromóforo) los colorantes se clasifican en: grupo azo ($-\text{N}=\text{N}-$), etileno, metino, carbonilo y nitro. Otro rasgo notable es que el tipo de colorante azo (Figura 6) tienen una gran variedad de colores. Conviene subrayar que los colorantes

sintéticos tienen ciertas características como su estructura de anillos aromáticos y grupos funcionales (Singh *et al.*, 2018; Zaharia, 2012; Hunger, 2007).

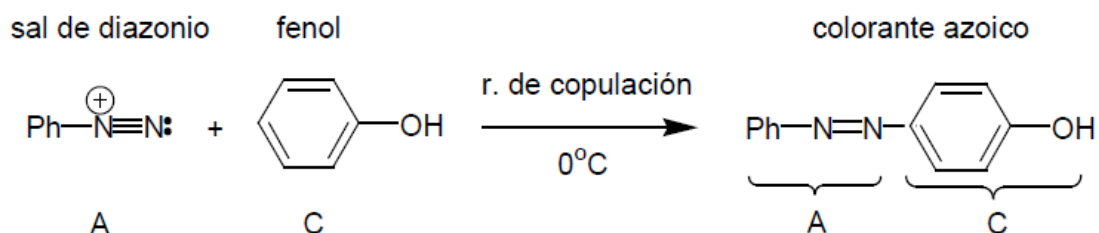


Figura 6. Estructura Molecular del Colorante Azoico. Fuente: (McMurry, 2004)

Su clasificación de acuerdo a su aplicación a la fibra en ácidos, básicos, directos, dispersos, mordientes, reactivos (Tabla 2) (Hunger, 2007).

Hay que mencionar además que los colorantes poseen color debido a que: absorben luz (espectro visible 400-700 nm), tienen por lo menos un grupo cromóforo, poseen un sistema conjugado de enlaces dobles y simples y presentan resonancia de electrones (Zhao y Hardin, 2007; Hossain, 2014).

Tabla 2*Clasificación de los Colorantes por Uso y Método de Aplicación*

Clase	Sustratos	Método de aplicación	Tipo de químico
Ácido	Nylon, lana, seda, papel, tintas y cuero	Baños ácidos a neutros	Azo, antraquinona, trifenilmetano, azina, xanteno, nitro y nitroso
Azoicos y componentes	Algodón, rayón, acetato de celulosa y poliéster	Fibra humedecida con acoplamiento y solución de diazonio y sal	Azo
Básicos	Papel, poliacrilonitrilo, nylon modificado, poliéster y tintas	Baños de tintura ácida	Cianina, hemicianina, diazahemicina, difenilmetano, triarilmetano, azo, azina y antraquinona
Directos	Algodón, rayón, papel, cuero y nylon	Baños alcalinos o neutros	Azo, ftalocianina, estilbeno y oxazina
Dispersos	Poliéster, poliamida, acetato, acrílico y plástica	Dispersiones acuosas por alta temperatura/ presión o temperaturas bajas	Azo, antraquinona, benzodifuranona
Mordantes	Lana, cuero, y anodizado aluminio	Con sales de cromo	Azo y antraquinona

Clase	Sustratos	Método de aplicación	Tipo de químico
Reactivos	Algodón, lana, seda y nylon	Sitio reactivo en colorante reacciona con grupo funcional en fibra y une covalentemente al colorante con calor y pH alcalino	Azo, antraquinona, oxazina
Solventes Entre otros.	Plásticos, gasolina, barnices, lacas, tintas, aceites y ceras	Disolución en el sustrato	Azo, trifenilmetano, antraquinona

Fuente: (Hunger, 2007)

Zaharia (2012) refiere que a nivel mundial las aguas residuales de la industria textil comprenden 10, 000 tintes diferentes (Figura 7) con una producción anual de 7, 105 toneladas y que el 90% de los productos textiles son empleados a una escala de 100 toneladas por año y que del 2 al 20% se de tintes se pierden durante el proceso de teñido y se descargan directamente a los efluentes acuáticos sus productos de degradación son tóxicos y carcinógenos para el ser humano y si no tienen un tratamiento adecuado permanecen en el ambiente largo tiempo por otra parte este tipo de industria consume grandes cantidades de agua potable.



Figura 7. *Diferentes Tipos de Colorantes Fuente: (Medellín, 2010)*

10. HIPÓTESIS

- I. La matriz residual del cultivo del hongo *Pleurotus ostreatus*, retendrá concentraciones de metales disueltos en agua residual mayores a los máximos permisibles por la norma de la Unión Europea y la mexicana NOM-CCA-031-ECOL/1993.
- II. La enzima lacasa generada por la cepa de *Pleurotus ostreatus* tendrá efecto favorable en la degradación del colorante azoico experimental.

11. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

El diseño de investigación fue experimental del tipo experimental puro ya que fue el que se adaptó a las necesidades del estudio, este trabajo se desarrolló en el Laboratorio del Departamento de Investigaciones en Ciencias Agrícolas (DICA), del Instituto de Ciencias de la BUAP (ICUAP). Donde se valoró *in vitro* la capacidad del hongo para tolerar, crecer y adsorber en presencia directa de metales pesados y esto permitió diseñar una metodología accesible y de bajo costo la cual favorecerá la selección de cepas potencialmente útiles y su

evaluación en la biorremediación de aguas contaminadas con metales pesados y colorantes azoicos.

El diseño experimental “realiza una manipulación intencional de variables (independientes), medición de variables (dependientes, control de validez con dos o más grupos de comparación” (Sampieri, 2018, pp121-136).

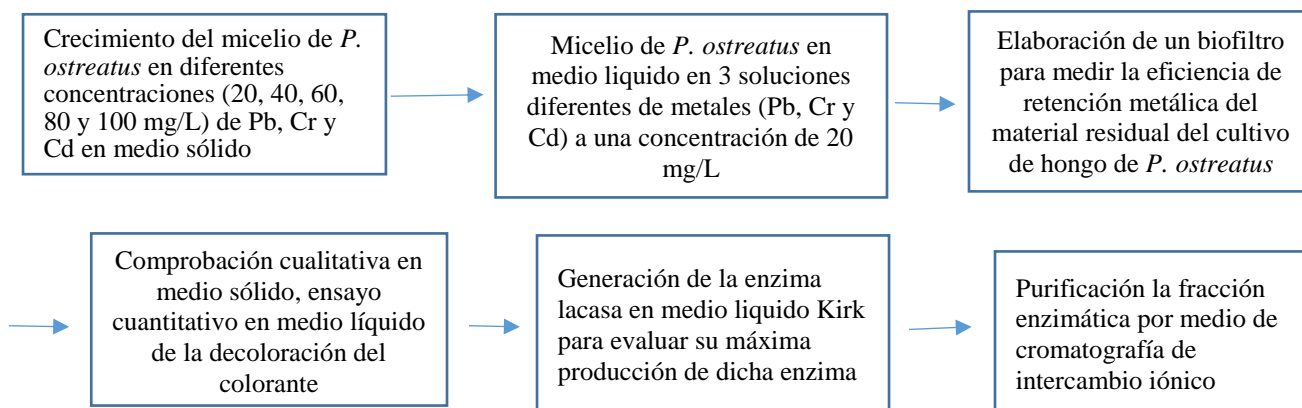
El presente trabajo se diseñó bajo el planteamiento metodológico del enfoque cuantitativo dado que se buscó comprobar la hipótesis previamente establecida, así como los objetivos trazados.

Enfoque cuantitativo “Usa la recolección de datos para probar hipótesis, con base en la medición numérica y el análisis estadístico, para establecer patrones de comportamiento y probar teorías” (Sampieri, 2018, p.4).

A continuación, se describen los procesos experimentales para cada uno de ellos.

12. MATERIALES Y MÉTODOS

Diagrama general de trabajo.



12.1. Material biológico

Cepa de *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex Fr.) P. Kumm (Fungi: Agaricomycetes: Pleurotaceae) obtenida del cepario del laboratorio de micología del Departamento de Investigación en Ciencias Agrícolas (DICA).

12.2. Reactivos

Micelio vegetativo, micelio activado y biomasa de *P. ostreatus*, medio de cultivo agar papa-dextrosa (PDA) BD Bioxon®, soluciones estándar de Nitrato de plomo [Pb(NO₃)₂] CAT. 7731 Accustandard Inc lote: A8035019, estándar de nitrato de cromo [Cr(NO₃)₃•9H₂O] CAT. 7731 Hycel de México S.A de C.V lote: 298404 y estándar de nitrato de cadmio [Cd(NO₃)₂•4H₂O] CAT. 7801 Hycel de México S.A de C.V lote: 298399.

12.3. Obtención del micelio vegetativo

En placas de Petri con medio de cultivo agar papa-dextrosa, fueron inoculadas con tejido vegetativo de basidiocarpos frescos de *P. ostreatus*, se incubaron a 25°C durante 7 días. (Staments, 1983; Mumpuni *et al.*, 2017).

12.4. Preparación del micelio activado

Se colocó en un biorreactor con capacidad de 1 L, 1 kg de semilla de sorgo (*Sorghum spp.*), previamente hidratada al 40% (p/v) se esterilizó a 121°C y 15 psi por 1 h (Sánchez y Roice 2004), posteriormente la semilla se inoculó con 3 círculos de 1 cm de diámetro de agar con micelio de *P. ostreatus* (0.01 mg en peso seco) y se incubó a una temperatura de 25 °C ± 2 por 5 días (Staments,1983).

12.5. Obtención de biomasa (adsorbente) en medio líquido

Se esterilizaron en autoclave a 121°C y 15 psi por 15 min, 12 matraces Erlenmeyer de 500 mL con 250 mL de medio Kirk modificado a pH 5.5 con 1 g de fibra natural de salvado de

trigo y 0.01 g de CuSO_4 , se inocularon 3 discos de micelio de 1 cm de diámetro de agar con micelio de *P. ostreatus* (0.01 mg en peso seco), se incubaron durante 10 días a $25\text{ }^\circ\text{C} \pm 2$ (Díaz *et al.*, 2013).

12.6. Soluciones para evaluar la adsorción de metales en medio líquido (adsorbato)

A partir de soluciones patrón AccuStandard Inc. de 1000 mg/L, se prepararon 4 repeticiones de soluciones metálicas a concentraciones de 20 mg/L de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, y $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, que se colocaron en biorreactores de 500 mL, se les agregó 1 g de glucosa, se ajustó el pH a 5.5 y se esterilizaron a $121\text{ }^\circ\text{C}$ por 15 minutos 15 psi. Posteriormente se depositó la biomasa adsorbente generada en el medio líquido y se incubaron por 10 días a $25\text{ }^\circ\text{C}$. Se extrajeron alícuotas de 2 mL cada 24 horas durante 10 días para analizar la concentración metálica de cada solución en un espectrofotómetro de adsorción atómica modelo VARIAN 55B, longitud de onda para Pb 217.0 nm, Cr 425.4 nm y Cd 228.8 nm (Fleites, 2015; Kumar *et al.*, 2011).

12.7. Medio de cultivo para evaluar la tolerancia e inhibición del crecimiento miceliar

A partir de soluciones estándares de 1000 mg/L de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, y $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ se prepararon diferentes concentraciones (20, 40, 60, 80, y 100 mg/L) de soluciones para usarlas en la preparación de PDA (agar papa dextrosa), se ajustó el pH a 5.5, se esterilizo $121\text{ }^\circ\text{C}$ por 15 minutos, 15 psi, se vertió en cajas Petri (Fleites, 2015) en cada una se inoculó el micelio activado, se incubó a $25\text{ }^\circ\text{C} \pm 2$ y se cuantificó diariamente el crecimiento radial en milímetros durante 8 días (Morales *et al.*, 2010).

12.8. Descripción del efecto de las concentraciones metálicas sobre el micelio de *P. ostreatus* por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

El análisis por microscopía electrónica de barrido se realizó en un microscopio JECL modelo JSM-6610LV, complementado con un equipo de microanálisis EDX Inca Energy-350, Oxford Instruments, con detector de rayos X modelo X-Max 50, de 50 mm², con resolución teórica de 127 eV a la energía del pico K del Mn. Conjuntamente se realizó el análisis al micelio de *P. ostreatus* por espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDX), para describir la presencia de metales en su interior celular. Cada muestra del medio sólido de una concentración de 100 mg/L (Pb, Cr y Cd), se deshidrató durante 3 días en una estufa a 27 °C y posteriormente la muestra deshidratada se cubrió con polvo de oro en un equipo de recubrimiento marca Balzers modelo SCD 004 (Lozano *et al.*, 2014).

12.9. Construcción del biofiltro.

Para la construcción del biofiltro se utilizó como contenedor un tubo de material de PVC de 70 cm x 0.11 cm que tuviera en cada extremo una entrada y una salida. Al biofiltro ya construido se le colocó en el interior una malla de metal perforado (del tamaño del diámetro del biofiltro), con una capa de 700 g de tezontle (material inerte) de 10 cm de grosor, otra malla de metal y una capa de 10 cm de grosor del sustrato residual de paja de trigo (previamente pesado), así hasta formar 2 capas tanto de material inerte como de sustrato residual (Morales *et al.*, 2010) (Cañizares, 2000) (Bou *et al.*, 2018) (Morgan *et al.*, 2000) (Figura 8).

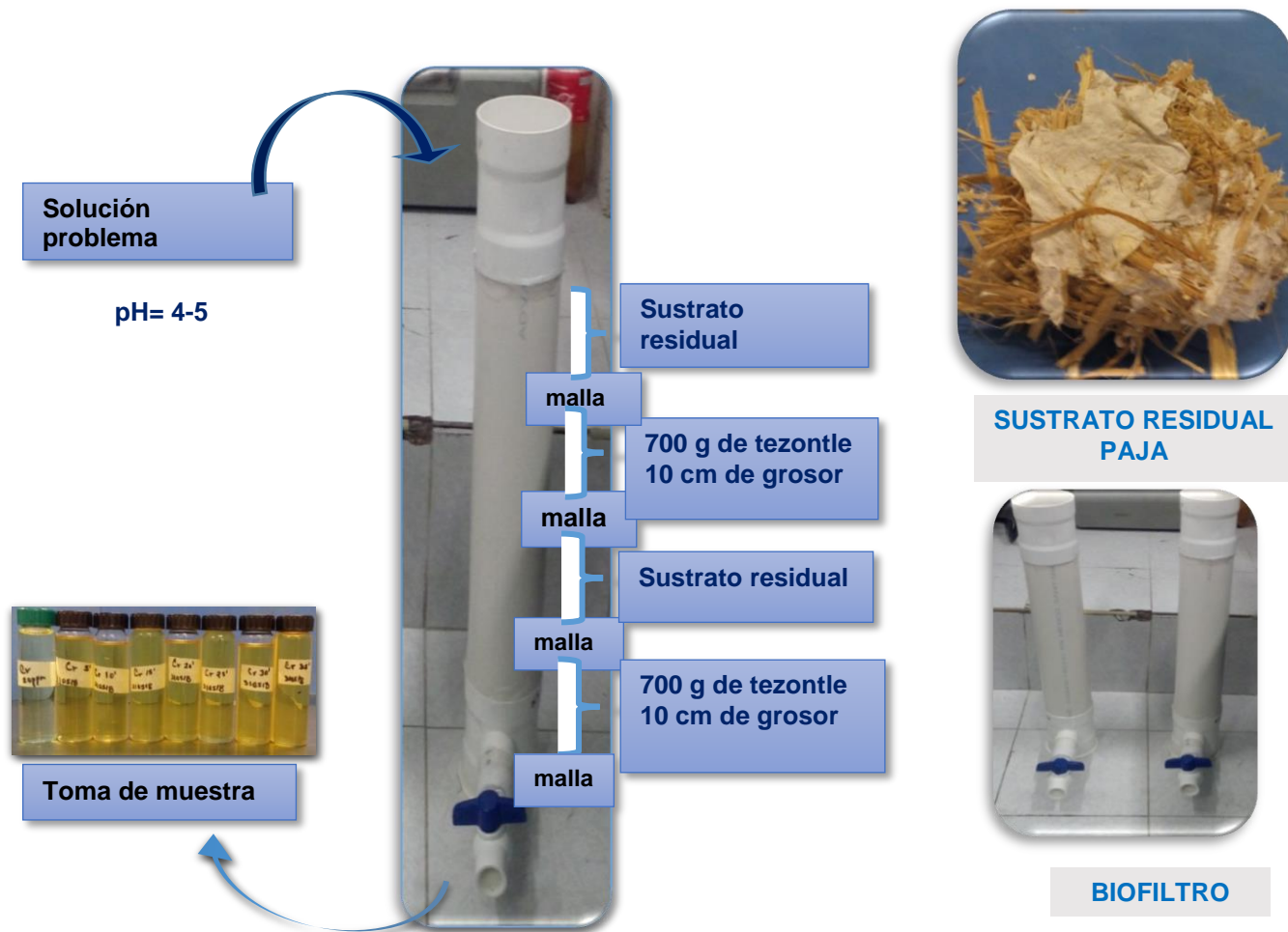


Figura 8. Esquematización del Biofiltro y Material Utilizado

12.10. Eficiencia del biofiltro con el material residual del cultivo de *Pleurotus ostreatus* y la cinética de retención de las concentraciones metálicas.

Se recolectó el sustrato residual de la cosecha del hongo *Pleurotus ostreatus* obtenido del cepario del laboratorio de micología del Departamento de Investigación en Ciencias Agrícolas (DICA), se prepararon las soluciones metálicas a una concentración de 20 mg/L de nitrato de plomo ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$), nitrato de cromo ($\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) y nitrato de cadmio ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) respectivamente. Una vez preparado el contenido del biofiltro se le agregó la solución problema (solución de plomo, cromo y cadmio) de forma independiente 2 L a un pH de (4 - 5) dependiendo del metal se tomaron muestras a los 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos, se leyeron las muestras por medio de un espectrofotómetro de absorción atómica modelo VARIAN 55B, longitud de onda para Pb 217.0 nm, Cr 425.4 nm y Cd 228.8 nm. (Morales et al., 2010) (Cañizares, 2000) (Bou et al., 2018) (Morgan et al., 2000).

13. CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DEL COLORANTE AZOICO POR LA ENZIMA LACASA DE LA CEPA DE *P. ostreatus* EN MEDIO LÍQUIDO.

Etapa I Generación, de la enzima lacasa por la cepa de *Pleurotus ostreatus* en medio líquido.

Etapa II Degradación de colorantes azoicos por la enzima lacasa

Etapa III Purificación la enzima lacasa

El trabajo experimental se dividió en tres etapas, en la etapa I se comprobó cualitativamente en medio sólido y líquido, la generación de la enzima lacasa por la cepa experimental. En la etapa II, se utilizó medio líquido de Kirk modificado para promover la generación de lacasa y evaluar su máxima producción mediante la determinación de la actividad

enzimática en extractos crudos no purificados. En la etapa III se purificó la fracción enzimática de los extractos crudos por medio de cromatografía en columna.

13.1. Etapa I ensayos cualitativos en placa-agar de la decoloración del rojo 23 por la enzima lacasa

En esta etapa se hizo la comprobación cualitativa en medio sólido, ensayo cuantitativo en medio líquido de la decoloración del colorante rojo 23.

13.1.1 Método cualitativo

Se realizaron pruebas por triplicado en cajas petri en medios de cultivo PDA; a los cuales se les agregó el colorante rojo directo 23, a la concentración de 50 mg/1000 L, para observar halos de oxidación por la actividad de lacasas (Krishnaveni y Kowsalya, 2011).

El medio de cultivo se vertió en placas de petri plásticas estériles de 5.1 cm de diámetro, la siembra o inoculación se realizó en campana de flujo laminar; se dejó solidificar y se incubaron durante 24 horas para la prueba de esterilidad. Posteriormente, las placas fueron inoculadas en la zona central con discos de agar, en los cuales había crecido el micelio de *P. ostreatus* las condiciones de incubación en las que se mantuvo el ensayo fue a temperatura de 25°C. se hizo la medición cada 24 horas de los radios de crecimiento, así como los radios de decoloración formados de cada una de las placas de los ensayos. Las mediciones se realizaron hasta alcanzar el cubrimiento total del micelio vegetativo (Salmones *et al.*, 1997).

13.1.2. Evaluación en medio líquido de la decoloración del rojo 23 por la enzima lacasa

Se esterilizaron en autoclave a 121°C y psi por 15 min, 9 matraces Erlenmeyer de 500 mL con 250 mL de medio líquido modificado de Kirk a pH 5.5 con 1 g de fibra natural de salvado de trigo y 0.01 de CuSO₄, se inocularon 3 discos de micelio de 1 cm de diámetro de agar

con micelio de *P. ostreatus* (0.01 mg en peso seco), se incubaron durante 10 días a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ (Díaz *et al.*, 2013) hasta obtener una capa de biomasa miceliar consistente, posteriormente se prepararon matraces Erlenmeyer de 500 mL con 250 mL de agua destilada coloreada con rojo 23 a 50 mg/L de concentración.

13.1.3. Inoculación de agua artificialmente coloreada con biomasa miceliar de *Pleurotus ostreatus*

A partir de una concentración de 50 mg/L del colorante rojo 23, previamente preparado, se tomaron (por triplicado) 150 ml para cada matraz y se añadió medio modificado de Kirk, Se esterilizó en autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C}/15$ lb de presión por 15 minutos y se dejó reposar por 48 horas prueba de esterilidad. Transcurrido ese tiempo, se inoculó el micelio generado en el medio líquido del paso anterior a los matraces con colorante más medio, por el método de decantación. Posteriormente se incubaron por 24 horas a $24\text{ }^{\circ}\text{C}$, y luego se realizó la medición de la concentración durante 9 días. De cada muestra se tomaron alícuotas para evaluar la decoloración en el tiempo de contacto por parte de la enzima lacasa tomada de los ensayos de decoloración en medio líquido se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro a 550 nm y la concentración del colorante se obtuvo mediante una recta de calibrado; concentración de colorante (mg/L) vs. Absorbancia (550nm).

13.1.4. Curva de calibración de colorante rojo 23

Para preparar el colorante se preparó la concentración a 100 mg/L, por lo que se ocuparon 100 mg de colorante rojo 23 en 1 L de agua destilada y se realizó la curva de calibración a 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 mg/L en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 550nm.

Se obtuvo la ecuación de la recta de calibración para posteriormente determinar la concentración en los diferentes ensayos de decoloración.

13.2 Etapa II. Evaluación de la Decoloración del Colorante

En esta etapa se realizó la generación de la enzima lacasa en medio líquido Kirk para evaluar su actividad enzimática y la decoloración del colorante rojo 23 por la biomasa generada en el medio kirk.

La caracterización enzimática bien sea de extractos crudos o de fracciones purificadas de una enzima permite determinar las condiciones óptimas tanto para la máxima producción de la enzima como de su propia estabilidad. La actividad enzimática se llevó a cabo sobre extractos crudos no purificados a partir de hacer crecer biomasa de *P. ostreatus* en el medio Kirk por medio de la reacción de oxidación del ABTS [2,2'-Azino-Bis (3ethylbenzo thizoline) -6-Sulphonate] con la enzima.

13.3 Etapa III Purificación de la Enzima Lacasa

En esta etapa se realizó la purificación de la fracción enzimática por medio de cromatografía de intercambio iónico. Antes de iniciar la purificación se colocaron 3 discos de agar de los cultivos de 100 mm de diámetro (equivalente a 0.08 mg en peso seco de la cepa) en matraces Erlenmeyer conteniendo 125 mL de medio Kirk se ajustó el pH a 5.5 se le agregó 1 g de fibra natural de salvado de trigo (allbran) y 0.01 mg sulfato de cobre, se esteriliza y se incubó durante 15 días a 25°C (Möeller y Garzón,2003) (Díaz *et al.*, 2013), para generar la biomasa que genero la enzima lacasa, utilizada en la decoloración del colorante experimental. El líquido sobrenadante (extracto) obtenido del paso anterior se decantó y se separó el micelio, el extracto

se centrifugó a 2, 500 rpm por 10 minutos, luego se condujo a un proceso de diálisis por medio de una membrana de diálisis con poros de 10 mDa (micro Dalton) con buffer potásico con pH 7.4, el contenido se centrifugó nuevamente y se llevó a cabo la separación a través del método de cromatografía de intercambio iónico, el cual se fundamentado en las características de carga eléctrica permitiendo la separación de moléculas

Así mismo se colocaron 10 g de resina DE-S3 para una columna de 50 mL, la resina se hidrató previamente 24 horas con agua destilada. se le adicionó NaCl 1M se mezcló, se dejó precipitar y se decantó. Se prepararon 200 mL de solución (100 mL de agua destilada 19 mL de buffer fosfato monobásico más 81 mL de buffer dibásico) se mezcló, se vació la resina en la columna hasta empaquetar, se adicionó el extracto y se agregó el eluyente (38 mL buffer de fosfatos monobásico más 162 mL de buffer dibásico y 11.7 mL de NaCl) para así obtener las fracciones enzimáticas recolectadas en tubos el cual se dividió en la parte inicial, media y final además de confirmar la presencia de la enzima oxido-reductasa lacasa con la prueba de ABTS (ácido 2,2' azino-bis-(3-etil benzatiazoline)-6-sulfónico). (Rodríguez *et al.*, 2002) (García *et al.*, 2013).

13.3.1 Determinación de lacasa

La determinación de esta enzima se realizó usando la metodología de Buswell *et al.*, (1995), en la que se hace reaccionar el extracto enzimático con el reactivo ABTS, en presencia de solución buffer de acetato de sodio, dicha reacción genera la coloración azul de la solución la cual se analiza en el espectrofotómetro (BECKMAN COULTER, DU 720) a través de la medida de la absorbancia a una longitud de onda de 420 nm ejecutando lecturas al inicio de la reacción y tres minutos después, para obtener un delta de absorbancia valioso en los cálculos, en donde se utilizó

la (fórmula 1) de la actividad lacasa. Una unidad de actividad lacasa fue definida como la capacidad de la enzima en oxidar 1 μmol de ABTS min^{-1} (Quevedo, 2011).

$$A = \frac{(V)(A_2 - A_1)}{(\epsilon)(\delta)v(t_2 - t_1)}$$

Donde:

V = es el volumen del ensayo cm^3 1 cm^3

$A_2 - A_1$, = es la diferencia de la absorbancia final con la inicial respecto al tiempo

(ϵ) = Constante de oxidación de $36 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} = 36000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$

(δ) = Paso de la luz 1 cm

(v) = volumen de la muestra 0.1 cm^3

$t = 1 \text{ min}$

Figura 9. *Medición de la Actividad de la Enzima Lacasa.*

13.3.2 Actividad enzimática

La actividad de la enzima lacasa fue determinada mediante la oxidación del ABTS [2,2'-Azino-Bis (3ethylbenzo thizoline) -6- Sulphonate] al catión ABTS^+ con un volumen de reacción de 1 mL que comprende 100 μL de ABTS a 1 mM, 300 μL de buffer de acetato de sodio 0.1 M, pH5 y 600 μL de extracto enzimático (Buswell *et al.*, 1995). Para ello por duplicado se utilizó un

blanco general para ajustar el espectrofotómetro y se analizó la muestra de extracto enzimático, se midió a una longitud de onda de 420 nm.

14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EL ENSAYO DE RETENCIÓN O BIOSORCIÓN DE METALES

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con tres repeticiones para evaluar el efecto de las variables independientes: concentración de los metales Pb, Cr y Cd, y los días de crecimiento micelio sobre las variables de respuesta: porcentaje de retención o adsorción. El conjunto de datos experimentales se analizó a través de una prueba de varianza (ANOVA) y una prueba de medias Tukey ($P \leq 0.05$) con el software R-commander (Fox, J., 2005).

15. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

15.1. Evaluación de la Adsorción de Metales en Medio Líquido

En la Figura 10a se describe el comportamiento de la solución de Pb a una concentración de 20 mg/L en función del tiempo de contacto con la biomasa de *P. ostreatus*. El primer día, Pb registró disminución drástica de la concentración inicial de 20 mg/L a 5.065 mg/L, siendo el día 5 la de mayor adsorción de dicho metal (75 %); los demás días se observaron procesos de desorción y adsorción con diferencia significativa respecto al tiempo cero (Tabla 5), algo semejante ocurre en los trabajos de Marín *et al.* (2015), quienes describen un proceso de adsorción del 57.9 % en las primeras 48 horas, con una concentración inicial de 100 mg/L. De igual modo, Yang *et al.* (2017) observaron la eliminación de Pb de 99.9 -100 %, y que se transportaba a la pared celular

fúngica en relación de 68.2 al 91.2 %. Esto indica que el metal además de ser adsorbido en la superficie de la biomasa micelias, ingresó al interior de las células interfiriendo con el metabolismo causando alteraciones en la estructura y morfología, este proceso fue favorecido por la variación del pH inicial de 5.5 a pH de 3.5, ya que de acuerdo a Javaid *et al.* (2011) este cambio propicio la disociación química tanto de grupos funcionales carboxílicos, amino, metilo, fosfato e hidróxidos constituyentes de la pared celular y de los metales en solución, aumentando su solubilidad y favoreciendo la disponibilidad de biosorción en la biomasa y la bioacumulación intracelular de acuerdo a Eliescu *et al.*(2020) y Huang *et al.*(2009).

El comportamiento del Cr en solución se aprecia en la figura 10b, la concentración inicial (20 mg/L) disminuyó a 13.150 mg/L (34.2 %) a pH de 5.5, la bioadsorción no mostró diferencia significativa hasta el día 4 registrando 11.6 mg/L (41.9 %) lo que correspondió al máximo de retención, los siguientes días se observaron desorciones del metal sin registrar mayor bioadsorción a pH final de 6.6. Por otra parte, Marín *et al.* (2015) evaluaron que el Cr en una concentración de 100 mg/L tuvo una adsorción ascendente a partir del cuarto día de muestreo de 33.9 mg/L, hasta 59.8 mg/L a los 10 días a pH 5.2, además, en los trabajos de da Rocha Ferreira *et al.* (2019) al utilizar solución de Cr (VI) 25 mg/L la adsorción en 15 días alcanzó el 100 %, también Vaseem *et al.* (2017) observaron adsorción del 89.2 % en 10 días de exposición.

Esto es indicativo de que el Cr interacciona parcialmente con el metabolismo celular en función del pH de la solución, en este caso el pH varió de 5.7 a 6.6 fue muy alto comparado con los registrados en las referencias, lo que probablemente no favoreció la solubilidad del Cr y esto se reflejó en el porcentaje de biosorción registrado en este trabajo, en el que de acuerdo con Corona *et al.* (2010) las células fúngicas pueden interactuar con el Cr a diferentes niveles, desde las estructuras químicas presentes en la pared celular como grupos $-NH_2$, $-COOH$ y OH , reportados

como aceptores del Cr (III) en función del intercambio iónico generado por la fluctuación óptima de pHs menores o cercanos a 3, lo que facilita al metal acceder al periplasma, a la membrana plasmática hasta el citoplasma y organelos celulares (Corona *et al.* 2010; Srivastava *et al.* 2006), esto permite considerar que la retención de Cr ocurrió en los primeros días de contacto y posteriormente el pH influyó en la desorción del metal haciéndolo insoluble para la retención por el micelio.

En la figura 10c se describe la adsorción de Cd la cual fue de 0.46 mg/L (2.25 %) del primer día de contacto a pH de 5.5, hasta el día 7 de incubación, sin embargo estadísticamente, a partir del día 5 se registró diferencia significativa de bioadsorción respecto al tiempo de contacto y en los días 9 y 10 la retención del metal alcanzó 1.08 mg/L (5.5 %), a pH 2.8, conjuntamente con inhibición del crecimiento miceliar (Tabla 5), posiblemente debido a las características tóxicas propias del metal y el cambio drástico del pH inicial de 5.5 a 2.8, esta tendencia de retención coincide con la descrita en los trabajos de Yang *et al.* (2017) quienes observaron disminución del 45.9-61.1 % de una concentración inicial de 40 mg/L a pH de 4.5; Además, en los trabajos de Marín *et al.* (2015) se observó que al día 10 hubo una disminución de 100 mg/L a 61.7 mg/L a pH de 4.2, este comportamiento de adsorción puede relacionarse al tipo de grupos funcionales como carboxilos, fosfatos, amino y fosfodiésteres presentes en la pared celular de los hongos de podredumbre blanca (Acosta *et al.* 2007), que de acuerdo con Baldrian (2003) se involucran en el proceso de adsorción de iones metálicos, siendo el pH factor principal para la retención, los autores referidos coinciden en que a pH superior a 3 se favorece la retención de Cd al influir en la carga eléctrica de los grupos funcionales mencionados, este comportamiento coincide con los resultados de Favero *et al.* (1990) quienes indicaron que el Cd en concentraciones hasta de 150 µgr, inhibe lentamente el desarrollo del micelio de *P. ostreatus* pero no lo bloquean por completo, efecto que

se presentó en este trabajo al iniciar la biosorción con pH 5 y terminar con pH 2.8 (Favero *et al.*,1990). Los valores de pH de una solución deben considerarse como un factor importante que influye en el proceso de biosorción, también influye en la toxicidad y la química de la solución de los metales Frutos *et al.* (2016), así como en las propiedades de hidrólisis y complejación al provocar cambios en la forma iónica Deng *et al.* (2009). Por lo tanto, la carga iónica de los grupos funcionales y la especiación del metal a diferentes valores de pH pueden afectar la biosorción. Otro aspecto importante es la especie del hongo utilizada debido a que de acuerdo con Javaid *et al.* (2011); Ogbo y Okhuoya (2011) en cada especie la biosorción puede variar con el tipo de metal, su concentración y composición del medio de cultivo o sustrato, y el comportamiento de un elemento depende de las especies particulares en la que está presente debido a que la mayor reactividad de una especie no siempre coincidirá con la mayor concentración inicial del metal en esa forma química. Por lo tanto, el comportamiento de un elemento en el ambiente (biodisponibilidad, toxicidad, distribución, etc.) no puede predecirse basándose en su concentración.

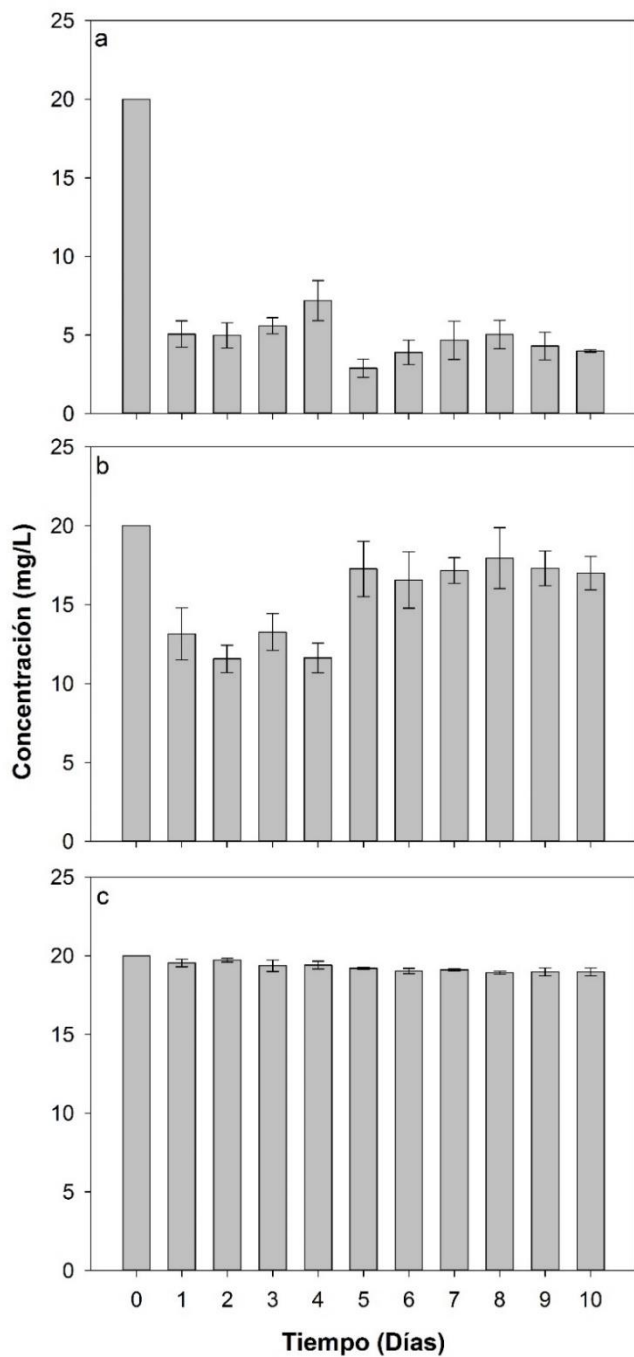


Figura 10. Describe la Cuantificación de las Concentraciones Retenidas por la Biomasa de *P. ostreatus* en Contacto con Soluciones de Plomo, Cromo y Cadmio en Función del Tiempo a una Concentración de 20 mg/L.

Tabla 3.*Concentración de Metales Pesados en un Medio Líquido.*

DÍA	TESTIGO (mg/L)	Plomo (mg/L)	Cromo (mg/L)	Cadmio (mg/L)
0	0.020 ± 0.027 ^a	20.000 ± 0.00 ^a	20.000 ± 0.000 ^a	20.000 ± 0.00 ^a
1	0.017 ± 0.009 ^a	5.065 ± 0.840 ^c	13.150 ± 1.643 ^c	19.545 ± 0.247 ^{abc}
2	0.020 ± 0.016 ^a	4.987 ± 0.798 ^c	11.565 ± 0.867 ^c	19.717 ± 0.120 ^{ab}
3	0.017 ± 0.017 ^a	5.592 ± 0.519 ^{bc}	13.265 ± 1.173 ^c	19.365 ± 0.365 ^{bcd}
4	0.022 ± 0.018 ^a	7.197 ± 1.271 ^b	11.632 ± 0.938 ^c	19.400 ± 0.249 ^{bcd}
5	0.015 ± 0.012 ^a	2.897 ± 0.589 ^d	17.267 ± 1.751 ^{ab}	19.202 ± 0.077 ^{cd}
6	0.040 ± 0.008 ^a	3.900 ± 0.787 ^{cd}	16.562 ± 1.778 ^b	19.025 ± 0.170 ^d
7	0.020 ± 0.008 ^a	4.680 ± 1.213 ^{cd}	17.167 ± 0.805 ^{ab}	19.100 ± 0.081 ^{cd}
8	0.057 ± 0.026 ^a	5.047 ± 0.903 ^c	17.945 ± 1.925 ^{ab}	18.925 ± 0.095 ^d
9	0.037 ± 0.026 ^a	4.297 ± 0.878 ^{cd}	17.292 ± 1.104 ^{ab}	18.975 ± 0.250 ^d
10	0.027 ± 0.009 ^a	4.000 ± 0.081 ^{cd}	17.000 ± 1.061 ^{ab}	18.972 ± 0.251 ^d
DMS	0.0614	1.9841	3.178	0.492

Los valores significan ± desviación estándar. La diferencia estadística significativa según la prueba de Tukey es $P \geq 0.05$.

15.2. Evaluación de Concentraciones Metálicas Inhibitorias del Crecimiento Micelias

El crecimiento radial del micelio de *P. ostreatus* se presenta en la Figura 11a en mm por día a diferentes concentraciones de soluciones de Pb (20, 40, 60,80 y 100 mg/L). Se observó el desarrollo continuo en las 5 concentraciones sin presentar inhibición, ni diferencia significativa $P \leq 0.05$ en los días 1 y 2, en cambio, muestra diferencia a partir del día 3. Asimismo, se puede observar que el día 8 alcanzó el 73.24 % de crecimiento a la concentración de 100 mg/L, resultado que coincide con el trabajo de Yang *et al.* (2017) quienes observaron el mismo fenómeno de resistencia. Mientras tanto Morales-Fonseca *et al.* (2010) trabajaron con pruebas de tolerancia a bajas (0.02 – 1.5 mg/L) y altas concentraciones (15 – 11,000 mg/L) de acetato de plomo, cuantificando el crecimiento radial con bajas concentraciones, observaron un crecimiento de micelio de *P. ostreatus* de 50 mm a los 10 días de incubación sin alteración en la morfología macroscópica y microscópica. Con altas concentraciones, describieron que el metal más tolerado por *P. ostreatus* fue el Pb en concentración de 2000 a 5000 mg/L, se debe mencionar además que Marín *et al.* (2015) al examinar el crecimiento micelias de *P. ostreatus* en concentración de 50 mg/L de solución de Pb observaron que no fue inhibido sino abundante y permaneció viable después de 20 días de exposición en medio sólido. Se infiere que *P. ostreatus* tiene una gran capacidad para tolerar y eliminar Pb a través de procesos consecutivos de adsorción y bioacumulación debido a que este metal puede fijarse en los grupos funcionales aminos (NH_2) e hidroxilos (OH) de la estructura química de la pared celular, logrando penetrar hasta la célula depositándose en el citosol de la estructura celular del micelio (Wang *et al.*, 2019; Eliescu *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2009)

El crecimiento radial del micelio del hongo *P. ostreatus* en mm por día a diferentes concentraciones de soluciones de Cr (20, 40, 60, 80, y 100 mg/L), se representa en la figura 11b, su desarrollo fue continuo, sin presentar inhibición en las 5 concentraciones de solución de Cr, sin diferencia significativa. Asimismo, en los días 7 y 8 se observó el 86.03 % de desarrollo a una concentración de 100 mg/L, este resultado es semejante al obtenido por Yang *et al.* (2017) quienes trabajaron con soluciones de Cr en concentraciones de 50-300 mg/L y observaron que el micelio crecía bien hasta 150 mg/L, pero a partir de 200 mg/L presentaba una inhibición parcial y una total en 300 mg/L. El mismo comportamiento lo registraron da Rocha Ferreira *et al.* (2019) quienes midieron el incremento radial del micelio de *P. ostreatus* en el rango de (10-150 mg/L) de Cr (VI) durante 10 días de incubación, sin inhibición de crecimiento, lo que implica que altas concentraciones de soluciones metálicas de Cr inhiben el crecimiento del hongo por el posible daño a la membrana celular, la inducción de la peroxidación lipídica, la formación de especies reactivas de oxígeno, así como daño a las estructuras de ADN y proteínas (Sazanova *et al.*, 2015; Eliescu *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2009).

En la Figura 11c se observa el crecimiento radial de micelio de *P. ostreatus* en mm por día a diferentes concentraciones de soluciones de Cd, cabe señalar que existió inhibición a partir de la concentración de 60 mg/L, pero en la concentración de 100 mg/L el día 8 se cuantificó un crecimiento de 48.92 %, sin avance posterior. Este comportamiento coincide con lo reportado por Yang *et al.* (2017) quienes trabajaron con concentraciones de Cd de 10-50 mg/L y reportaron inhibición del crecimiento miceliar en *P. ostreatus* a partir de la concentración de 40 mg/L, paralelamente, Miaomiao *et al.* (2018) descubrieron 2 cepas de *P. ostreatus* JINONG21 y SUYIN6 tolerantes al Cd, observaron que al utilizar concentraciones de solución de Cd de 5-40 mg/L, detectaron una inhibición de crecimiento a partir del día 7 de inoculación a la concentración de 40

mg/L, en este caso se puede considerar como en los metales anteriores que el comportamiento y el efecto de Cd sobre el crecimiento y la viabilidad del micelio de *P. ostreatus*, varían de acuerdo a las concentraciones y el tipo de elemento (Yang *et al.*, 2017., Baldrian, 2003).

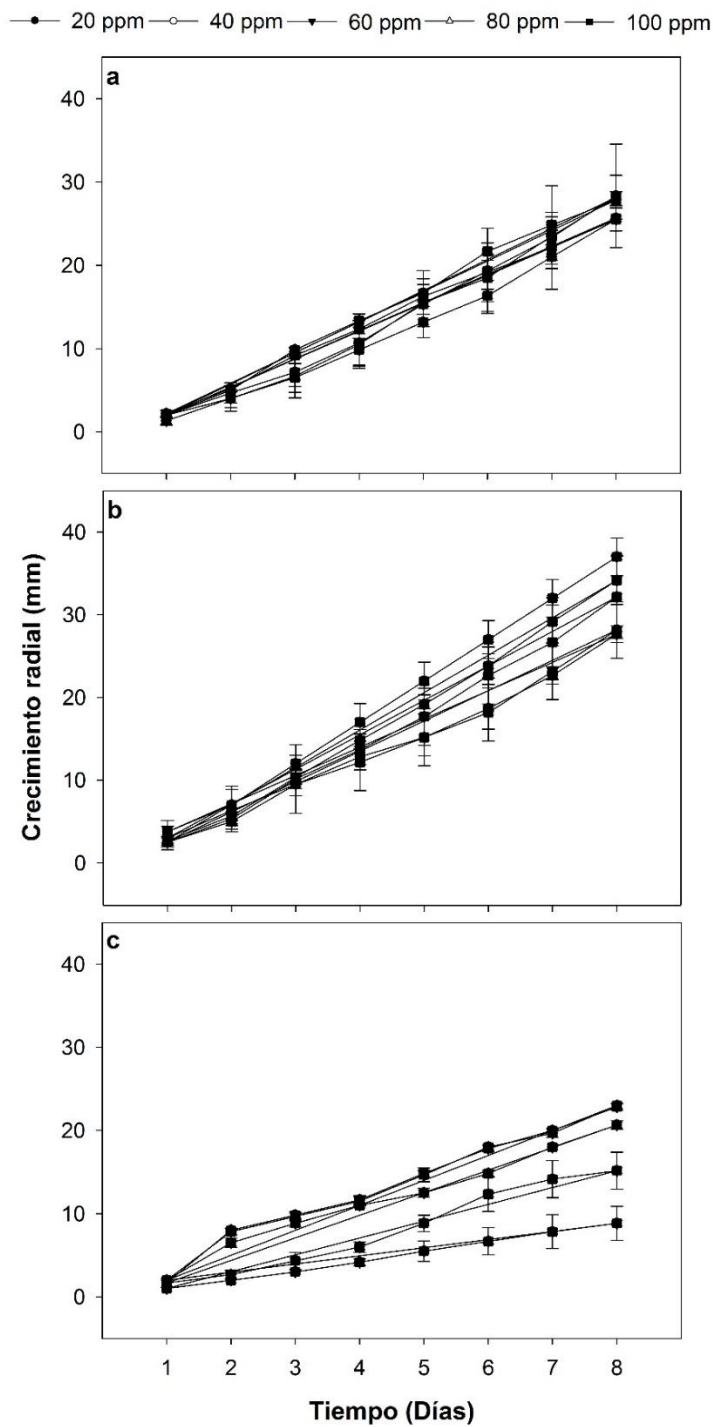


Figura 11. Representa el crecimiento del micelio radial del micelio del hongo *P. ostreatus* en (mm) por día durante 8 días en 5 diferentes concentraciones (20, 40, 60, 80 y 100 mg/L) de soluciones de plomo, cromo y cadmio.

15.3. Descripción del Efecto de la Concentración Metálica en la Morfología de Estructuras Miceliales por Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

La morfología microscópica estructural interna del micelio de *P. ostreatus* antes y después de hacer contacto con las diferentes concentraciones metálicas experimentales de Pb, Cr, y Cd se analizó por microscopia electrónica de barrido y espectrometría de rayos X.

En la Figura 12a se aprecian las estructuras microscópicas del micelio de *P. ostreatus*, las cuales se presentan desarrolladas en el medio sólido libre de metales (control) y se aprecian hifas alargadas, hialinas, hidratadas, cilíndricas, septadas, y las estructuras esféricas o blastoconidios turgentes (Bowman *et al.*, 2006).

En la Figura 12b se presentan los cambios ocurridos en la morfología del micelio por el efecto de la solución metálica de Pb, se observan las hifas deformadas, deshidratadas, aplanadas y rotas, no se advierten estructuras de reproducción, esto indica que el metal además de ser adsorbido en la superficie de la biomasa miceliana ingreso al interior de las células interfiriendo con el metabolismo causando alteraciones en la estructura y morfología celular, La Figura 12c presenta al micelio que estuvo en contacto con solución metálica de Cr, se advierten las estructuras sin turgencia, con ruptura de hifas y ausencia de los blastoconidios, esto es indicativo de la interacción del Cr con grupos funcionales OH⁻, -NH, pertenecientes a proteínas y carbohidratos de la pared celular, pero los daños celulares estructurales pueden estar relacionados con la interacción del cromo con grupos -CH₃ y =CH₂ de ácidos grasos asociados a fosfolípidos constituyentes de la membrana celular, esto implica la interacción del metal con el metabolismo celular y su bioacumulación en el interior del micelio. (Corona *et al.*, 2010; Cervantes *et al.*, 2006).

La Figura 12d muestra el micelio desarrollado en medio sólido con Cd, el cual muestra mayor deshidratación y deformación de las hifas, mayor ruptura y mínima presencia de estructuras conidiales.

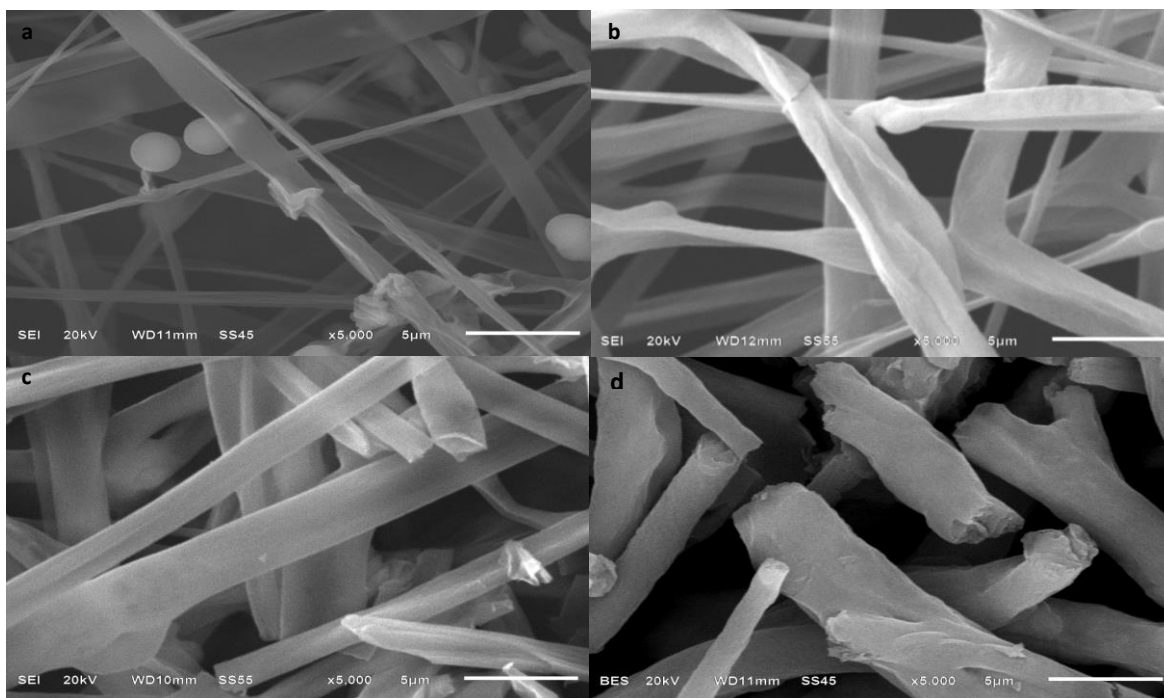


Figura 12. Efecto de los Metales sobre la Morfología Miceliar del Hongo: **(a)** sin solución metálica (control); **(b)** con solución de Pb; **(c)** con solución de Cr; **(d)** con solución de Cd a una concentración de 100 mg/L observado con un microscopio electrónico de barrido JSM-6610LV a una resolución de 5000 x.

En las secciones b, c, y d de la figura 12 también se aprecia el aumento del tamaño o engrosamiento de las estructuras dañadas, lo cual puede ser debido a la elevada tolerancia del micelio a ciertos metales, por lo que se inicia la activación de mecanismos de defensa como el engrosamiento de la pared, la síntesis de melaninas y la producción de ácidos orgánicos (Arango *et al.*, 2009), ya que de acuerdo con Banerjee y Nayak (2007); Javaid *et al.* (2011) estos hongos de podredumbre blanca y en particular *P. ostreatus* poseen una pared celular constituida por β 1-3 y β 1-6 glucanos, igualmente por grupos carboxílicos, amino, tiol, fosfato e hidróxido, así que la

pared celular ayuda en la biosorción de iones metálicos además de brindar una barrera primaria contra el metal (Baldrian, 2003; Cañizares,2000; Bánfalvi,2011) (Fig. 12).

La Figura 13 muestra el análisis de espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDX) al micelio de *P. ostreatus*, Pb alcanza mayor retención en el interior del micelio. En la figura 13a se presenta el análisis EDX a la muestra testigo del micelio de *P. ostreatus*, en la Figura 13b se puede apreciar la presencia de Pb en el micelio, esto corrobora que hubo bioacumulación en el interior de las células y la pared celular (Morales-Fonseca *et al.*, 2010), y en las figuras 13c y 13d se puede observar la presencia de Cr y Cd respectivamente en la prueba de microanálisis de energía de rayos X de las muestras de micelio de *P. ostreatus*.

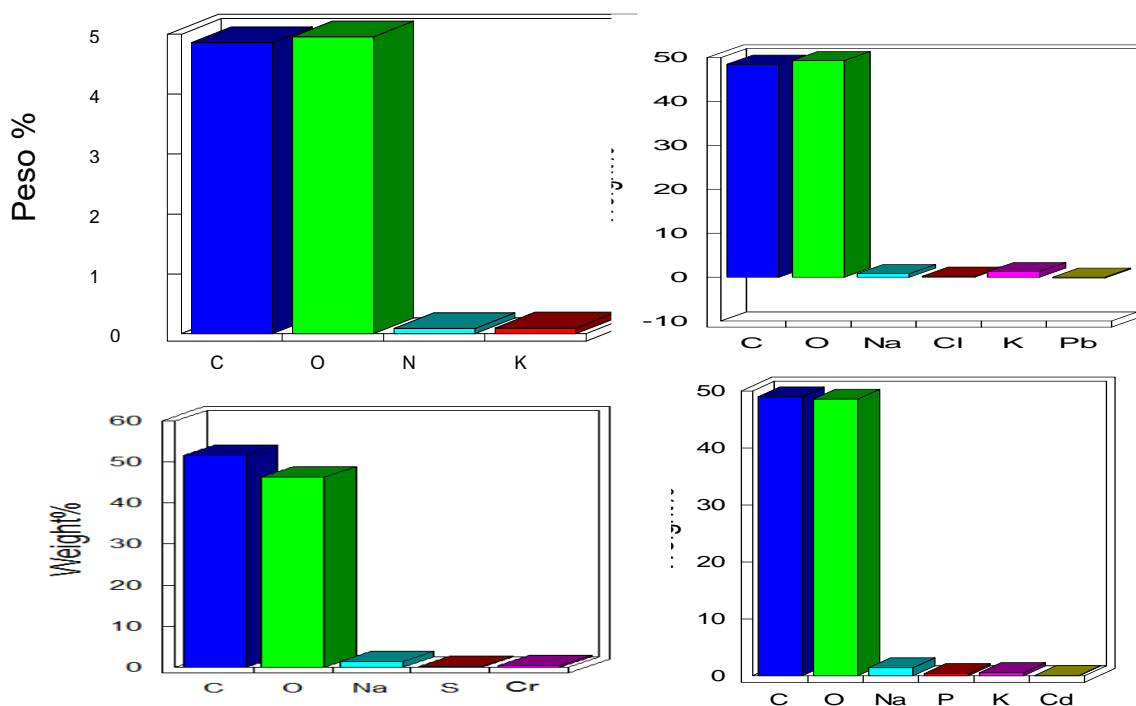


Figura 13. Microanálisis de Energía de Rayos X de las muestras de micelio de *P. ostreatus*:(a) Muestra control donde se observa el contenido cuantitativo del micelio;(b) Presencia de Pb en tejido en el tejido fúngico; (c) existencia de Cr;(d) Se observa la presencia de Cd.

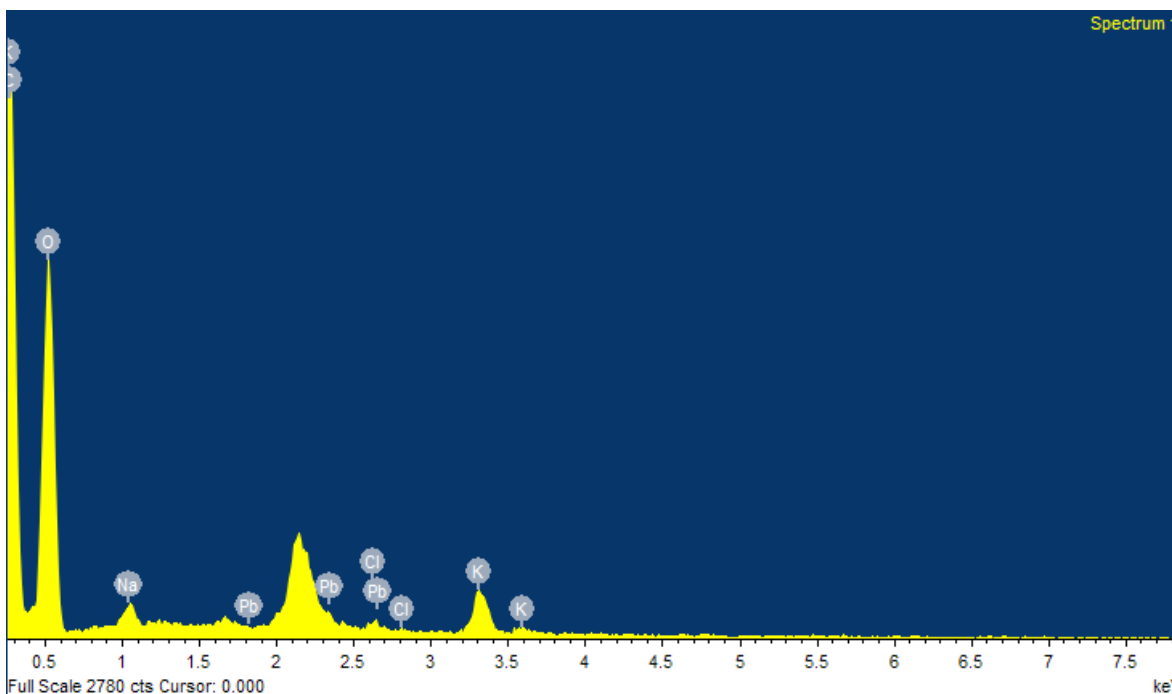


Figura 14. Espectro del Micelio Experimental. Describe el espectro que comprueba la presencia de Pb retenido por el micelio experimental.

15.4. Resultados del Biofiltro con el Material Residual de *P. ostreatus*

Tabla 4. Describe el comportamiento del sustrato residual de *P. ostreatus* en el biofiltro propuesto con las soluciones de Plomo, cromo y cadmio a una concentración de 20 mg/L en función del tiempo de contacto. Los resultados registran una disminución de la concentración de solución de plomo a los 30 minutos de contacto con el sustrato residual de una concentración de 20 mg/L a 5.84 mg/L, así mismo se aprecia que a partir de los 15 minutos se alcanza el máximo de retención de plomo; con solución de cromo se observa una disminución en concentración de 7.11 mg/L y una mayor retención desde los 5 minutos de contacto con el sustrato residual y en la solución de cadmio una

disminución de la concentración a los 30 minutos de contacto de 5.45 mg/L y una máxima retención a los 5 minutos de expuesto al sustrato residual. La composición del sustrato residual con material lignocelulósicos ayuda a la biosorción de metales en solución.

Tabla 4. *Efecto del Sustrato Residual de P. ostreatus en la Solución de Plomo, Cromo y Cadmio en el Biofiltro propuesto.*

Tiempo (minutos)	Solución de Plomo		Solución de Cromo		Solución de Cadmio	
	Control Pb paja	Concentración (mg/L)	Control Cr paja	Concentración (mg/L)	Control Cd paja	Concentración (mg/L)
0	20±0.0	20±0.0	20±0.0	20±0.0	20±0.0	20±0.0
5	19.98±0.01	7.14±0.02	19.97±0.02	8.14±0.05	19.96±0.02	8.72±0.03
10	19.98±0.01	7.13±0.03	19.98±0.00	7.34±0.06	19.98±0.01	7.68±0.05
15	19.98±0.01	6.81±0.10	19.97±0.02	7.32±0.06	19.98±0.01	6.61±0.03
20	19.98±0.01	6.12±0.02	19.97±0.01	7.28±0.02	19.96±0.01	5.57±0.10
25	19.96±0.05	6.0±0.1	19.96±0.02	7.26±0.03	19.95±0.00	5.45±0.03
30	19.97±0.02	5.84±0.01	19.98±0.01	7.11±0.01	19.97±0.01	5.45±0.03

Solución de plomo, cromo y cadmio a 20 mg/L.

15.5. Resultados degradación del colorante azoico por la enzima lacasa de la cepa de

Pleurotus ostreatus.

En la tabla 5 Representa la absorbancia y la concentración del colorante rojo 23 por el micelio de *P. ostreatus*. por tiempo observando una clara disminución de la concentración inicial de 50 mg/L a 2.8 mg/L obteniéndose un 94 % de decoloración en el día 14. Comprobando que el hongo tiene un poder de decolorar al colorante azoico. En la figura 15 se puede observar la degradación del colorante.

Tabla 5

Degradación de la Concentración del Colorante Rojo 23 por la Cepa de P. ostreatus

Tiempo (días)	Absorbancia	Concentración (mg/L)
0	0.179	50.00
2	0.066	18.43
5	0.047	13.13
7	0.035	9.78
9	0.022	6.15
12	0.017	4.75
14	0.01	2.8

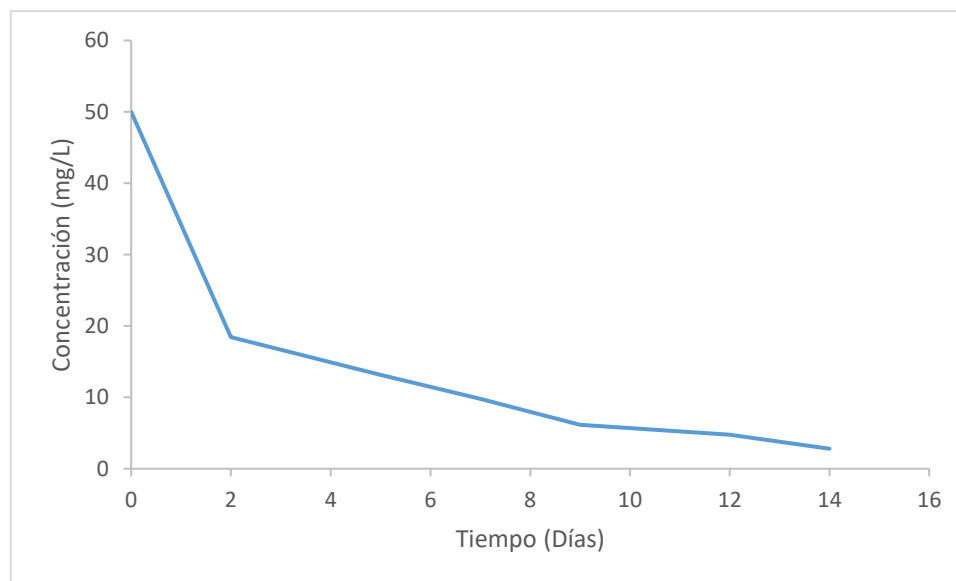


Figura 15. *Degradación del Colorante Rojo Directo 23 por el Micelio de P.ostreatus.*

15.6. Resultados de la actividad enzimática de la enzima lacasa.

La tabla 6. Representa los valores de la actividad enzimática de la enzima lacasa determinada por la oxidación del ABTS durante 25 días. Observado una mayor actividad a los 20 días

Tabla 6.

Actividad Enzimática de la Enzima Lacasa

Días	($\mu\text{mol/L} \cdot \text{min}$)
0	0
5	0.311±0.04
10	0.442±0.13
15	0.448±0.003
20	0.508±0.01
25	0.440±0.02

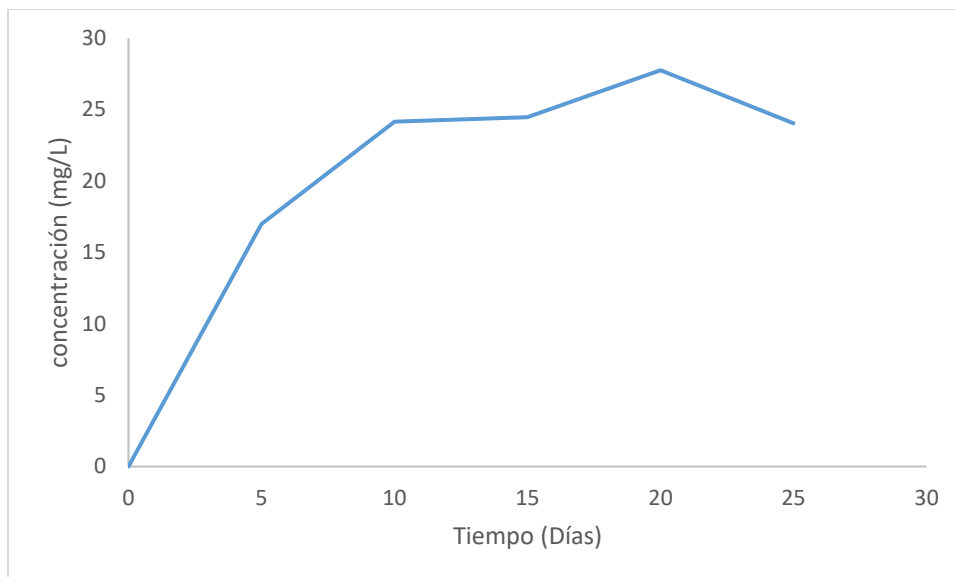


Figura 16. *Determinación de la Actividad Enzimática de la enzima Lacasa*

16. CONCLUSIONES

En cuanto al primer objetivo específico la evaluación de la tolerancia del micelio a las diferentes concentraciones de los metales experimentales se puede concluir que ninguna concentración (20, 40, 60, 80 y 100 mg/L) de Pb y Cr inhibió el crecimiento del micelio en medio de cultivo (PDA). Se infiere que *P. ostreatus* tiene una gran capacidad para tolerar y eliminar estos metales incluso si logran penetrar hasta la membrana celular y el citosol de la célula fúngica el hongo los puede retener sin inhibir su crecimiento. En el caso de Cd los resultados indican que el metal en el medio sólido puede ser adsorbido por el micelio y resulta toxico para esta cepa por

lo que su desarrollo se ve detenido, pero no bloqueado por completo. En este aspecto también se debe considerar la especie del hongo utilizada.

En relación a los efectos causados por cada metal en la estructura del micelio de *P. ostreatus* (que corresponde al segundo objetivo específico) se puede concluir que mediante el análisis por microscopia electrónica que Pb y Cr causaron daños estructurales a las células del micelio, debido a que lograron penetrar la pared y membrana celulares manifestando transformaciones en el tamaño y grosor del micelio y la disminución de blastoconidios, pero sin inhibir totalmente el crecimiento micelial y su reproducción en medio de cultivo, lo que indica la tolerancia de la cepa a estos metales.

En relación al tercer objetivo específico (Calcular la cinética de adsorción de la cepa de *Pleurotus ostreatus* en medio líquido a una concentración metálica) Como indican los resultados de biosorción de los metales experimentales por la biomasa micelial viva de *P. ostreatus*, la retención de Pb fue la más eficiente alcanzando el 75 %, seguida por la retención de Cr con 42 % y finalmente Cd que registro 2.25, esta diferencia implica considerar la influencia de los factores que la regulan, como son la temperatura, la biomasa adsorbente, las concentraciones iniciales de iones metálicos y el tiempo de contacto fueron iguales para cada metal pero el factor pH fue muy diferente en cada caso, en cuanto a Pb este factor se mantuvo en el rango óptimo reportado para favorecer la bioadsorción por la masa fúngica, lo que sustenta los resultados obtenidos de 74 %, en cuanto a Cr, se puede decir que la retención de 41.9 % fue influenciada por la variación del pH final que se mantuvo en 6.6, lo que de acuerdo a las referencias bibliográficas puede propiciar la precipitación extracelular y no registrar mayor retención por parte de la biomasa del hongo, además de que el pH optimo reportado para este proceso es menor o cercano a 3.

En el caso de Cd su retención de 5.15 % también el pH fue el factor que impidió su interacción con la biomasa de *P. ostreatus* de acuerdo a las referencias consultadas para que el Cd interaccione con las estructuras químicas de la pared y membranas celulares de la biomasa fúngica se requiere un rango de pH superior a 3, en este experimento el pH final fue de 2.8.

Se puede considerar que la biosorción inicial en caso de Cr y Cd, se pudo realizar debido a que la superficie de la biomasa presentó sitios activos o grupos funcionales de la pared celular inducidos por el pH 5.5 inicial de las soluciones metálicas experimentales.

En conclusión, la biosorción, tolerancia y los efectos de los metales pesados sobre la biomasa y micelio del hongo *P. ostreatus* variaron con respecto al factor pH y al tipo de elemento, siendo Cr el más tolerado, seguido de Pb, el crecimiento del micelio con cada uno presentó una serie de daños morfológicos en su estructura física pero no fue inhibido totalmente. Por otro lado, entre los tres metales estudiados en solución, Pb fue bioadsorbido por el hongo, lo que implicó la transformación de sus características por medio de diferentes mecanismos de respuesta usando 2 vías el transporte celular y la acumulación intracelular, lo que involucró tanto procesos de quimisorción como el intercambio iónico considerados como los mecanismos involucrados en la biosorción de metales. En general, el hongo tuvo una capacidad sobresaliente de biosorción de Pb y Cr. Por lo tanto, se puede proponer la utilización del micelio de esta cepa de *P. ostreatus* para generar un modelo de biorremediación específico para aguas residuales contaminadas con Pb.

En lo que respecta a los objetivos 4 y 5 se concluye que es factible la retención de los metales con los que se experimentó en esta tesis.

Teniendo en cuenta los aspectos económicos, es necesario producir adsorbentes de bajo costo, efectivos y reciclables para su uso generalizado. El potencial de biosorción de diferentes

especies debe evaluarse de forma comparativa. Observando los resultados obtenidos por la cepa de *P. ostreatus*, puede considerarse que la especie tiene potencial para ser utilizada como biosorbente de metales pesados sin perder de vista que el grado de tolerancia es diferente para cada especie y para diferentes metales pesados.

En cuanto a los objetivos 5 Analizar la cinética de producción de la enzima lacasa en la cepa de *P. ostreatus* en medio líquido y 6 Determinar la cinética de decoloración del colorante rojo 23 por el efecto enzimático concluimos que existen diferentes tecnologías para el tratamiento de aguas residuales procedentes de la industria textil para la eliminación o degradación de los colorantes sintéticos ya que estos compuestos son estables y difícil de degradar por sus estructuras moleculares aromáticas complejas, pero es necesario combinar dichas metodologías con biológicas para lograr la eliminación total y degradación de estos contaminantes. Como resultado se pudo comprobar que el hongo *Pleurotus ostreatus* tiene la capacidad de mineralización del colorante azoico rojo 23 hasta en 94.4% en 14 días de contacto con la biomasa del hongo y se ensayó la metodología para generar las enzimas lacasa mediante la utilización del medio líquido modificado de Kirk. Se puede proponer el cultivo de la biomasa de *P. ostreatus* en un biorreactor para generar en volumen esta enzima.

En cuanto a la propuesta de la construcción del biofiltro se concluye que es factible la retención de los metales con los que se experimentó en esta tesis.

17. AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que proporcionó para el estudio en el posgrado de Ciencias Ambientales de la BUAP (ICUAP).

18. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, S. H., Ismail, I. M., Mostafa, T. M., & Sulaymon, A. H. (2014). Biosorption of heavy metals: a review. *J Chem Sci Technol*, 3(4), 74-102.
- Acosta, I., Moctezuma-Zárate, M. D. G., Cárdenas, J. F., & Gutiérrez, C. (2007). Bioadsorción de cadmio (II) en solución acuosa por biomásas fúngicas. *Información tecnológica*, 18(1), 09-14.
- Anand, P., Isar, J., Saran, S., & Saxena, R. K. (2006). Bioaccumulation of copper by *Trichoderma viride*. *Bioresource Technology*, 97(8), 1018-1025.
- Arango, R. A., Lebow, P. K., & Green III, F. (2009). Correlation between oxalic acid production and tolerance of *Tyromyces palustris* strain TYP-6137 to N', N'-naphthaloylhydroxamine. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(1), 46-51.
- Awual, M. R., Ismael, M., Yaita, T., El-Safty, S. A., Shiwaku, H., Okamoto, Y., & Suzuki, S. (2013). Trace copper (II) ions detection and removal from water using novel ligand modified composite adsorbent. *Chemical Engineering Journal*, 222, 67-76.
- Baldrian, P. (2003). Interacciones de metales pesados con hongos de pudrición blanca. *Tecnología enzimática y microbiana*, 32 (1), 78-91.
- Banerjee, A., & Nayak, D. (2007). Biosorption of no-carrier-added radionuclides by calcium alginate beads using 'tracer packet' technique. *Bioresource technology*, 98(14), 2771-2774.
- Bánfalvi, G. (2011). Metales pesados, oligoelementos y sus efectos celulares. En Efectos celulares de los metales pesados. *Springer, Dordrecht*. (págs. 3-28).

Barrios-Ziolo, L. F., Gaviria-Restrepo, L. F., Agudelo, E. A., & Cardona-Gallo, S. A. (2015). Technologies for the removal of dyes and pigments present in wastewater. A review. *Dyna*, 82(191), 118-126.

Bou, L. P., Bernal, I. S., Duarte, C. L., Sardiñas, A. M., Arias, M. E. C., & Valdés, M. E. C. (2018). Biosorción microbiana de metales pesados: características del proceso/Biosorption of heavy metals: characteristics of the process. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, 6(1), 13.

Bouchez, CAP. (2016). Consejo de certificación de riego con aguas residuales tratadas en México (México). *USO SEGURO DE AGUAS RESIDUALES EN LA AGRICULTURA: EJEMPLOS DE BUENAS PRÁCTICAS*, 290.

Bowman, SM y Free, SJ (2006). La estructura y síntesis de la pared celular fúngica. *Bioensayos*, 28 (8), 799-808.

Breckle, S. (1991). Growth under stress: heavy metals. *Plant roots: The hidden half*, 351-373.

Camacho-Morales, R. L., Gerardo-Gerardo, J. L., & Sánchez, J. E. (2017). Ligninolytic enzyme production by white rot fungi during paraquat (herbicide) degradation. *Revista Argentina de microbiología*, 49(2), 189-196.

Cañizares-Villanueva, R. O. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *REVISTA LATINOAMERICANA DE MICROBIOLOGIA-MEXICO-*, 42(3), 131-143.

Carbajo García, J. M. (2015). Utilización de hongos de podredumbre blanca en la producción de pasta de celulosa de alto rendimiento.

Carmen, Z., & Daniela, S. (2012). *Textile organic dyes-characteristics, polluting effects and separation/elimination procedures from industrial effluents-a critical overview* (pp. 55-86). IntechOpen.

Caruso, JA y Montes-Bayon, M. (2003). Estudios de especiación elemental: nuevas direcciones para el análisis de trazas de metales. *Ecotoxicología y seguridad alimentaria*. 56(1). 148-163.

Cervantes, C., Espino-Saldaña, A. E., Acevedo-Aguilar, F., León-Rodríguez, I. L., Rivera-Cano, M. E., Avila-Rodríguez, M., ... & Moreno-Sánchez, R. (2006). Interacciones microbianas con metales pesados. *Revista latinoamericana de microbiología*, 48(2), 203-210.

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

Comisión Nacional del agua (CONAGUA). (2018). Estadística del agua en México

Corona, J. F. G., Saldaña, Á. E. E., Alonso, A. C., Aguilar, F. J. A., López, G. E. R., Fernández, F. J., ... & Wrobel, K. (2010). Mecanismos de interacción con cromo y aplicaciones biotecnológicas en hongos. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y algal*.

Covarrubias, S. A. (2015). El papel de los microorganismos en la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados.

Covarrubias, S. A., & Cabriales, J. J. P. (2017). Contaminación ambiental por metales pesados en México: Problemática y estrategias de fitorremediación. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33, 7-21.

da Rocha Ferreira, G. L., Vendruscolo, F., & Antoniosi Filho, N. R. (2019). Biosorption of hexavalent chromium by *Pleurotus ostreatus*. *Heliyon*, 5(3), e01450.

Das, A., & Mishra, S. (2016). Decolorization of different textile azo dyes using an isolated bacterium *Enterococcus durans* GM13. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, 5, 675-686

De la Peña, M. E., Ducci, J., & Zamora, V. (2013). Tratamiento de aguas residuales en México. *Banco Interamericano de Desarrollo* <http://publications.iadb.org/handle/11319/5931>.

De Lorenzo, V. (2018). Biodegradation and Bioremediation: An Introduction. En R. Steffan, Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids: Biodegradation and Bioremediation. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (págs. 1-21). Cham, Alemania: Springer. Doi: 10.1007/978-3-319-44535-9_1-1

Deng, S., & Ting, Y. P. (2005). Characterization of PEI-modified biomass and biosorption of Cu (II), Pb (II) and Ni (II). *Water Research*, 39(10), 2167-2177.

Díaz, R., Téllez-Téllez, M., Sánchez, C., Bibbins-Martínez, M. D., Díaz-Godínez, G., & Soriano-Santos, J. (2013). Influence of initial pH of the growing medium on the activity, production and genes expression profiles of laccase of *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16(4), 6-6.

Domínguez-Guilarte, O. L., Ramos-Leal, M., Sánchez-Reyes, A., Manzano-León, A. M., Argüelles-Álvarez, J., Sánchez-López, M. I., & Guerra-Rivera, G. (2011). Degradación biológica de contaminantes orgánicos persistentes por hongos de la podredumbre blanca. *Revista CENIC. Ciencias biológicas*, 42(2), 51-59.

- Eliescu, A., Georgescu, A. A., Nicolescu, C. M., Bumbac, M., Cioateră, N., Mureșeanu, M., & Buruleanu, L. C. (2020). Biosorption of Pb (II) from aqueous solution using Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) biomass and spent mushroom substrate. *Analytical Letters*, 1-28.
- Favero, N., Bressa, G., & Costa, P. (1990). Response of *Pleurotus ostreatus* to cadmium exposure. *Ecotoxicology and environmental safety*, 20(1), 1-6.
- Fleites, L., & Calderón, A. (2015). Adsorption of Cu and Cd by the mycelial biomass of three strains of *Pleurotus* white rot fungus. *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias*, 6(14), 20-34
- Fox, J. (2005). Getting started with the R commander: a basic-statistics graphical user interface to R. *J Stat Softw*, 14(9), 1-42.
- Frutos I, García-Delgado C, Gárate A, Eymar E. (2016) Biosorción de metales pesados por carbono orgánico de sustratos de hongos usados y sus materias primas. *Int J Environ Sci Technol*.13 (11): 2713–2720. doi: 10.1007 / s13762-016-1100-6. [[CrossRef](#)] [[Google Academic](#)].
- Galindo, A., Toncel, E., & Rincón, N. (2016). Evaluation of a biological filter as post-treatment wastewater unit using sea shells as support material. *Revista ION*, 29(2), 39-50.
- Gallego, J. L. R., & Martín, J. S. (2003). Biorremediación: Aspectos tecnológicos y aplicación al vertido del Prestige. *Industria y Minería*, (351), 17-21.
- Garay, M. B., & Gómez, O. T. (2016). Remoción de colorantes de efluentes sintético de industria textil aplicando tecnología avanzada. *Industria data*, 19(2), 91-95.

Garzón, C., Pedroza, A. M., & Barragán, B. (2009). Biodecoloración de colorantes azóicos, trifenilmetánicos y antraquinónicos por cepas de *P. ostreatus*, *T. versicolor* y *K. neumaniae*. *Trabajo de grado. Escuela Nacional de Ciencias biológicas del Instituto Politécnico Nacional. México. DF México, 150.*

Gilpavas, E., Arbeláez-Castaño, P. E., Medina-Arroyave, J.D., & Gómez-Atehortua, c.M. (2018). Tratamiento de aguas residuales de la industria textil mediante coagulación química acoplada a procesos fenton intensificados con ultrasonido de baja frecuencia. *Revista Internacional de contaminación Ambiental*, 34(1), 157-167.

Godoy, P. generalidades sobre micología. *Fúngicas Sistémicas*, 1.

Han, F., Kambala, v. S. R., Srinivasan, M., Rajarathnam, D., & Naidu, r. (2009). Tailored titanium dioxide photocatalysts for the degradation of organic dyes in wastewater treatment: a review. *Applied Catalysis A: General*, 359 (1-2), 25-40.

Hernández. (2012). *Procesos de Bioremediación*. Bogotá: UNAD.

Hibbett, DS, Binder, M., Bischoff, JF, Blackwell, M., Cannon, PF, Eriksson, OE, y Lumbsch, HT (2007). Una clasificación filogenética de alto nivel de los hongos. *Investigación micológica*, 111(5), 509-547.

Hoegger, P. J., Kilaru, S., James, T. Y., Thacker, J. R., & Kües, U. (2006). Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *The FEBS journal*, 273(10), 2308-2326.

Hoegger, P. J., Majcherczyk, A., Dwivedi, R. C., Svobodová, K., Kilaru, S., & Kües, U. (2007). 17. Enzymes in Wood Degradation. *Wood production, wood technology, and biotechnological impacts*, 383.

Hossain, M. (2014). *Investigation into cotton knit dyeing with reactive dyes to achieve right first time (RFT) shade*.

Huang, H., Cheng, G., Chen, L., Zhu, X., & Xu, H. (2009). Lead (II) removal from aqueous solution by spent *Agaricus bisporus*: determination of optimum process condition using Taguchi method. *Water, air, and soil pollution*, 203(1-4), 53-63.

Huang, Z., Pan, X.D., Wu, P. G., Han, J.L., & Chen, Q. (2014). Heavy metals in vegetables and the health risk to population in Zhejiang, China. *Food Control*, 36(1), 248-252.

Hunger, K. (Ed.). (2007). *Industrial dyes: chemistry, properties, applications*, John Wiley & Sons.

Hurtado, A., Torres, C., & Peña, E. J. (2010). Identificación de procesos de bioacumulación de cromo en la Laguna de Sonso. *Ingeniería de Recursos Naturales y del Ambiente*, (9), 69-75.

Ismadji, S., Soetaredjo, F. E., & Ayucitra, A. (2015). *Clay materials for environmental remediation* (Vol. 25, pp. 1-124). Berlin: Springer.

Javaid, A., Bajwa, R., Shafique, U., & Anwar, J. (2011). Removal of heavy metals by adsorption on *Pleurotus ostreatus*. *Biomass and Bioenergy*, 35(5), 1675-1682.

Jurado, A. T., Cuenca, A. A., Reyes, M. A. A., & Flores, Y. M. ENZIMAS

LIGNOCELULOLÍTICAS: PRODUCCIÓN, USOS Y PERSPECTIVAS. *PANORAMA DE LA INDUSTRIA DE CELULOSA Y PAPEL Y MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS 2016*, 64.

- Kapahi, M., & Sachdeva, S. (2017). Mycoremediation potential of Pleurotus species for heavy metals: a review. *Bioresources and bioprocessing*, 4(1), 32.
- Kulshreshtha, S., Mathur, N., & Bhatnagar, P. (2014). Mushroom as a product and their role in mycoremediation. *AMB Express*, 4(1), 29.
- Kumar Ramasamy, R., Congeevaram, S., & Thamaraiselvi, K. (2011). Evaluation of isolated fungal strain from e-waste recycling facility for effective sorption of toxic heavy metal Pb (II) ions and fungal protein molecular characterization—a mycoremediation approach. *Asian J. Exp. Biol. Sci*, 2, 342-347.
- Kumar, V., Shahi, S. K., & Singh, S. (2018). Bioremediation: An Eco-sustainable Approach for Restoration of Contaminated Sites. En j. Singh, D. Sharma, G. kumar, & N. Sharma, *Microbial Bioprospecting for Sustainable Development* (págs. 115-136). Singapur, Republicade Singapur: Springer. Doi: 10.1007/978-981-13-0053-0_6.
- Lara, M.D.L.Á.M. (2008). *Caracterización y aplicación de biomasa residual a la eliminación de metales pesados* (p.1). Universidad de Granada.
- López Grimau, V., & Crespi Rosell, M. (2015). Gestión de los efluentes de la industria textil.p(18).
- López, R. A. N., Vong, Y. M., Borges, R. O., & Olgúin, E. J. (2004). Fitorremediación: fundamentos y aplicaciones.
- Lozano, V., Yañez, M. J., & Morales, A. (2014). Principios y práctica de la microscopía electrónica. México: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).
- Lutzoni, F. y Miadlikowska, J. (2009). Líquenes. *Biología actual*, 19(13), R502-R503.

- Manavalan, T., Manavalan, A. y Heese, K. (2015). Caracterización de enzimas lignocelulóticas de hongos de pudrición blanca. *Microbiología actual*, 70(4), 485-498.
- Manjarrés Pinzón. K., Castro, A., & Rodríguez Sandoval, E. (2010). Producción de lacasa utilizando *Pleurotus ostreatus* sobre cáscaras de plátano y bagazo de caña. *Revista Lasallista de investigación*.
- Manterola, H., Cerda D., & Mira, J. (1999). Los residuos agrícolas y su uso en la alimentación de rumiantes. Fundación para la innovación Agraria de Ministerio de Agricultura. Santiago, Chile.
- Marín-Castro, M., Flores, V. T., Vega, R. C., & Fleites, G. L. (2015). Adsorción de Cu y Cd por la biomasa miceliar de tres cepas *Pleurotus*, hongo de la pudrición blanca. *Geominas*, 43(67), 109-115.
- Martínez, A. T., Ruíz – Dueñas, F. J., Martínez, M. J., del Río, J.C., & Gutiérrez, A. (2009). Enzymatic delignification of plant cell Wall: from nature to mil. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(3), 348-357.
- Martínez, Á. T., Speranza, M., Ruíz- Dueñas, F. J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., ... & Río Andrade, J. C. D. (2005). Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspect of the fungal attack of lignin. México.2018. SEMARNAT México. www.gob/Conagua.
- Miaomiao, C. H. E. N., Zheng, X., Liang, C. H. E. N., & Xiaofang, L. I. (2018). Cadmium-resistant oyster mushrooms from North China for mycoremediation. *Pedosphere*, 28(6), 848-855.
- Mishra, A., & Malik, A. (2012). Simultaneous bioaccumulation of multiple metals from electroplating effluent using *Aspergillus lentulus*. *Water research*, 46(16), 4991-4998.

Montenegro Chavez, P. Z. (2018). Propuesta de producción de conserva de aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) para el desarrollo socioeconómico de la Asociación Apafavel-Incahuasi en la provincia de Ferreñafe.

Montoya, S., Gallego, J., Sucerquia, A., Peláez, B., Betancourt, O., & Arias, D. (2010).

Macromicetos observados en bosques del Departamento de Caldas: su influencia en el equilibrio y la conservación de la biodiversidad. *Bol. cient. mus. hist. nat.*, 14(2), 57-73.

Morales-Fonseca, D., Ruiz-Tovar, K., Martínez-Salgado, M. M., Soto-Guzmán, A. B., Falcony-Guajardo, C., Vázquez, R. R., & Pedroza-Rodríguez, A. M. (2010). Desarrollo de un bioadsorbente laminar con *Phanerochaete chrysosporium* hipertolerante al cadmio, al níquel y al plomo para el tratamiento de aguas. *Revista iberoamericana de Micología*, 27(3), 111-118.

Mosa, K. A., Saadoun, I., Kumar, K., Helmy, M., & Dhankher, O. P. (2016). Potential biotechnological strategies for the cleanup of heavy metals and metalloids. *Frontiers in plant science*, 7, 303.

Mumpuni, A., Ekowati, N., Purnomowati, P., & Purwati, E. S. (2017). Growth and Protein Content Establishment of *Pleurotus ostreatus* on Liquid and Solid Medium. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 9(3).

Ogbo, E. M., & Okhuoya, J. A. (2011). Bio-absorption of some heavy metals by *Pleurotus tuber-regium* Fr. Singer (an edible mushroom) from crude oil polluted soils amended with fertilizers and cellulosic wastes. *International Journal of Soil science*, 6(1), 34.

Pawar, R. R., Bajaj, H. C., & Lee, S. M. (2016). Activated bentonite as a low-cost adsorbent for the removal of Cu (II) and Pb (II) from aqueous solutions: Batch and column studies. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 34, 213-223.

Pérez Castresana, G., Tamariz Flores, V., López Reyes, L., Hernández Aldana, F., Castelán Vega, R., Morán Perales, J. L., ... & Handal Silva, A. (2018). Atoyac river pollution in the metropolitan area of Puebla, México. *Water*, 10(3), 267.

PNUMA, 2001. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, Oficina Regional para América Latina y el Caribe (PNUMA/ORPALC), Informe Final del Taller Latinoamericano sobre Manejo de Aguas Residuales Municipales, UNEP/LAC-GPA.I/7, Ciudad de México, México, 12 de septiembre de 2001.

Prakash, V. (2017). Mycoremediation of environmental pollutants. *Int J Chem Tech Res*, 10(3), 149-155.

Puga, J. (2011). "La escasez de agua en Puebla "es ofensiva" y tiene niveles de "tragedia nacional". La Jornada de Oriente, en línea.

QAZILBASH, A. A. (2004). *Isolation and characterization of heavy metal tolerant biota from industrially polluted soils and their role in bioremediation* (Doctoral dissertation, Quaid-i-Azam University Islamabad, Pakistan).210-256

Quevedo Hidalgo, B. E. (2011). Evaluación de la degradación de residuos de floricultura para la obtención de azúcares con el uso de tres hongos lignocelulolíticos. *Departamento de Ingeniería Química y Ambiental*.

Ramírez, P., & Cocha, J. M. (2003). Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. *Revista Peruana de Biología*, 10(1), 67-77.

- Ramos Leal, J. A., & Morán Ramírez, J. (2016). El sistema hidrológico Esperanza-Oriental y su impacto sobre el acuífero de Tecamachalco, Puebla, México.
- Ramos, D. C. (2018). Adsorción de Cadmio, Cobre y Plomo en Bentonita, Caolín y Zeolita Naturales y Modificadas: Una Revisión de los Parámetros de Operación, Isotermas y Cinética. *Ingeniería*, 23(3), 252-273.
- Reyes, Y., Vergara, I., Torres, O., Lagos, M.D., & Jiménez, e. E. G. (2016). Contaminación por metales pesados: Implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria. *Ingeniería Investigaciones y Desarrollo: 12 + D*, 16(2), 66-77.
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., & Nigam, P. (2001). Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource technology*, 77(3), 247-255.
- Rühl, M. (2010). *Laccases and other ligninolytic enzymes of the basidiomycetes Coprinopsis cinerea and Pleurotus ostreatus*. Cuvillier Verlag.
- Sampieri, R. H. (2018). *Metodología de la investigación: las rutas cuantitativas, cualitativas y mixta*. McGraw Hill México.
- Sánchez, A. (2017). Saneamiento descentralizado y reutilización sustentable de las aguas residuales municipales en México. *Sociedad y ambiente*, (14), 119-143.
- Sánchez, C. (2009). Residuos lignocelulósicos: biodegradación y bioconversión por hongos. *Avances en biotecnología*. 27(2), 185-194.
- Sánchez, J. E., & Royse, D. J. (2001). *La biología y el cultivo de Pleurotus spp* (No. 635.8 S211b). México, MX: Limusa.

Sánchez, M. B., & Uribe, C. (2018). Contaminación de los ambientes acuáticos generados por la industria textil. *Revista Campus*, 23(26).

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

Sazanova, K., Osmolovskaya, N., Schiparev, S., Yakkonen, K., Kuchaeva, L., & Vlasov, D. (2015). Organic acids induce tolerance to zinc-and copper-exposed fungi under various growth conditions. *Current microbiology*, 70(4), 520-527.

SEMARNAT-CONAGUA 2018. Clasificación de cuerpos. de aguas nacionales. ríos Atoyac y Zahuapan. (Puebla-Tlaxcala). Subdirección General Técnica. Organismo de Cuenca Balsas.

SIAP, S. (2017) Servicios de información agroalimentaria y pesquera. *Reporte especial naranja*.

Siddique, M., Farooq, r., Khan, ZM, Khan, Z. y Shaukat, SF (2011). Descomposición mejorada del colorante azu reactive 19 en un reactor electroquímico asistido por ultrasonidos. *Ecoquímica ultrasónica*. 18 (1). 190- 196.

Singh, A., Sharma, R. K., Agrawal, M., & Marshall, f. M. (2010). Risk assessment of heavy metal toxicity through contaminated vegetables from wastewater irrigates area of Varanasi, India. *Tropical ecology*, 51(2), 375-387.

Singh, J., Kant, K., Sharma, H. B., & Rana, K. S. (2008). Bioaccumulation of cadmium in tissues of *Cirrihna mrigala* and *Catla catla*. *Asian J Exp Sci*, 22, 411-414.

Spivey, A. (2007). The weight of lead: Effects add up in adults.

- Srivastava, S., & Thakur, I. S. (2006). Biosorption potency of *Aspergillus niger* for removal of chromium (VI). *Current microbiology*, 53(3), 232-237.
- Stamets, P., & Chilton, J. S. (1983). The mushroom cultivator. *First Washington*.
- Strokal, M., Kroeze, C., Franssen, W., Hofstra, N., Koelmans, B., Siegfried, M., & Vermeulen, L. (2018). Fast increases in river pollution from sewage: a global trend. *EGUGA*, 7450.
- Tejada-Tovar, C., Villabona-Ortiz, Á., & Garcés-Jaraba, L. (2015). Adsorción de metales pesados en aguas residuales usando materiales de origen biológico. *TecnoLógicas*, 18(34), 109-123.
- Tiller, K. G. (1989). Heavy metals in soils and their environmental significance. In *Advances in soil science* (p. 113-142). Springer, New York, NY.
- Universidad de Oxford – Complutense., Diccionario de Química, 1er ed., Madrid, Complutense, 160 P., Impreso, 2003.
- Vaseem, H., Singh, V. K., & Singh, M. P. (2017). Heavy metal pollution due to coal washery effluent and its decontamination using a macrofungus, *Pleurotus ostreatus*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 145, 42-49.
- Vilanova, r., Santín, I., & Pedret, C. (2017). Control y operación de estaciones depuradoras de aguas residuales: modelado y simulación. *Revista Iberoamericana de Automática e informática industrial*, 14(3), 217-233.
- Viraraghavan, T. y Srinivasan, A. (2011). Biosorción de hongos y biosorbentes. En *Biosorción microbiana de metales* (págs. 143-158). Springer, Dordrecht.

- Wang, Y., Yi, B., Sun, X., Yu, L., Wu, L., Liu, W., & Li, X. (2019). Removal and tolerance mechanism of Pb by a filamentous fungus: A case study. *Chemosphere*, 225, 200-208.
- Xu, P., Liu, L., Zeng, G., Huang, D., Lai, C., Zhao, M. ... & Zhang, C. (2014). Heavy metal-induced glutathione accumulation and its role in heavy metal detoxification in *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(14), 6409-6418.
- Yang, S., Sun, X., Shen, Y., Chang, C., Guo, E., La, G. ... & Li, X. (2017). Tolerance and removal mechanisms of heavy metals by fungus *Pleurotus ostreatus* Haas. *Water, Air, & Soil Pollution*, 228(4), 130.
- Yazdani, M., Yap, C. K., Abdullah, F., & Tan, S. G. (2010). An in vitro study on the adsorption, absorption and uptake capacity of Zn by the bioremediator *Trichoderma atroviride*. *Environment Asia*, 3(1), 53-59.
- Yee-Batista, C. (2013). Un 70% de las aguas residuales de Latinoamérica vuelven a los ríos sin ser tratadas. Banco Mundial BIRF – AIF. Recuperado de : <http://www.Bancomundial.org/es/news/feature/2014/01/02/ríos-de-latinoamerica-contaminados>.
- Zhang, M. M., Chen, W. M., Chen, B. Y., Chang, C. t., Hsueh, c. C., Ding, Y., & Xu, H. (2010). Comparative study on characteristics of azo dye decolorization by indigenous decolorizers. *Bioresource technology*, 101(8), 2651-2656.
- Zhang, Z., Gai, L., Hou, Z., Yang, C., Ma, C., Wang, Z. ... & Xu, P. (2010). Characterization and biotechnological potential of petroleum-degrading bacteria isolated from oil-contaminated soils. *Bioresource technology*, 101(21), 8452-8456.

Zhao, X., & Hardin, I. R. (2007). HPLC and spectrophotometric analysis of biodegradation of azo dyes by *Pleurotus ostreatus*. *Dyes and Pigments*, 73(3), 322-325.

ANEXO 1

Tabla

Medio de Cultivo PDA para Prueba Cualitativa de Lacasa Medio Sólido

Composición	Cantidad
Agar papa dextrosa	39 g
Agua destilada (rojo 23)	1 L

ANEXO 2.

El medio Kirk (Kirk *et al.*, 1986) es un medio específico, limitado en nitrógeno, el cual contiene (Tabla 4).

Tabla

Medios de Cultivo Experimental medio Líquido.

Composición	Cantidad
Glucosa	1 g
Sulfato de magnesio	0.05 g
Papa en polvo	30 g
Dextrosa	2 g
Agua destilada	100 mL
Solución de elementos traza	1 mL
Solución de elementos traza aforar a 1 L	
Composición	Cantidad
Sulfato ferroso	0.10 g
Sulfato cúprico	0.01 g
Ácido bórico	0.01 g
Cloruro de sodio	1.0 g
Sulfato de amonio	0.01 g

ANEXO 3

Solución Buffer de Acetato de Sodio a 0.1 M y pH 5

Se pesaron 6.804 g de acetato de sodio y se mezclaron en 480 mL de agua destilada; el pH se ajustó a 5.0 con HCl concentrado y se aforó a 500 mL con agua destilada. La solución preparada se guardó en un frasco ámbar y se mantuvo en refrigeración para evitar la exposición a la luz y la temperatura ambiente.

Solución de ABTS a 1mM

Se pesaron 0.54868g de ABTS [2,2'-Azino-Bis (3ethylbenzo thizoline) -6- Sulphonate] (MEYER) y se mezclaron en 850 mL de agua destilada y se aforó a 1000 mL con agua destilada. La solución preparada se almacenó en un frasco ámbar forrada con aluminio, y se mantuvo en refrigeración.

ANEXO 4

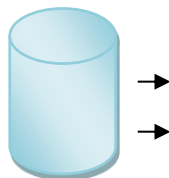
Preparación de la muestra: por duplicado se utilizó un blanco general para ajustar el espectrofotómetro y se analizó la muestra con extracto enzimático, se midió a una longitud de onda de 420nm.

Actividad lacasa. Blanco

Muestra: Realizar por
duplicado

Agitar

Medir al espectrofotómetro a
una λ 420 nm



100 μ L sustrato ABTS

900 μ L buffer de acetato

de sodio 0.1 M a pH 5

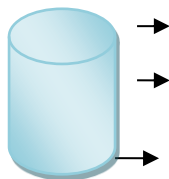
Preparación del blanco general a 1 mL de reacción.

Actividad lacasa. Extracto enzimático

Muestra: Realizar por
duplicado

Agitar

Medir al espectrofotómetro a
una λ 420 nm



100 μ L sustrato ABTS

300 μ l buffer de acetato

de sodio 0.1 M a pH 5

600 μ L extracto

enzimático

Preparación de muestra a 1 mL de reacción.

ANEXO 5

Tabla de ANOVA. Medias, Coeficientes de Variación y Cuadrados Medios de Inhibición de Cadmio, Cromo, y Plomo por el Micelio de *P. ostreatus*.

Variable	Media	CV (%)	Cuadrados medios		
			Día	Concentración	Error
Cadmio	10.287	8.948	931.437***	99.112***	0.847
Cromo	16.452	14.745	3065.403***	44.307***	5.885
Plomo	13.764	17.130	2394.034***	10.786**	5.560

*= $P \leq 0.05$ **= $P \leq 0.001$ ***= $P \leq 0.0001$

Tabla Crecimiento del Micelio (mm) en soluciones de Plomo

Días	Testigo	20	40	60	80	100
		(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)
1	2.3	1.5	2.0	2.0	2.2	2.0
2	5.2	3.9	4.0	5.0	5.2	4.6
3	9.9	6.5	6.6	9.8	9.2	7.1
4	13.5	9.8	10.5	13.3	12.3	10.6
5	16.8	13.2	15.5	16.7	16.2	15.3
6	21.8	16.1	18.5	21.7	19.2	19.3
7	24.9	21.0	23.5	24.8	22.2	23.3
8	28.5	25.5	28.2	27.8	25.7	28.3

Crecimiento radial de micelio de *Pleurotus ostreatus* por día en milímetros a diferentes concentraciones de soluciones de plomo (mg/L)

Tabla Crecimiento del Micelio en Soluciones de Cromo

Días	Testigo	20 mg/L	40 mg/L	60 mg/L	80 mg/L	100 mg/L
1	3.89	2.7	2.5	3.0	2.5	3.8
2	7.13	5.7	5.3	6.3	5.0	7.0
3	12.22	10.3	10.2	9.5	9.5	12.0
4	17.51	14.8	13.7	12.2	12.8	17.0
5	22.80	19.2	17.7	15.2	15.2	22.0
6	27.44	23.8	22.7	18.2	18.7	27.0
7	33.20	29.2	26.7	23.2	22.7	32.0
8	37.21	34.2	32.2	28.2	27.7	37.0

Crecimiento radial de micelio de *Pleurotus ostreatus* por día en milímetros a diferentes concentraciones en solución de cromo mg/L.

Tabla Crecimiento del Micelio (mm) en solución de Cadmio

Días	Testigo	20 (mg/L)	40 (mg/L)	60 (mg/L)	80 (mg/L)	100 (mg/L)
1	2.3	1.7	1.0	2.0	2.0	1.7
2	9.25	2.7	2.0	7.8	6.5	8.0
3	11.35	4.3	3.0	9.7	8.8	9.8
4	12.67	6.0	4.2	11.5	11.0	11.7
5	15.89	8.9	5.6	14.7	12.7	14.8
6	19.89	12.3	6.7	18.0	14.8	17.8
7	25.90	14.2	7.8	19.7	18.0	20.0
8	28.98	15.1	8.8	23.0	20.7	22.8

Crecimiento radial de micelio de *Pleurotus ostreatus* por día en milímetros a diferentes concentraciones en solución de cadmio (mg/L)

ANEXO 6

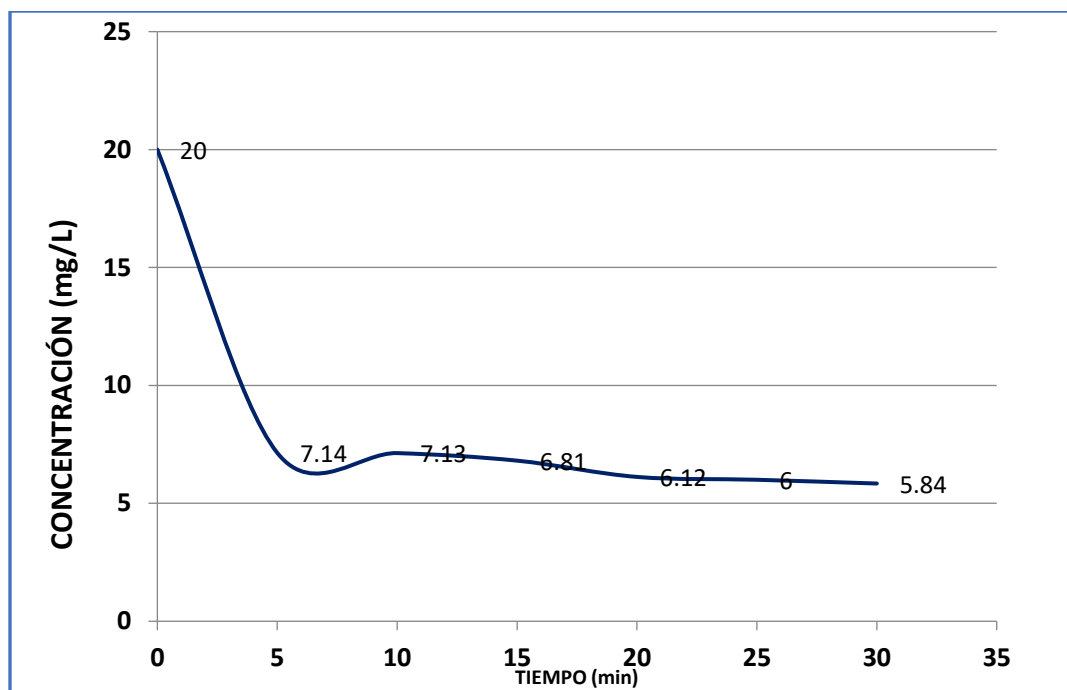


Figura. *Retención del Biofiltro con Solución de Plomo:* Resultado de la retención del biofiltro con solución de plomo a una concentración inicial de 20 mg/L

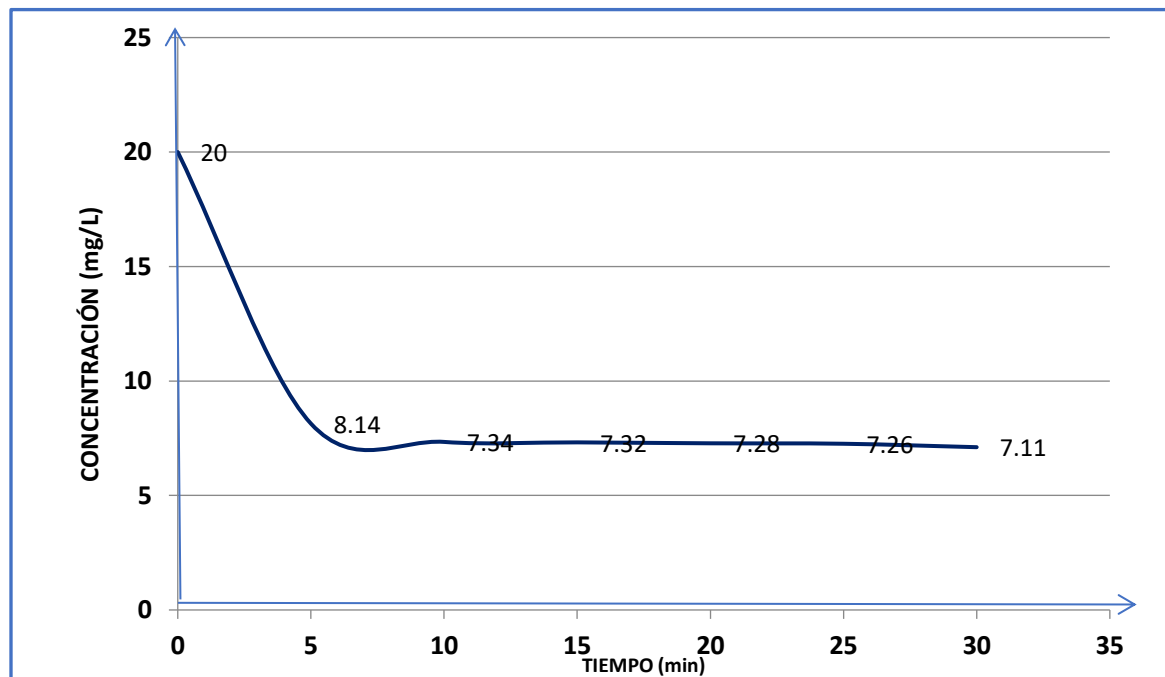


Figura. *Retención del Biofiltro con Solución de Cromo:* Resultados del biofiltro con solución de cromo a una concentración inicial de 20 mg/L

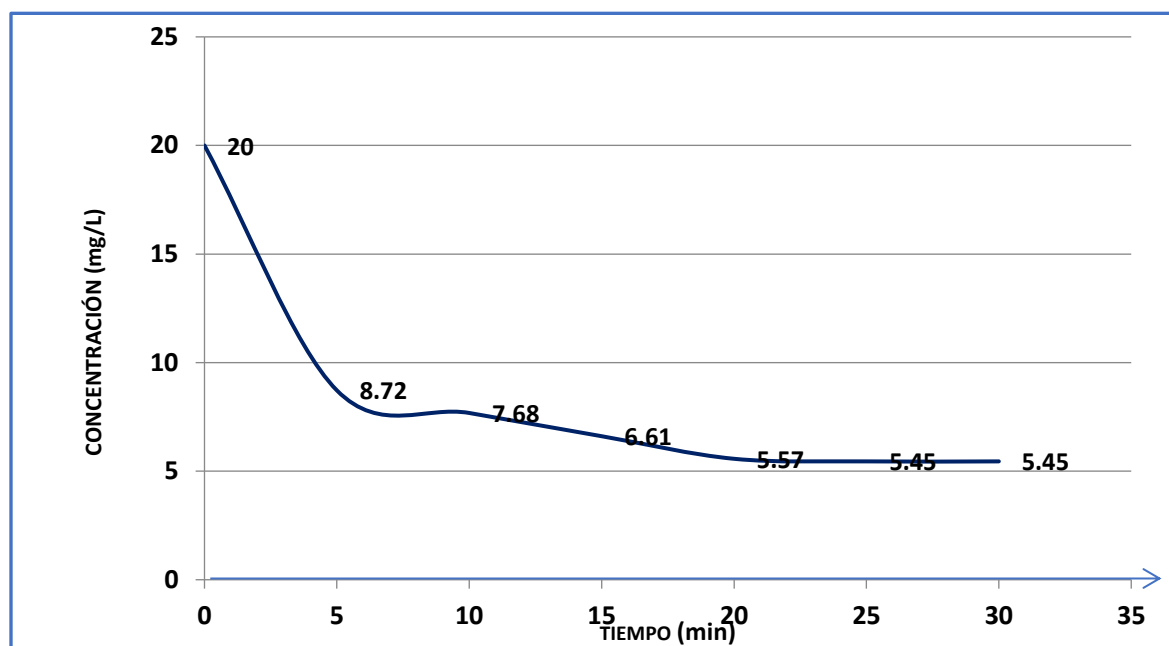


Figura. *Retención del Biofiltro con Solución de Cadmio:* Resultados del biofiltro con solución de cadmio a una concentración inicial de 20 mg/L

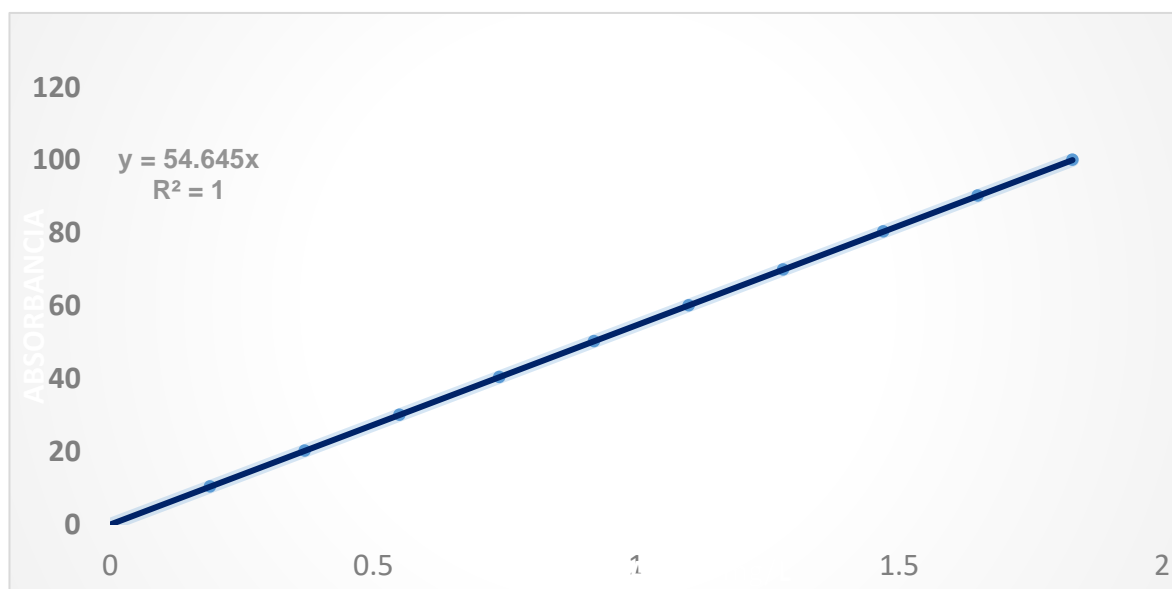
ANEXO

Curva de Calibración del Colorante Rojo 23

Tabla 7

Curva de Calibración

ppm	Absorbancia	Concentración (mg/L)
0	0	
10	0.19	10.382
20	0.37	20.218
30	0.55	30.054
40	0.74	40.437
50	0.92	50.273
60	1.1	60.109
70	1.28	69.945
80	1.47	80.327
90	1.65	90.163
100	1.83	100.00

**Figura.** Gráfica de la Curva de Calibración