

UNIVERSIDAD NACIONAL “SAN LUIS GONZAGA”
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**“BIORREMEDIACIÓN DE COLORANTES
TRIFENILMETANOS Y AZOICO POR HONGOS
AISLADOS DE SUELO Y RESTOS VEGETALES.
ICA”**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

BIÓLOGO

PRESENTADO POR:

BACH. RAMOS SIVIPAUCAR, Arlyne Beatriz

ICA – PERÚ

2019

DEDICATORIA:

A Dios por darme vida cada día y la oportunidad de seguir avanzando profesionalmente, a mis padres Beatriz y Alfredo, y a mis hermanos que siempre me apoyaron y nunca me dejaron sola en este largo camino. Ellos son y seguirán siendo mi inspiración para salir adelante, gracias a ellos pude terminar mi carrera de la cual estoy muy satisfecha. A mi enamorado y a mis amigos, quienes me apoyaron y alentaron para continuar, cuando parecía que me iba rendir. A todos los que me apoyaron para escribir y concluir esta Tesis.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores, en especial a la Mblga. Marianella Salinas y al Dr. Felipe Surco, por haber aceptado dirigir mi tesis, por su apoyo incondicional, confianza y paciencia en todo tiempo, muchas gracias.

Al profesor Dr. Walter Ramos, por su apoyo y asesoramiento en la parte estadística para la culminación del presente estudio.

Al laboratorio de la Dirección Ejecutiva de Salud Ambiental, por brindarme un espacio para poder ejecutar mí proyecto de investigación, en especial a la Blga. María Ofelia Fernández por su apoyo profesional y moral.

Al Centro de Investigación, Capacitación y Asesoría, dirigido por el Blgo. Luis Cartagena Siguas por brindarme un espacio para poder culminar la presente tesis.

Al Instituto Nacional de Salud, por realizar la identificación y confirmación de las cepas de hongos de suelo y restos vegetales encontradas en el presente trabajo.

A mi familia por su infinito amor y paciencia, que queda impregnada su afecto y detalles hacia mi persona. En especial a mis abuelos Rafael Ramos y Melchora Checco, por su confianza en sacar adelante la presente investigación.

A mis compañeros y amigos de toda la carrera por su apoyo moral durante la etapa del proyecto de investigación.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iv
<u>CONTENIDO</u>	
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	4
III. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1. Materiales.....	10
3.2. Métodos.....	10
IV. RESULTADOS.....	17
V. DISCUSIÓN.....	34
VI. CONCLUSIONES.....	40
VII. RECOMENDACIONES.....	42
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
IX. ANEXOS.....	51

RESUMEN

Los colorantes trifenilmetanos y azoico pueden ocasionar deterioro ambiental cuando son vertidos en agua y suelo; en la naturaleza existen ciertos tipos de hongos que tienen la capacidad de decolorar a estos colorantes por su actividad metabólica, por lo tanto, el presente trabajo tuvo como objetivo demostrar la biorremediación en estos colorantes a partir de hongos aislados de suelo y restos vegetales.

De los hongos aislados se seleccionaron a los que tuvieron capacidad decolorativa en los colorantes verde de malaquita, cristal violeta, safranina y fucsina a una concentración de 50 ppm, y luego se identificaron utilizando claves taxonómicas. La evaluación se realizó en estos colorantes en las concentraciones de 50, 100, 200 y 1000 ppm de manera cualitativa (medio sólido) y cuantitativa (medio líquido) para determinar el porcentaje de decoloración; asimismo, se realizó el bioensayo en las semillas de *Lactuca sativa* L. "lechuga" para determinar el porcentaje de germinación.

Se identificaron 10 cepas con capacidad decolorativa, *A. niger*, *A. alternata*, *P. chrysogenum*, *A. nidulans*, Hialofomiceto, *Nigrospora sp.*, *Oideodendron sp.*, *P. expansum* y *A. flavus* (1 y 2), los que tuvieron mejores resultados fueron Hialofomiceto y *A. alternata* en verde de malaquita, Hialofomiceto y *A. alternata* en cristal violeta, *Nigrospora sp.* y *P. expansum* en safranina y en fucsina *P. chrysogenum* y *A. alternata*, estos mismos tuvieron la capacidad de decolorar los 4 colorantes antes mencionados; asimismo, se evidenció germinación en las semillas de lechuga en los 4 colorantes tratados por *P. chrysogenum*.

Se concluye que los hongos aislados tienen capacidad decolorativa y que *P. chrysogenum* fue el que dio mejores resultados.

Palabras claves: Hongos, trifenilmetanos, azoico y biorremediación.

Abstract

Triphenylmethane and azo dyes can cause environmental problems when they are poured into water and soil; In nature there are certain types of fungi that have the ability to discolor these dyes by their metabolic activity, therefore, the present work aimed to demonstrate bioremediation in these dyes from fungi isolated from soil and plant debris.

Of the isolated fungi, those with decolorative capacity in the malachite green, violet crystal, safranine and fuchsin dyes at a concentration of 50 ppm were selected, and then identified using taxonomic keys. The evaluation was carried out on these dyes in the concentrations of 50, 100, 200 and 1000 ppm qualitatively (solid medium) and quantitative (liquid medium) to determine the percentage of discoloration; also, the bioassay was carried out on the seeds of *Lactuca sativa* L. "lettuce" to determine the germination percentage.

Ten strains with decolorative capacity were identified, *A. niger*, *A. alternata*, *P. chrysogenum*, *A. nidulans*, Hyalofomycete, *Nigrospora sp.*, *Oideodendron sp.*, *P. expansum* and *A. flavus* (1 and 2), which had best results were Hyalofomycete and *A. alternata* in malachite green, Hyalofomycete and *A. alternata* in violet crystal, *Nigrospora sp.* and *P. expansum* in safranine and in fuchsin *P. chrysogenum* and *A. alternata*, these had the ability to discolor the 4 dyes mentioned above; Likewise, germination in lettuce seeds was evident in the 4 dyes treated by *P. chrysogenum*.

It is concluded that the isolated fungi have decolorative capacity and that *P. chrysogenum* was the one that gave the best results.

Keywords: Fungi, triphenylmethane, azoic and bioremediation.

I. INTRODUCCIÓN

Los hongos son microorganismos eucarióticos, heterótrofos y cosmopolitas, que pueden desarrollarse en los sustratos más variados, la mayoría viven libres en el suelo o en el agua y su nutrición la efectúan mediante la secreción de exoenzimas donde digieren la materia orgánica; dentro de sus principales funciones en la naturaleza se encuentra la degradación de materia orgánica y de esa manera obtienen su energía por fermentación de materiales orgánicos solubles presentes en estos ambientes¹. Los hongos poseen la capacidad de degradar compuestos aromáticos complejos mediante su metabolismo natural, es por eso, que están siendo usados en la degradación de diversos compuestos xenobióticos, incluyendo los colorantes sintéticos utilizados en la industria². Algunas especies de bacterias y hongos han sido reportadas por su capacidad de remover colorantes; se puede lograr la eliminación del color mediante la bioabsorción usando células de hongos^{3,4,5}. En algunos casos, el mecanismo de decoloración implica un proceso de degradación enzimática^{6,7}, algunos microorganismos han desarrollado sistemas enzimáticos para la decoloración de colorantes azoicos⁸; como es el caso de los hongos que tienen la capacidad de reducir los colorantes azoicos mediante la formación de sus enzimas, tales como las peroxidasas y fenol oxidasas.

Las enzimas extracelulares como las lacasas y peroxidasas generalmente se producen por hongos cuya función natural es de degradar la lignina, el uso de lacasas y peroxidasas para la degradación de compuestos xenobióticos resulta muy prometedor⁹.

Más de diez mil diferentes tipos de pigmentos y colorantes sintéticos son usados en diferentes industrias como la textil, papelera, cosmética y farmacéutica, entre otras⁹. Algunos de los colorantes se pueden clasificar según su composición química como son los azos y trifenilmetanos.

Los colorantes trifenilmetanos son sintéticos, de color brillante, de alta resistencia y relativamente baratos¹⁰; dentro de ellos se encuentran los colorantes; verde de malaquita (diaminotrifenilmetano N-metilado) usado ampliamente en la industria textil, como fungicida y antiséptico en cultivos de peces¹¹; también se ha demostrado su alta toxicidad para bacterias y células de mamíferos¹², cristal violeta (N, N, N', N', N'', N'' hexametilpararosanilina) es usado ampliamente en medicina humana, veterinaria y como un tinte biológico y textil¹³, así también este colorante es responsable del crecimiento de tumores en algunos peces¹⁴; el colorante artificial fucsina básica es usado para teñir el núcleo celular y en el diagnóstico de tuberculosis, se sospecha que provoca cáncer y es tóxico para los organismos acuáticos¹⁵.

Los colorantes azoicos se caracterizan porque parte de la molécula que proporciona la característica de color (grupo cromóforo) es el grupo azo, el cuál consta de dos átomos de nitrógeno unidos por un doble enlace ($N = N$) y estos a su vez están unidos a grupos alifáticos o aromáticos, dentro de ellos se encuentra safranina; usado comúnmente para teñir tejidos biológicos, sirve para la identificación de procesos degenerativos como la osteoartritis y se ha reportado que este tipo de colorante puede ser cancerígeno al ser ingerido por los mamíferos y tóxico para algunas cepas bacterianas^{16,17}.

En la actualidad el incremento en el número de industrias textiles ha causado gran impacto a nivel ambiental, ya que a partir de los procesos que llevan a cabo las empresas generan residuos químicos en altas concentraciones ocasionando contaminación en cuerpos de agua, suelo, aire y causando efectos adversos en la naturaleza y en el ser humano¹⁰. Incluso en concentraciones muy pequeñas (menos de 1 ppm para algunos colorantes) la presencia de colorantes es altamente visible en el agua¹⁸; alterando el paisajismo ya que con su presencia disminuye la

penetración de luz solar retardando la fotosíntesis e inhibiendo el crecimiento de la biota acuática como también interfiriendo con la solubilidad de gases¹⁹.

Anualmente se producen aproximadamente 1 millón de toneladas de colorantes inorgánicos, donde las industrias textiles utiliza la mitad de estos, provocando contaminación ambiental siendo eso un problema silencioso y perturbador a nivel mundial²⁰. Hoy en día existen diversas estrategias para minimizar los efectos negativos de este tipo de compuestos contaminantes; se pueden nombrar procesos físicos y químicos como la adsorción, floculación, oxidación, reducción, etc.; estos métodos han mostrado ser efectivos, pero son poco rentables económicamente²¹; es por eso que se ha buscado un proceso biológico ya que puede ser una solución barata y una opción para el tratamiento de efluentes contaminados.

Debido al problema de contaminación que generan los colorantes industriales cuando son vertidos al medio ambiente ocasionando impacto ambiental y daño a la salud pública se ha buscado una alternativa biológica para este problema, por lo tanto; el presente estudio tuvo como objetivo demostrar que los hongos aislados de suelo y restos vegetales tienen la capacidad de biorremediar a los colorantes trifenilmetanos y azoico.

II. ANTECEDENTES

A nivel internacional:

- **Falcón et al. (1995)** ⁽²²⁾, en España, determinaron que de 44 hongos aislados de suelo ferralítico y fersialítico, *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium oxysporum*, *Pestalotia oxyanthi* y *Fusarium solani* tuvieron capacidad decolorativa sobre el colorante polimérico Poly R-478.
- **Ali et al. (2009)** ⁽²³⁾, en Pakistán, demostraron que *Aspergillus flavus* y *Alternaria solani* fueron capaces de decolorar el colorante verde de malaquita en la concentración de 50 µM con un porcentaje de 97,43% y 96,91% respectivamente en 6 días. En el estudio espectral de *A. flavus* el pico original desapareció por completo y apareció otro pico nuevo a 387 nm lo que demuestra que el mecanismo de decoloración fue por biodegradación, mientras que en *A. solani* se registró 352, 617 y 618 nm donde se puede deducir que el mecanismo de decoloración fue por biodegradación y biosorción.
- **Cardona et al. (2009)** ⁽²⁴⁾, en Colombia, evaluaron la capacidad decolorativa de los hongos *P. chrysosporium* y *P. sordida* sobre los colorantes industriales rojo erionil, azul terasil, rojo cibacrón y turquesa erionil; donde mostraron halos de decoloración en las placas Petri a una velocidad entre 2 y 2.5 cm. d⁻¹. En medio líquido el porcentaje de decoloración de la mezcla de los colorantes fue un 86% para *P. chrysosporium* y 82% para *P. sordida*.

- **Lalitha et al. (2011)** ⁽²⁵⁾, en la India, lograron aislar el hongo *Aspergillus flavus* a partir de una muestra de agua recolectada en la bahía de Bengala, que fue capaz de lograr una reducción de 80% a 90% en los colorantes sintéticos como el cristal violeta, verde de malaquita, azul de metileno y safranina a una concentración de 100 ppm en un periodo de 3 a 7 días.
- **Chanagá et al. (2012)** ⁽²⁶⁾, en Colombia, pudieron confirmar mediante pruebas moleculares RAPD que las cepas que estudiaron tienen características que los hacen potenciales biodegradadores de colorantes industriales tales como el género *Leptophaerulina*, encontraron que esta cepa LNV6 presentó una alta actividad de enzimas ligninolíticas. Las especies LVN49 y LVN72 pertenecientes al género *Trichoderma* se registraron como decoloradoras de tintes industriales. Por otra parte, el aislamiento LVN93 se identificó morfológicamente como *A. niger*, por último, determinaron que los hongos mencionados tienen potencial para su utilización como agentes de biorremediación de efluentes de industrias textiles del Valle de Aburrá y de cuerpos de agua contaminados con tintes industriales de diferente naturaleza química.
- **Salas et al. (2012)** ⁽²¹⁾, en Bolivia, evaluaron la capacidad decolorativa de los hongos *C. polizona*, *Pycnoporus sp.* y *Penicillium sp.* sobre el colorante BLAK-5 a diferentes concentraciones (50, 100, 200 y 1000 ppm). Evidenciaron que la cepa *C. polizona* mostró un 100% de decoloración a una concentración de 50 ppm; *Pycnoporus sp.* y *Penicillium sp.*, mostraron un 75 % de decoloración a una concentración de 50 ppm; mientras que a una concentración de 100 ppm obtuvieron un 50% de decoloración.

- **Ilyas y Rehman. (2013)** ⁽²⁷⁾, en Pakistán, demostraron que *Aspergillus niger* y *Nigrospora sp* fueron capaces de decolorar el colorante azoico rojo Synozol HF-6BN en metabolitos, y que estos metabolitos degradados por los hongos no son tóxicos para la microflora beneficiosa para el suelo ni para el crecimiento de la planta *Vigna radiata*. Determinaron que *A. niger* y *Nigrospora sp.*, tuvieron un porcentaje de decoloración de 88% y 96% respectivamente en el colorante azoico después de 24 días de incubación; y que no hubo ninguna zona de inhibición de crecimiento de la microflora en las placas de agar y el crecimiento de la planta *Vigna radiata* en presencia de la muestra extraída del tinte fue satisfactoria.
- **Kuhar et al. (2013)** ⁽²⁸⁾, en Argentina, lograron identificar a los hongos aislados del bosque andino patagónico que fueron *Agaricus bitorquis* (cepa F011), *Armillaria sp.* (F012), *Phellinus andino-patagonicus* (F013), *Fistulina antártica* (F014), *Gymnopilus spectabilis* (F015) y un hongo de familia de las bolbitiaceas (F016); de los cuales bolbitiacea, *A. bitorquis*, *G. spectabilis* y la cepa *G. applanatum* obtuvieron decoloración al menos en uno de los colorantes verde de malaquita y cristal violeta. Observaron al hongo *Agaricus bitorquis* con un halo de decoloración en cristal violeta mucho mayor que el de su crecimiento, también evidenciaron en su aislamiento una altísima capacidad de degradación en ambos colorantes trifenilmetanos, reflejándose una rápida decoloración en la placa luego de 5 días de crecimiento; además exhibe una mayor actividad en la enzima lacasa que los demás aislamientos (68.7 mUEg-1 sin VM y 52,6 mUEg-1 con VM), mientras que en el aislamiento del hongo de la familia bolbitiaceas mostró actividad lacasa (7,7 mUEg-1 sin VM y 10,9 mUEg-1 con VM).

- **Shahid et al. (2013)** ⁽²⁹⁾, en la India, aislaron 56 hongos de suelo, de los cuales seleccionaron 3 de ellos (*A. niger*, *F oxysporum* y *T. lignorum*) después de un análisis exhaustivo de biodegradación de los tintes textiles (rojo congo, cristal violeta y azul de metileno). En medio líquido y bajo condiciones estacionarias el porcentaje de degradación que demostraron los hongos *Aspergillus niger* fue 74.07% en el rojo congo, 33.82% en el cristal violeta y 22.44% en azul de metileno; *Fusarium oxysporum* 78.9% en el rojo congo, 53.4% en cristal violeta y 48.5% en azul de metileno, mientras que en *Trichoderma lignorum* fue 35.25% en rojo congo, 92.7% en cristal violeta y 48.3% en azul de metileno.
- **Rani et al. (2014)** ⁽³⁰⁾, en la India, evaluaron la biodegradación del colorante verde malaquita, nigrosin y fucsina básica, aislando hongos de sitios de efluentes contaminados con colorantes que fueron *Aspergillus niger* y *Phanerochaete chrysosporium*, utilizando el método de recubrimiento de tubo y medios líquidos incubándose bajo agitación y condiciones estacionarias. En medio líquido bajo agitación *A. niger* mostró un 81.85% de decoloración en el colorante fucsina básica, 77.47% en nigrosin, 72.77% en verde malaquita y por la mezcla de colorantes un 33.08%, mientras que el hongo *P. chrysosporium* mostró un 90.15% de decoloración el colorante nigrosin, 89.8% en fucsina básica, 83.25% en verde malaquita y por la mezcla de colorantes un 68.4%. A través del bioensayo de germinación de las semillas de trigo después de 4 días de incubación los colorantes no tratados inhibieron la germinación de las semillas, mientras que en los colorantes tratados después de 48h se observó germinación en las semillas.

- **Rojas y Hormaza. (2016)** ⁽³¹⁾, en Colombia, evaluaron la capacidad de biodegradación del colorante azul brillante utilizando hongos de la podredumbre blanca como *P. osteatrus*, *P. pulmonaris* y *T. versicolor*. Observaron desaparición total del colorante con las tres cepas fúngicas presentando halos de decoloración a una concentración de 100 ppm suplementado con glucosa, en cambio en el medio sin glucosa se observó crecimiento del hongo sin percepción visual de decoloración. Mediante la fermentación en estado sólido *T. versicolor* mostró una diferencia significativa con un promedio de 53%; los 2 hongos del género *Pleurotus sp.* mantuvieron promedios semejantes y valores de decoloración superiores al 80%.
- **Ali et al. (2016)** ⁽³²⁾, en Egipto, aislaron a *Aspergillus niger* a partir de una solución de tinte residual para determinar su capacidad de decolorar el colorante cristal violeta, en donde obtuvieron que *A. niger* logró un porcentaje de degradación de 84.6% a una concentración de 40 ppm; sin embargo, a 50 ppm el crecimiento fúngico de *A. niger* se inhibió fuertemente después de 10 días de incubación.
- **Kivanc y Dogruer. (2017)** ⁽³³⁾, en Turquía, demostraron que los microorganismos *Fusarium sp.*, *Penicillium expansum*, *P. citreo-viride*, *Aspergillus flavipes*, *Trichoderma harzianum* y *Paecilomyces variotii* aislados de la corriente de Porsuk fueron capaces de decolorar los colorantes Xiron naranja RHD (FW) y escarlata tobactive P2R (Kimsa) provenientes del suelo y aguas residuales de una fábrica textil, produciendo zonas claras alrededor de sus colonias en las placas con agar.

- **Srinu et al. (2017)** ⁽³⁴⁾, en la India, aislaron 2 cepas de *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus tamari* alrededor de los efluentes de las industrias textiles; los cuales tuvieron la capacidad de decoloración en los colorantes Azul remazol brillante-R (RBBR), Azul brillante-R (BBR) y Azul ácido-25 (AB-25). *A. fumigatus* mostró un porcentaje de decoloración máximo con AB-25 (86.3%) y un porcentaje mínimo con RBBR (64.7%); mientras que *A. tamari* mostró un porcentaje de decoloración máximo con RBBR (78.3%) y un porcentaje mínimo con BBR (46.3%).

- **Ranjitha et al. (2018)** ⁽³⁵⁾, en la India, evaluaron la efectividad de degradación y decoloración que tiene *Aspergillus niger* frente a los colorantes verde de malaquita, nigrosin y fucsina básica en medio líquido bajo condiciones estáticas. La decoloración más alta se observó en fucsina básica con un 80.15%, siguiéndole nigrosin con un 57.47%, verde de malaquita con 52.34% y por último la mezcla de los tres colorantes con un 30.66%.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales.

3.1.1. Material biológico:

El material biológico está constituido por muestras aisladas de suelo y restos vegetales procedentes de los campos experimentales de la Facultad de Ciencias Biológicas, UNICA. (Ver anexo, Figura. 06 – A y B).

3.1.2. Colorantes:

Los colorantes trifenilmetanos que se utilizaron fueron el cristal violeta ($\text{CH}_{25}\text{H}_{30}\text{ClN}_3$), de peso molecular de 407.99 g/mol, verde de malaquita ($\text{C}_{52}\text{H}_{54}\text{N}_4\text{O}_{12}$), de peso molecular 927.02 g/mol y fucsina básica ($\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{ClN}_3$), de peso molecular 337.85 g/mol; y el colorante azoico que se utilizó fue la safranina ($\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{ClN}_4$), de peso molecular 350.84 g/mol.

3.2. Métodos

3.2.1. Toma de muestra

Con la ayuda de una pala de mano se tomó una porción de suelo cerca de las raíces y restos vegetales, aproximadamente 250 g por separado y se colocó en una bolsa ziploc (Ver anexo, Figura. 07). Las muestras fueron trasladadas al laboratorio y procesadas en el menor tiempo posible.

3.2.2. Procesamiento de la muestra.

3.2.2.1. Aislamientos de hongos ambientales.

Se pesaron 10 g de las muestras de suelo y restos vegetales las cuales fueron colocadas en frascos conteniendo 90 mL de SSF 0,85%

obteniéndose una dilución 10^{-1} luego se homogenizaron dejándose en reposo por 30 minutos y se procedió a realizar diluciones hasta la dilución 10^{-2} . De las respectivas diluciones se sembraron por superficie 0,1 mL en placas petri con PDA más antibiótico y se llevó a incubar a temperatura ambiente por 3 a 5 días. Las colonias de hongos que se aislaron eran diferentes macroscópicamente, se sembraron por puntura en placas con agar papa dextrosa y se llevaron a incubar a temperatura ambiente por 3 a 5 días, para mantener su viabilidad se subcultivaron periódicamente en tubos inclinados con agar papa dextrosa a 4°C (Ver anexo, Figura. 07).

3.2.3. Selección de hongos aislados de suelo y restos vegetales con capacidad decolorativa en los colorantes trifenilmetanos y azoico.

Una vez aislados los hongos ambientales se evaluaron en placas con agar PDA, adicionando los colorantes trifenilmetanos y azoico (verde de malaquita, cristal violeta, fucsina básica y safranina respectivamente) a una concentración de 50 ppm. Para evaluar este ensayo con ayuda de un sacabocado se tomó 1 disco de 1 cm de diámetro del borde del crecimiento de los hongos aislados y con pinzas estériles se colocaron en placas con agar PDA más los colorantes en evaluación, luego se llevó a incubar a temperatura ambiente durante 14 días. Este ensayo se realizó para seleccionar solo a los hongos que tuvieron capacidad decolorativa (Ver anexo, Figura. 08). Posteriormente se realizaron experimentos similares cultivándose en placas Petri sobre medios conteniendo los colorantes individuales (cristal violeta, verde de

malaquita, fucsina básica y safranina) a diferentes concentraciones 50,100, 200 y 1000 ppm.

3.2.4. Identificación de las cepas de hongos ambientales con capacidad decolorativa.

3.2.4.1. Observación macroscópica.

Se observaron las características macroscópicas como, forma, tamaño, color en el lado adverso y reverso, pigmentación, textura, aspecto, superficie, etc. (Ver anexo, Figura. 09)

3.2.4.2. Observación microscópica -Técnica de microcultivo.

Se empleó la técnica de microcultivo para una mejor identificación microscópica en las colonias. La metodología empleada de la técnica de microcultivo se describe a continuación³⁶:

En una caja Petri se colocó una varilla de vidrio en forma de V y sobre esta un porta objetos con un cubre objetos encima, se esterilizó el material y se preparó una caja Petri con medio selectivo (agar papa dextrosa) aproximadamente 5 mm de espesor, el medio se cortó en cubos de 10 mm con un bisturí estéril, luego se colocó una pequeña porción del hongo en el centro del cubo y se colocó en el cubre objetos, posteriormente se le colocó algodón húmedo estéril en la placa Petri, teniendo cuidado de no mojar el cultivo, se incubó durante 5 días a T° ambiente. Pasando los 5 días, se retiró el cubreobjeto y se colocó en un portaobjeto limpio en el que previamente se había depositado azul de lactofenol y se hicieron observaciones al microscopio utilizando el objetivo 40X. Luego se realizó el reconocimiento de estructura fúngica

como: hifas, micelio, conidióforos, esporangióforos, macroconidias, microconidias y esporas. Se utilizaron las claves de identificación para el reconocimiento de género o especie de las colonias^{37,38,39} (Ver anexo, Figura. 09).

3.2.4.3. Confirmación de las cepas.

La confirmación de las cepas se realizó con la ayuda del Instituto Nacional de Salud (INS). (Ver anexo 03.)

3.2.5. Determinación cualitativa de la decoloración en los colorantes trifenilmetanos y azoico.

3.2.5.1. Determinación de los grados de decoloración.

Los hongos que fueron previamente sembradas en agar PDA e incubados a T° ambiente por 5 días, ayuda de un sacabocado se tomó un disco de micelio de 1 cm de diámetro el cuál se colocó en la placa Petri que contenía agar PDA suplementado con los colorantes verde de malaquita, cristal violeta, safranina y fucsina en las concentraciones 50, 100, 200 y 1000 ppm, luego se llevó a incubar a T° ambiente por 14 días (Ver anexo, Figura. 10), en el cual se observó los grados de decoloración según la siguiente tabla de acuerdo a Salas y col. 2012.

Decoloración cualitativa para observar los grados de decoloración²¹.

*Presentó crecimiento de micelios superficial.

++++: 100% de placa decolorada.

+++ -: 75% de placa decolorada.

++ - - : 50% de placa decolorada.

+ - - - : 25% de placa decolorada.

- - - - : 0% de placa decolorada.

3.2.6. Determinación cuantitativa de la decoloración en los colorantes trifenilmetanos y azoico.

3.2.6.1 Determinación del porcentaje de decoloración.

Los hongos que fueron previamente sembrados en agar PDA e incubados a T° ambiente por 5 días, con ayuda de un sacabocado se tomó 4 discos de 1 cm de diámetro, los cuales fueron colocados en frascos conteniendo 100 mL de caldo papa dextrosa suplementado con los diferentes colorantes ensayados a las concentraciones de 50, 100, 200 y 1000 ppm, luego se llevaron a incubar por 14 días a T° ambiente²⁴.

Luego del periodo de incubación se tomó 100 mL de las muestras ensayadas y se filtró con papel de filtro³⁰; se colocó 5 mL de muestra filtrada en tubos de ensayo y se centrifugó a 4000 *rpm* por 10 min. Para determinar la decoloración en el tratamiento de los colorantes verde de malaquita, cristal violeta, fucsina básica y safranina se leyó la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro Spectrophotometer UNICO Model 2100⁷ a una longitud de onda de 620 nm, 590 nm, 550 nm y 530 nm respectivamente (Ver anexo, Figura. 11). Como blanco de lectura se utilizó el medio de cultivo caldo de papa dextrosa (24g/l) sin colorante²¹.

La fórmula que se empleó para determinar el porcentaje de decoloración en medio líquido es:

$$\text{Pdd (\%)} = \frac{(A_i - A_f)}{A_i} \times 100$$

Dónde:

Pdd (%) es el porcentaje de decoloración, A es el valor de absorbancia y los subíndices i y f son el tiempo inicial y final del tratamiento respectivamente²⁴.

Para determinar la decoloración tanto de manera cualitativa como cuantitativa en cada ensayo se realizó por duplicado; y con su control respectivo.

3.2.7. Bioensayo de germinación en semillas de *Lactuca sativa* L. var great lakes 659.

Para realizar el bioensayo de la germinación de semilla se utilizó semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. var great lakes 659, las cuales se desinfectaron usando solución al 0.5% de hipoclorito de sodio durante 50 s, luego se lavaron 6 a 7 veces con agua destilada estéril para eliminar los residuos de hipoclorito³⁰ (Ver anexo, Figura. 12).

Luego se colocaron 10 semillas en las placas Petri que contenían papel de filtro Whatman N°2 de 90 mm de diámetro saturado con 4 o 5 ml del medio con colorante tratado, por otro lado, se prepararon placas control una con colorante no tratado y otra con agua de caño estéril; las semillas se colocaron dejando espacio para permitir la germinación. Luego las placas se colocaron en bolsas plásticas para evitar la pérdida de humedad y se llevaron a incubar a T° ambiente durante 120 horas por duplicado⁴⁰ (Ver anexo, Figura. 12).

La fórmula que se empleó para determinar el porcentaje de germinación de las semillas es:

$$\text{PG (\%)} = \frac{\mathbf{N}_{\text{SG}}}{\mathbf{N}_{\text{ST}}} \times 100$$

Dónde:

PG (%) es el porcentaje de germinación, \mathbf{N}_{SG} es el número de semillas germinadas, \mathbf{N}_{ST} es el número total de semillas sembradas⁴¹.

IV. RESULTADOS

Se aisló un total de 24 cepas de hongos ambientales en los campos experimentales de la facultad de Ciencias Biológicas en la Universidad Nacional San Luis Gonzaga; 14 fueron de las muestras de suelo y 10 fueron de las muestras de restos vegetales.

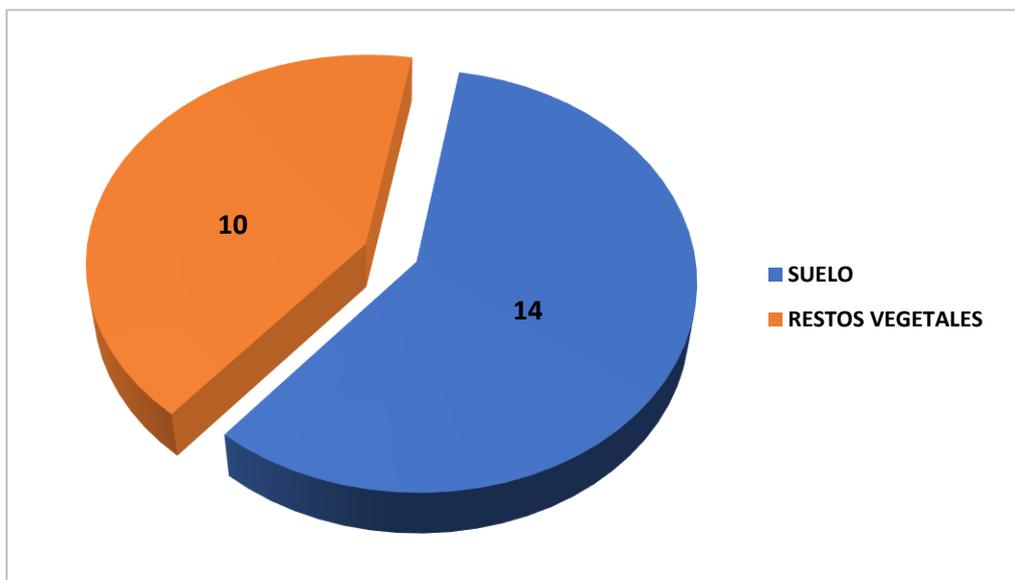


Figura. 01. Número de cepas aisladas de suelo y restos vegetales, Abril, 2018.

Para probar que las 24 cepas aisladas podían decolorar alguno de los colorantes, se realizaron ensayos de decoloración utilizando agar papa dextrosa más colorantes cristal violeta, verde de malaquita, fucsina y safranina a una concentración de 50 ppm en placas Petri (Anexo, Tabla. 12), donde se seleccionaron a 10 cepas de hongos que tuvieron la capacidad de decolorar en alguno de los colorantes. En la tabla. 01, se muestra la decoloración de las cepas S-C01, RV-C03, RV-C06, S-C07, RV-C08, RV-C12, S-C13, S-C14, S-C23 y S-C24 al menos en alguno de los colorantes trifenilmetanos y azoico, siendo estas las que se seleccionaron para los estudios superiores.

Tabla. 01. Selección de hongos aislados de suelo y restos vegetales con capacidad decolorativa a una concentración de 50 ppm.

CEPAS	Colorantes a la concentración de 50 ppm			
	Colorantes trifenilmetanos			Colorante azoico
	Verde de malaquita	Cristal violeta	Fucsina	Safranina
S-C01	X	X	-	X
RV-C03	X	X	X	X
RV-C06	X	X	X	X
S-C07	X	X	-	X
RV-C08	-	-	-	X
RV-C12	X	X	-	X
S-C13	-	-	-	X
S-C14	X	X	-	X
S-C23	X	X	-	X
S-C24	X	X	-	X

Nota:

- X : Presentó decoloración
- : No presentó decoloración
- S : Suelo
- RV : Restos vegetales
- C : Número de cepas

Se identificaron 6 géneros de hongos; (Penicillium, Aspergillus, Alternaria, Nigrospora, Hialofomiceto y Oideodendron); y 10 especies (*P. chrysogenum*, *P. expansum*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. flavus* 1, *A. flavus* 2, *A. alternata*, *Nigrospora sp.*, Hialofomiceto y *Oideodendron sp.* con capacidad decolorativa, de los cuales 6 fueron aislados de suelo (S) y 4 de restos vegetales (RV).

Tabla. 02. Géneros y especies de hongos aislados e identificados de suelo y restos vegetales con capacidad decolorativa frente a los colorantes trifenilmetanos y azoico.

GÉNEROS	CÓDIGO DE AISLAMIENTO	ESPECIES
Aspergillus	S-C01	<i>A. niger</i>
	S-C07	<i>A. nidulans</i>
	S-C23	<i>A. flavus</i> 1
	S-C24	<i>A. flavus</i> 2
Penicillium	RV-C06	<i>P. chrysogenum</i>
	S-C13	<i>P. expansum</i>
Alternaria	RV-C03	<i>A. alternata</i>
Nigrospora	RV-C08	<i>Nigrospora sp.</i>
Hialofomiceto	RV-C12	Hialofomiceto
Oidiodendron	S-C14	<i>Oidiodendron sp.</i>

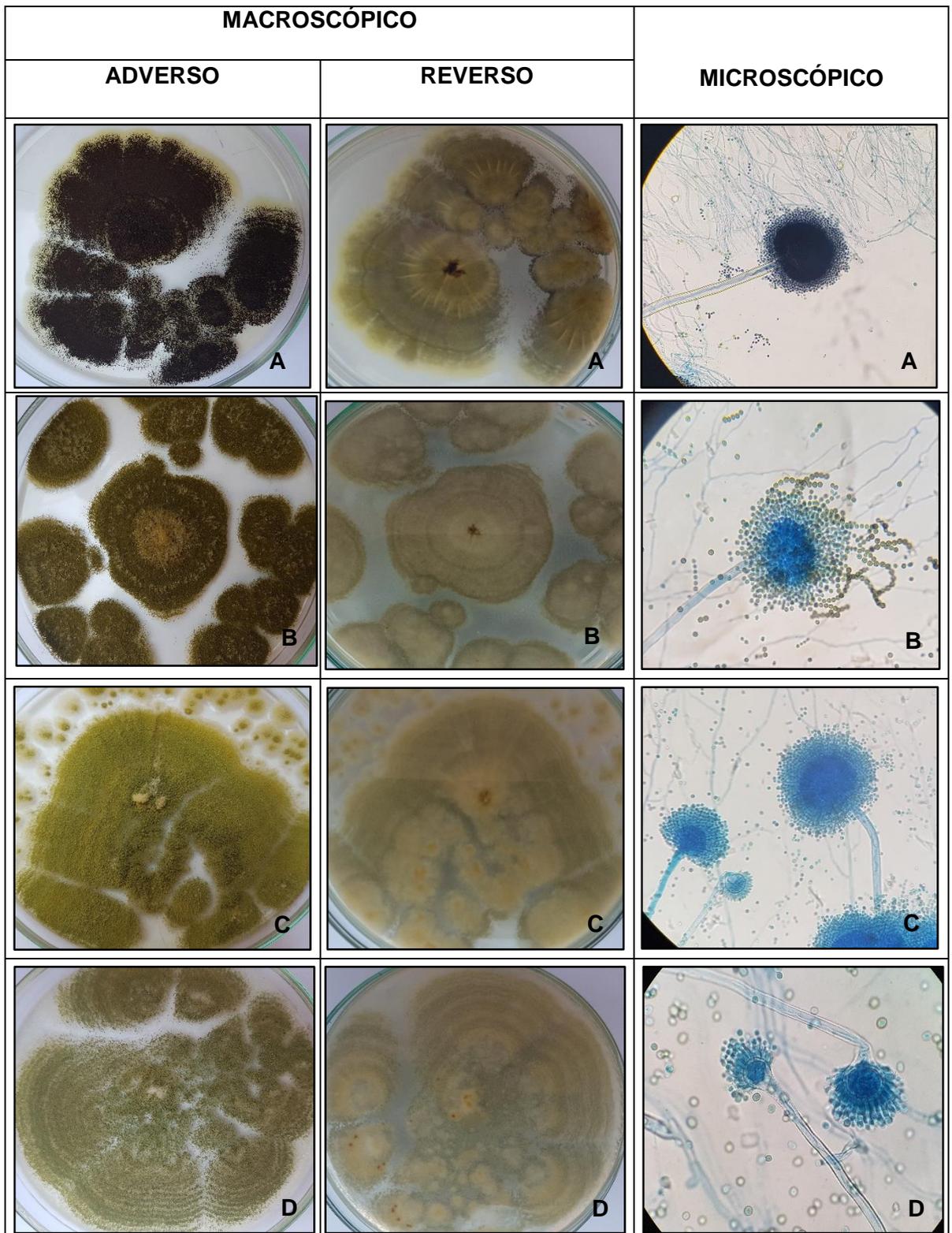


Figura. 02. Características macroscópicas y microscópicas de hongos del género *Aspergillus* con capacidad decolorativa. **A.** *A. niger*; **B.** *A. nidulans*; **C.** *A. flavus* 1; **D.** *A. flavus* 2.

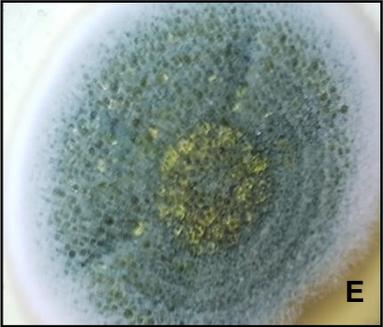
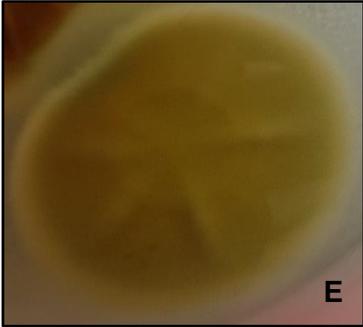
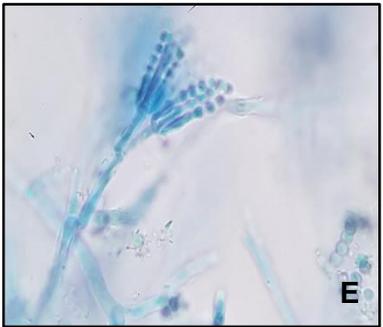
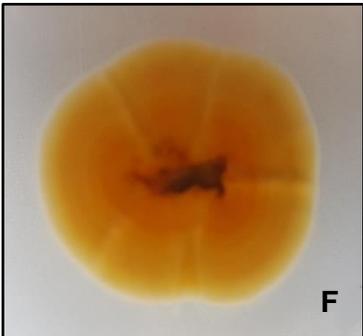
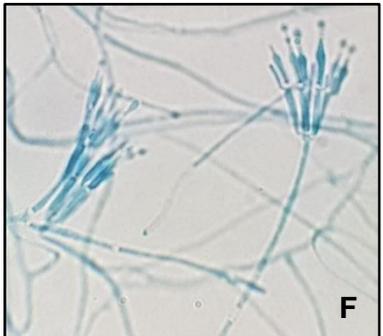
MACROSCÓPICO		MICROSCÓPICO
ADVERSO	REVERSO	
 E	 E	 E
 F	 F	 F

Figura.03. Características macroscópicas y microscópicas de hongos del género *Penicillium* con capacidad decolorativa. **E.** *Penicillium chrysogenum*; **F.** *Penicillium expansum*.

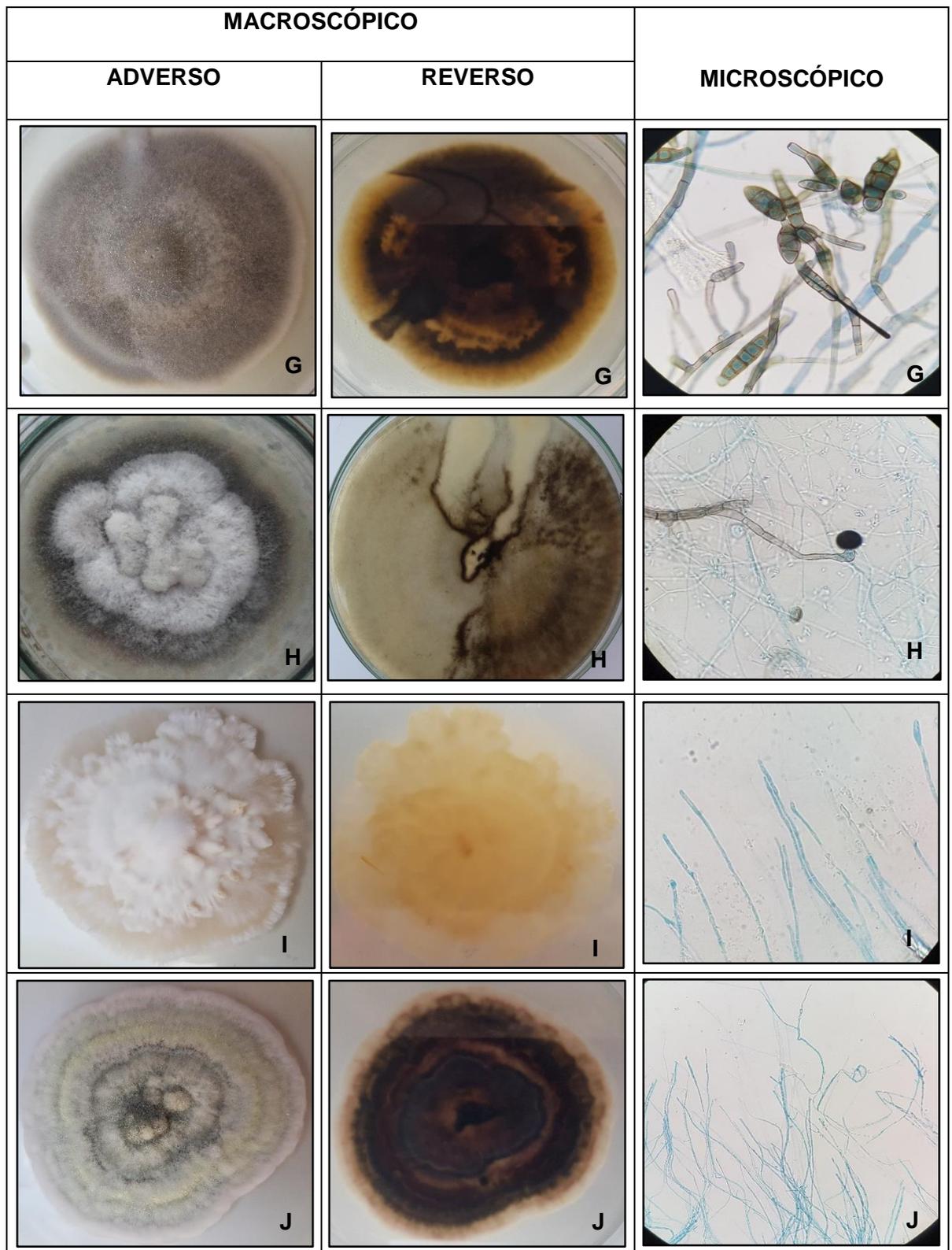


Figura. 04. Características macroscópicas y microscópicas del género *Alternaria*, *Nigrospora*, *Hialofomiceto* y *Oideodendron* con capacidad decolorativa. **G.** *A. alternata*; **H.** *Nigrospora* sp. **I.** *Hialofomiceto*; **J.** *Oideodendron* sp.

De las 8 cepas de hongos que se sembraron en el colorante verde de malaquita en medio sólido, la cepa Hialofomiceto mostró mayor decoloración obteniendo una decoloración del 100% en la concentración 50 y 100 ppm; y 75% a la concentración de 200 ppm, finalmente a 1000 ppm solo se observó crecimiento fúngico superficial más no decoloración; mientras *A. alternata* y *Oideodendron sp.*, mostraron una decoloración de 75% a la concentración de 50 ppm; una decoloración de 25% a 100 ppm, y finalmente a 200 y 1000 ppm solo se solo se observó crecimiento fúngico superficial (Ver anexo, Figura. 13).

Tabla 03. Decoloración cualitativa del colorante verde de malaquita a diferentes concentraciones por las cepas seleccionadas.

Cepa fúngica	Concentración del colorante Verde de malaquita			
	50[ppm]	100 [ppm]	200 [ppm]	1000 [ppm]
<i>A. niger</i>	++-	*---	*---	*---
<i>A. alternata</i>	+++	+--	*---	*---
<i>P. chrysogenum</i>	+++	*---	*---	*---
<i>A. nidulans</i>	+++	*---	*---	*---
Hialofomiceto	++++	++++	+++	*---
<i>Oidiodendron sp.</i>	+++	+--	*---	*---
<i>A. flavus</i> 1	++-	*---	*---	---
<i>A. flavus</i> 2	++-	*---	*---	---

Fuente: Salas y col., 2012

Nota:

*Presentó crecimiento de micelios superficial.

++++: 100% de placa decolorada.

+++ : 75% de placa decolorada.

++- : 50% de placa decolorada.

+-- : 25% de placa decolorada.

--- : 0% de placa decolorada.

En el colorante verde de malaquita en medio líquido, se observó un mayor porcentaje de decoloración en la concentración de 50 ppm con un 97.73% en *A. niger*, a 100 ppm *A. alternata* obtuvo un 93.90%; y a 200 ppm Hialofomiceto obtuvo un 25.65% de decoloración (Ver anexo, Figura. 18).

Tabla. 04. Promedio de los porcentajes de decoloración cuantitativa del colorante verde de malaquita en caldo papa dextrosa por hongos aislados de suelo y restos vegetales.

Cepa fúngica	Diferentes concentraciones del colorante verde de malaquita en ppm		
	50	100	200
<i>A. niger</i>	97.73%	—	—
<i>A. alternata</i>	95.30%	93.90%	—
<i>P. chrysogenum</i>	93.26%	—	—
<i>A. niger</i>	92.56%	—	—
Hialofomiceto	96%	35.42%	25.66%
<i>Oideodendron sp.</i>	86.13%	67%	—
<i>A. flavus 1</i>	78.13%	—	—
<i>A. flavus 2</i>	95.07%	—	—

En el colorante cristal violeta en medio sólido la cepa Hialofomiceto mostró mayor decoloración; evidenciando una decoloración de 75% en las concentraciones 50 y 100 ppm, en 200 un 25% de decoloración y a 1000 ppm no se evidenció decoloración, pero si crecimiento fúngico. Por otro lado, *Penicillium chrysogenum* mostró un 75% de decoloración en la concentración de 50 ppm, 25% de decoloración en 100 ppm; y finalmente en 200 y 1000 ppm solo se observó crecimiento fúngico superficial más no decoloración (Ver anexo, Figura. 14).

Tabla. 05. Decoloración cualitativa del colorante cristal violeta a diferentes concentraciones por las cepas seleccionadas.

Cepa fúngica	Concentración del colorante Cristal Violeta			
	50[ppm]	100 [ppm]	200 [ppm]	1000 [ppm]
<i>A. niger</i>	++--	*----	*----	*----
<i>A. alternata</i>	++--	*----	*----	*----
<i>P. chrysogenum</i>	+++-	+---	*----	*----
<i>A. nidulans</i>	+---	*----	*----	*----
Hialofomiceto	+++-	+++-	+---	*----
<i>Oideodendron sp.</i>	+---	*----	*----	*----
<i>A. flavus 1</i>	++--	*----	*----	*----
<i>A. flavus 2</i>	+---	*----	*----	*----

Fuente: Salas y col., 2012

Nota:

*Presentó crecimiento de micelios superficial.

++++: 100% de placa decolorada.

+++ -: 75% de placa decolorada.

++--: 50% de placa decolorada.

+---: 25% de placa decolorada.

----: 0% de placa decolorada.

En el colorante cristal violeta en medio líquido, se observó un porcentaje mayor de decoloración en la concentración de 50 ppm con un 96.16% por *A. alternata*, a 100 ppm *P. chrysogenum* obtuvo un 93.96% de decoloración y a 200 ppm la cepa Hialofomiceto obtuvo un porcentaje de decoloración de 0.13% (Ver anexo, Figura 19).

Tabla. 06. Promedio de los porcentajes de decoloración del colorante cristal violeta por hongos aislados de suelo y restos vegetales.

Cepa fúngica	Diferentes concentraciones del colorante cristal violeta en ppm		
	50	100	200
<i>A. niger</i>	92.32%	—	—
<i>A. alternata</i>	96.16%	—	—
<i>P. chrysogenum</i>	94.09%	93.96%	
<i>A. nidulans</i>	94.80%	—	—
Hialofomiceto	65.93%	53.35%	0.13%
<i>Oideodendron sp.</i>	64.76%	—	—
<i>A. flavus 1</i>	93.98%	—	—
<i>A. flavus 2</i>	95.64%	—	—

En el colorante safranina en medio sólido a una concentración de 50 ppm *A. alternata* y *A. nidulans* mostraron mayor decoloración con un 75% de decoloración, *A. niger*, *P. chrysogenum*, *Nigrospora sp.*, *A. flavus 1* y *A. flavus 2* mostraron un 50% de decoloración y finalmente Hialofomiceto, *P. expansum* y *Oideodendron sp.*, sólo mostraron un 25% de decoloración. En la concentración de 100 ppm todas las cepas estudiadas, excepto *A. alternata* y *Oideodendron sp.*, mostraron un 25% de decoloración; solo *Nigrospora sp.* mostró un 25% de decoloración en la concentración de 200 ppm, mientras que en la concentración de 1000 ppm ninguna cepa mostró decoloración significativa en dicho colorante (Ver anexo, Figura. 15 y 16).

Tabla. 07. Decoloración cualitativa del colorante safranina a diferentes concentraciones por las cepas seleccionadas.

Cepa fúngica	Concentración del colorante Safranina			
	50[ppm]	100 [ppm]	200 [ppm]	1000 [ppm]
<i>A. niger</i>	+++	+	*---	*---
<i>A. alternata</i>	+++	*---	*---	*---
<i>P. chrysogenum</i>	+++	+	*---	*---
<i>A. nidulans</i>	+++	+	*---	*---
<i>Nigrospora sp.</i>	+++	+	+	*---
Hialofomiceto	+	+	*---	*---
<i>P. expansum</i>	+	+	*---	*---
<i>Oidiodendron sp.</i>	+	*---	*---	*---
<i>A. flavus 1</i>	+++	+	*---	*---
<i>A. flavus 2</i>	+++	+	*---	*---

Fuente: Salas y col., 2012

Nota:

*Presentó crecimiento de micelios superficial.

++++: 100% de placa decolorada.

+++ : 75% de placa decolorada.

++ : 50% de placa decolorada.

+ : 25% de placa decolorada.

--- : 0% de placa decolorada.

En el colorante safranina en medio líquido, se observó un mayor porcentaje de decoloración en la concentración de 50 ppm con un 100% por *Oideodendron sp.*, en la concentración 100 ppm *P. expansum* obtuvo un 90.12%; y en la concentración 200 ppm *Nigrospora sp.* obtuvo un 51.80% (Ver anexo, Figura. 20).

Tabla. 08. Promedio de los porcentajes de decoloración cuantitativa del colorante safranina por hongos aislados de suelo y restos vegetales.

Cepa fúngica	Diferentes concentraciones del colorante safranina en ppm		
	50	100	200
<i>A. niger</i>	88.20%	60.21%	—
<i>A. alternata</i>	99.44%	—	—
<i>P. chrysogenum</i>	85.48%	80%	—
<i>A. nidulans</i>	52.08%	14.66%	10.21%
<i>Nigrospora sp.</i>	85.62%	66.90%	51.80%
Hialofomiceto	86.18%	68.58%	—
<i>P. expansum</i>	90.63%	90.12%	—
<i>Oideodendron sp.</i>	100%	—	—
<i>A. flavus</i> 1	59%	34.06%	—
<i>A. flavus</i> 2	64.11%	61.94%	—

Las cepas *A. alternata* y *P. chrysogenum* tuvieron la capacidad de degradar el colorante fucsina superando el 25% de degradación en las concentraciones de 50 y 100 ppm, mientras que en las concentraciones de 200 y 1000 ppm no presentaron decoloración significativa, pero si crecimiento fúngico superficialmente (Ver anexo, Figura 17).

Tabla. 09. Decoloración del colorante fucsina a diferentes concentraciones por las cepas seleccionadas.

Cepa fúngica	Concentración del colorante Fucsina básica			
	50[ppm]	100 [ppm]	200 [ppm]	1000 [ppm]
<i>A. alternata</i>	++-	+---	*----	*----
<i>P. chrysogenum</i>	+---	+---	*----	*----

Fuente: Salas y col., 2012

Nota:

*Presentó crecimiento de micelios superficial.

++++: 100% de placa decolorada.

+++ : 75% de placa decolorada.

++- : 50% de placa decolorada.

+--- : 25% de placa decolorada.

---- : 0% de placa decolorada

En medio líquido la cepa que tuvo mayor tasa de porcentaje de decoloración en el colorante fucsina fue *A. alternata* con un 90.48% y 74.49% en las concentraciones 50 y 100 ppm respectivamente (Ver anexo, Figura. 21).

Tabla. 10. Promedio de los porcentajes de decoloración cuantitativa del colorante fucsina por hongos aislados de suelo y restos vegetales.

Cepa fúngica	Diferentes concentraciones del colorante fucsina en ppm	
	50	100
<i>A. alternata</i>	90.48%	74.49%
<i>P. chrysogenum</i>	83.78%	70.68%

Se realizó la prueba estadística no paramétrica Kruskal – Wallis con el programa SPSS v23 para las absorbancias obtenidas a los 14 días de incubación. Este análisis se realizó con la finalidad de observar la existencia o no de diferencias significativas entre los porcentajes de decoloración en los colorantes verde malaquita, cristal violeta y safranina, encontrándose que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los porcentajes, por lo que la significancia dio como resultado $>0,05$ (Ver Anexo 02).

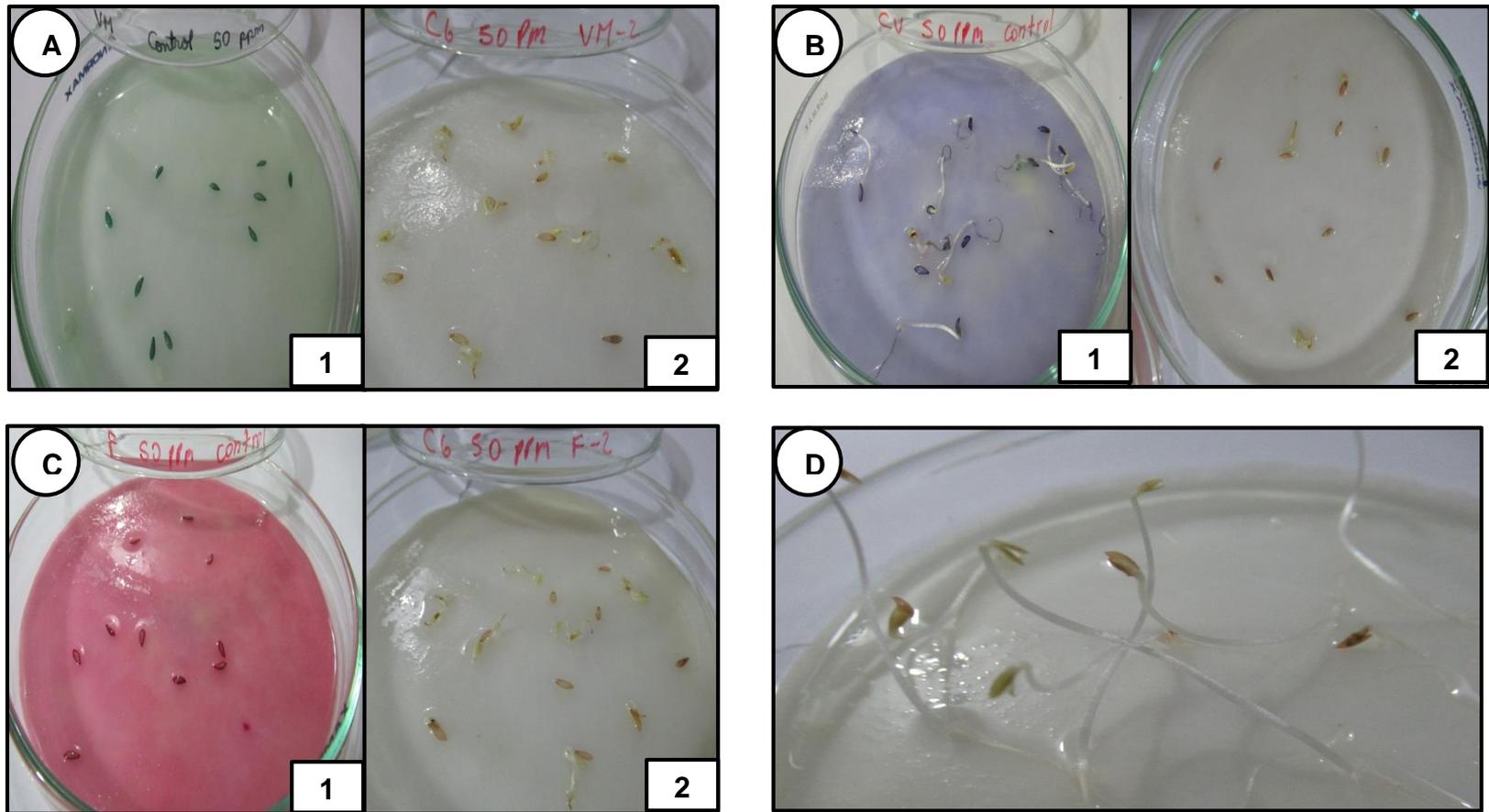


Figura. 05. Germinación en semillas de *Lactuca sativa* L. var. great lakes. 659 en los colorantes tratados por *P. chrysogenum* a 50 ppm. **A.** Germinación de semillas en verde de malaquita; **B.** Germinación de semillas en cristal violeta; **C.** Germinación de semillas en fucsina y **D.** Germinación de semillas en agua de caño estéril (control blanco). **1.** Colorante no tratado (control) y **2.** Colorante tratado.

Tabla. 11. Porcentaje promedio de la germinación de las semillas de *Lactuca sativa* L. var. great lakes 659 en los colorantes trifenilmetanos y azoico tratado por las cepas fúngicas.

Cepa fúngica	Colorantes en las concentraciones de 50 y 100 ppm							
	Colorantes trifenilmetanos						Colorante azoico	
	Verde de malaquita		Cristal violeta		Fucsina		Safranina	
	50 [ppm]	100 [ppm]	50 [ppm]	100 [ppm]	50 [ppm]	100 [ppm]	50 [ppm]	100 [ppm]
<i>A. niger</i>	50%	–	0%	–	–	–	35%	35%
<i>A. alternata</i>	0%	0%	0%	–	90%	90%	40%	–
<i>P. chrysogenum</i>	95%	–	75%	30%	90%	90%	10%	10%
<i>A. nidulans</i>	0%	–	0%	–	–	–	0%	0%
<i>Nigrospora sp.</i>	–	–	–	–	–	–	5%	0%
<i>Hialofomiceto</i>	70%	0%	45%	30%	–	–	0%	0%
<i>P. expansum</i>	–	–	–	–	–	–	70%	60%
<i>Oideodendron sp.</i>	50%	0%	0%	–	–	–	20%	–
<i>A. flavus 1</i>	0%	–	15%	–	–	–	0%	0%
<i>A. flavus 2</i>	0%	–	0%	–	–	–	5%	0%
CONTROL + (colorante sin inocular)	5%	0%	85%	30%	30%	0%	25%	0%
CONTROL - (agua de caño estéril)	100%							

Leyenda: - : No se sembró semillas.

V. DISCUSIÓN

En la actualidad, uno de los problemas más frecuentes que se va incrementando es la contaminación de suelo y agua causando gran impacto ambiental a nivel mundial debido a la consecuencia de la actividad humana y procesos productivos, uno de ellos son las grandes industrias textiles que vierten sus residuos de colorantes en cuerpos de agua y/o suelo. En el estudio se aislaron 14 cepas de hongos de la muestra de suelo y 10 de restos vegetales (Fig. 01); similar a lo encontrado por Jozami *et al.* (2016), que registraron 13 géneros fúngicos aislados a partir de hojas descompuestas de *S. argentinensis* y *P. prionitis*, en Argentina⁴².

Al realizarse el ensayo de las 24 cepas de hongos aisladas en los colorantes trifenilmetanos y azoico a 50 ppm (Tabla. 12), se logró seleccionar 10 hongos con capacidad decolorativa en los diferentes colorantes estudiados: verde de malaquita, cristal violeta, fucsina y safranina, mostrando mejor decoloración en el colorante azoico (safranina); así como menor decoloración en el colorante trifenilmetano (fucsina) (Tabla. 01). Algunos de los hongos que crecen en el suelo y restos vegetales han desarrollado un sistema enzimático único y no específico que funciona en el ambiente extracelular, esta capacidad se ha aprovechado para desarrollar sistemas biológicos direccionados a tratar contaminantes de alta estabilidad, como los colorantes sintéticos textiles^{26,43,44}.

En el estudio se logró identificar 6 géneros y 10 especies de hongos, de los cuales 6 fueron aislados de suelo y 4 de restos vegetales (Tabla. 02); mediante la técnica de microcultivo³⁶ y utilizando las claves de identificación descritas por Barnett y Hunter (1972), Joseph (1963) y Piontelli y Toro (1994); asimismo, el Instituto Nacional de Salud - INS confirmó la identificación de las especies de hongos (Ver Anexo 03).

Los géneros de hongos con capacidad decolorativa en los colorantes trifenilmetanos (verde de malaquita, cristal violeta, fucsina) y azoico (safranina) que se identificaron fueron: *Penicillium* (Fig. 03), *Aspergillus* (Fig. 02), *Alternaria*, *Nigrospora*, *Hialofomiceto* y *Oideodendron* (Fig. 04); similar a lo mencionado por Lalitha *et al.* (2011); Shaid *et al.* (2013); Rani *et al.* (2014) y Ranjhita *et al.* (2018), ellos demostraron que el género *Aspergillus* tuvo capacidad de degradación en los colorantes cristal violeta, verde malaquita, safranina y fucsina^{25,29,30,35}; Ali *et al.* (2009) demostraron que el género *Alternaria* tuvo capacidad de decoloración y degradación en el colorante verde malaquita²³, similar a lo encontrado en el estudio. Por otro lado, el género *Nigrospora* presentó decoloración en el colorante safranina; asimismo, Ilyas y Rehman en el 2013 reportaron que este género tiene capacidad de decolorar y desintoxicar el colorante rojo Synodol HF-6BN²⁷; esto pudo deberse a que ambos colorantes pertenecen al grupo de colorantes azoicos.

Al evaluar los hongos identificados que tuvieron capacidad decolorativa frente a los colorantes trifenilmetanos y azoico tanto cualitativa y cuantitativa; en el colorante verde de malaquita, la cepa que mostró mayor decoloración cualitativa (Tabla. 03) fue *Hialofomiceto* con un porcentaje de 100% a una concentración de 50 y 100 ppm, y un 75% en 200 ppm; las cepas *A. alternata* y *Oideodendron sp.* mostraron una decoloración de 75% en 50 ppm; y a 100 ppm una decoloración de 50% y 25% respectivamente; por otro lado; la cepa *P. chrysogenum* presentó una decoloración cualitativa de 75% en la concentración de 50 ppm. En cuanto al porcentajes de decoloración cuantitativa (Tabla. 04) la más alta se observó en *A. niger* con un 97.73% a una concentración de 50 ppm más no a 100 ppm; difiriendo con Rani *et al.* 2014 que observaron una decoloración de 50.37% a una concentración de 100 ppm³⁰, esto se debe posiblemente a que *A. niger* podría ser otra variedad. En caso de *A. alternata* se evidenció un porcentaje de decoloración de 93.90% en la

concentración 100 ppm más no se tiene reporte sobre esta especie, sin embargo, Ali *et al.* (2009) evidenciaron un porcentaje de 96.91% en *A. solani* a una concentración de 50 MG²³.

En el colorante cristal violeta la decoloración cualitativa (Tabla. 05) más alta se observó en Hialofomiceto con un 75% de decoloración a 50 y 100 ppm, un 25% de decoloración en 200 ppm y a 1000 ppm no se evidenció decoloración; mientras que, *P. chrysogenum* mostró un 75% y 25% de decoloración en 50 y 100 ppm respectivamente. En la decoloración cuantitativa (Tabla. 06) *A. alternata* evidenció un 96.16% de decoloración en la concentración de 50 ppm, siendo esta la que mejor degradó; por otro lado, en *A. niger* se observó un 92.32% de decoloración a 50 ppm difiriendo con Ali *et al.* (2016) que no observaron decoloración a esta concentración, esto puede deberse posiblemente a que el *A. niger* fue otra variedad a lo identificado en el estudio. *P. chrysogenum* evidenció un 93.96% de decoloración a 100 ppm y Hialofomiceto 0.13% a 200 ppm.

En el colorante safranina las cepas que mostraron mayor decoloración cualitativa (Tabla. 07) a 50 ppm fue *A. alternata* y *A. nidulans* con 75% de decoloración; por otra parte; en *A. niger*, *Nigrospora sp.*, *A. flavus* 1, *A. flavus* 2 y *P. chrysogenum* se evidenció un 50 % de decoloración; diferente a lo reportado por Salas *et al.* 2012, que determinaron que *Penicillium sp.* presentó un 75% de decoloración en Reactive Black 5²¹, ambos colorantes pertenecen al grupo de los colorantes azoicos. Así mismo, se observó crecimiento fúngico en las concentraciones de 200 y 1000 ppm, más no se observó decoloración por parte de las cepas fúngicas, posiblemente esto se deba a que el colorante no es tóxico para el crecimiento fúngico, pero que a mayor concentración del colorante no se evidencia decoloración²¹. En la decoloración cuantitativa (Tabla. 08), *Oideodendron sp.*

evidenció un 100% de decoloración a una concentración de 50 ppm, siendo este el que mejor degradó y *P. expansum* evidenció un 90.12% a 100 ppm. Lalitha *et al.* 2011 demostraron que el colorante safranina fue fácilmente degradado por *A. flavus* hasta un 80 a 90% en un periodo de 3 a 7 días, difiriendo a lo encontrado en el estudio, donde, se evidenció que *A. flavus* 2 tuvo un porcentaje de decoloración de 64.11% a 100 ppm después de 14 días.

En cuanto al colorante fucsina solo 2 cepas (*A. alternata* y *P. chrysogenum*) tuvieron la capacidad de degradar cualitativamente (Tabla. 09) dicho colorante en las concentraciones de 50 y 100 ppm. En la decoloración cuantitativa (Tabla. 10) *A. alternata* evidenció mejor decoloración (90.48% y 74.49% a 50 y 100 ppm respectivamente) que *P. chrysogenum* (83.78% y 70.68% a 50 y 100 ppm respectivamente). Esta investigación difiere a lo reportado por Rani *et al.* 2014, ellos determinaron que *A. niger* tuvo la capacidad de biodegradar la fucsina³⁰.

Al evaluar si existe o no diferencia significativa en la decoloración de los colorantes verde malaquita, cristal violeta y safranina por las absorbancias obtenidas entre las cepas estudiadas a los 14 días se aplicó la prueba estadística no paramétrica Kruskal – Wallis con el programa SPS v23 resultando que no existe diferencia entre los porcentajes de decoloración en los colorantes trifenilmetanos y azoico (Ver Anexo 02).

En el estudio se puede observar que los hongos aislados son disímiles en la capacidad de decolorar los colorantes trifenilmetanos y azoico en diferentes porcentajes como es el caso de *A. alternata* y *P. chrysogenum*, solo estas 2 cepas tuvieron la capacidad de decolorar los 4 colorantes ensayados (Fuente ver anexo, Tabla. 13); McMullan *et al.* 2001 sustenta que los microorganismos son capaces de decolorar y metabolizar colorantes⁴⁵, asimismo Cortazar *et al.* 2012 mencionan

que los hongos tienen varios mecanismos de decoloración; el mecanismo de bioadsorción consiste en que las células de los hongos degradan gradualmente el colorante unido a ellas, ocurriendo esto con o sin biodegradación del contaminante⁹, y el mecanismo de biodegradación se produce mediante enzimas extracelulares como la lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasa⁴⁶.

En la presente investigación se observa que la mayoría de los hongos tuvo la capacidad de biorremediar los colorantes trifenilmetanos y azoico mediante el mecanismo de bioadsorción ya que se pudo notar una disminución de la intensidad del color manteniendo su tonalidad; asimismo, Salas *et al.* 2012 y Rani *et al.* 2014 observaron a través de un microscopio la coloración en sus micelios de los hongos para determinar el mecanismo de bioadsorción^{21,30}. El mecanismo de biodegradación se manifiesta por un efecto batocrómico o hipsocrómico de las longitudes de onda de máxima absorción de cada colorante, es decir el colorante cambia de color y longitud de onda (Ver anexo 01); asimismo, Rani *et al.* 2014 menciona que la desaparición del colorante puede deberse a la biodegradación del cromóforo en la molécula del colorante debido a la producción de enzimas extracelulares por hongos³⁰, teniendo similitud con el presente estudio (Ver anexo, Figura. 19 – A y Figura. 18 - D).

En cuanto lo referente al bioensayo de germinación de las semillas de *Lactuca sativa* L. var great lakes 659 con los colorantes no tratados y tratados con las diferentes cepas, mostraron comportamiento muy disimiles. Los colorantes tratados con *P. chrysogenum* se evidenció mejores resultados en cuanto a la germinación ya que se pudo observar germinación de las semillas en los 4 colorantes ensayados, donde en el colorante verde malaquita y fucsina tuvo un porcentaje de germinación mayor a 90%, lo que permite suponer que esta cepa disminuye considerablemente

la toxicidad en estos colorantes (Tabla. 11). Con respecto a los colorantes no tratados (control positivo), se visualizó que el colorante cristal violeta es el menos tóxico frente a las semillas de lechuga debido a que tuvo un mayor porcentaje de germinación (85%) y en algunos casos en el colorante safranina también se observó algo parecido; sin embargo, en los mismos colorantes pero tratado se visualizó un porcentaje de germinación más bajo que en los colorantes no tratados (control positivo), esto puede deberse a que los colorantes que fueron tratados con hongos durante el periodo de incubación pudieron haber secretado metabolitos secundarios, como las micotoxinas que son secretados por algunos géneros de hongos como *Aspergillus* y *Penicillium* ocasionando inhibición en la germinación de las semillas⁴⁷; o también los hongos pudieron ocasionar un cambio en la estructura química del colorante haciéndolo más tóxico⁴⁸.

Como se puede observar en el estudio los hongos ensayados tienen la capacidad de decoloración, los que pueden ser utilizados como una alternativa prometedora para desintoxicar y biorremediar los colorantes nocivos en el medio ambiente.

VI. CONCLUSIONES

Al término del estudio se llegó a las siguientes conclusiones:

1. Se identificaron 10 cepas con capacidad decolorativa en los colorantes trifenilmetanos y azoico; *A. niger*, *A. nidulans*, *A. flavus* (1 y 2), *P. chrysogenum*, *P. expansum*, *Nigrospora sp.*, *Oideodendron sp.*, *A. alternata* y Hialofomiceto.
2. En el colorante verde de malaquita a 50 ppm 8 cepas tuvieron capacidad decolorativa a excepción de *Nigrospora sp.* y *P. expansum*, el porcentaje de decoloración osciló entre 78.13% a 97.73% siendo *A. niger* el que dio mejor resultado.
3. En el colorante cristal violeta a 50 ppm 8 cepas tuvieron capacidad decolorativa a excepción de *Nigrospora sp.* y *P. expansum*, el porcentaje de decoloración osciló entre 64.76% a 96.16%, siendo *A. alternata* el que dio mejor resultado.
4. En el colorante safranina todas las cepas identificadas tuvieron capacidad decolorativa a 50 ppm y el porcentaje de decoloración osciló entre 59% a 100%, siendo *Oideodendron sp.* el que dio mejor resultado.
5. En el colorante fucsina sólo *A. alternata* y *P. chrysogenum* tuvieron capacidad decolorativa a 50 y 100 ppm, el porcentaje de decoloración osciló entre 70.68% y 90.48%, siendo *A. alternata* el que dio mejor resultado.

6. Los colorantes tratados con *A. niger*, *P. chrysogenum*, Hialofomiceto, *Oideodendron sp.*, *A. flavus* 1, *A. nidulans* y *A. alternata* fueron los que evidenciaron germinación en las semillas de *Lactuca sativa* L. var. great lakes 659.

7. *P. chrysogenum* fue la única cepa que tuvo capacidad decolorativa en los colorantes verde de malaquita, cristal violeta, safranina y fucsina, asimismo, los 4 colorantes tratados por esta cepa se evidenció germinación en las semillas de lechuga.

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios complementarios con el objetivo de definir el/los mecanismos de decoloración.
2. Identificar las enzimas de los hongos y evaluar su actividad enzimática en la decoloración de los colorantes.
3. Realizar condiciones óptimas en el medio de cultivo como pH, temperatura, rpm entre otros; para mejorar el rendimiento de los hongos en la decoloración de los colorantes trifenilmetanos y azoico.
4. Realizar pruebas en efluentes y/o suelos contaminados con colorantes para evaluar la efectividad del proceso "in vivo".

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Arancibia-Cortes V. Caracterización de *Alternaria alternata* aislada de contenedores residuales urbanos y su potencial uso en la degradación de 6 polímeros de importancia ambiental. [Tesis de título]. [Chile]: Escuela de Tecnología Médica. Universidad de Santo Tomas; 2014.
2. Garzon-Jimenez R. Cinética de degradación de colorantes textiles de diferentes clases químicas por hongos y bacterias inmovilizadas sobre fibra de *Agave tequilana* Webber var. Azul. [Tesis de título]. [Bogotá]. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana; 2009.
3. Fu Y, Viraraghavan T. Dye biosorption sites in *Aspergillus niger*. *Bioresour. Technol.* 2002 May ;82(2): 139-145.
4. Zhang SJ, Yang M, Yang QX, Zhang Y, Xin BP, Pan F. Biosorption of reactive dyes by the mycelium pellets of a new isolate of *Penicillium oxalicum*. *Biotechnology Letters.* 2003 Sep; 25(17):1479-1482.
5. Bhole BD, Ganguly B, Madharam A, Deshpande D, Joshi J. Biosorption of methyl violet, basic fuchsin and their mixture using dead fungal biomass. *Current Science.* 2004 Jun 25; 86(12):1641-1645.
6. Knapp JS, Zhang F, Tapley KN. Decolourisation of Orange II by a Wood-rotting fungus. *Journal of Chemical. Technology and Biotechnology.* 1997 Jul; 69(3): 289-296.

7. Park C, Lee M, Lee B, Kim SW, Chase HA, Lee J, Kim S. Biodegradation and biosorption for decolorization of synthetic dyes by *Funalia trogii*. *Biochemical Engineering Journal*. 2007 Aug; 15; 36(1):59-65.
8. Mester T, Tien M. Oxidative mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. *Int. Biodeter. Biodegrad.* 2000 July; 46(1):51–59.
9. Cortazar A, González CA, Coronel C, Escalante JA, Castro J, Villagómez JR. Biotecnología aplicada a la degradación de colorantes de la industria textil. *Revista Universidad y Ciencia*, 2012 Ene; 28(2):187-199.
10. González V, Herrera C. Determinación de parámetros cinéticos y pruebas preliminares de tratabilidad para colorantes y metales empleando una cepa de *Ganoderma lucidum*. [Tesis de título]. [Bogotá]. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana; 2011.
11. Schnick RA. The impetus to register new therapeutics for aquaculture. *The. Prog. Fish-Cult.* 1998 Oct; 50(4):190-196.
12. Fessard V, Godard T, Huet H, Mourot A, Poul JM. Mutagenicity of malachite green and leucomalachite green in vitro tests. *J. Appl. Toxicol.* 1999 Nov-Dec; 19(6):421-430.

13. Kean BH, Haskins DW. Drugs for intestinal parasitism. In Drugs of choice (Ed.:W. Modell). C. V. Mosby Co., St. Louis. 1978; pp. 371-381.

14. Nelson C, Hites R. Aromatic amines in and near the Buffalo River. Environmental Science and Technology. 1980 Sep; 14:147-1149.

15. Gil-Loyzaga P. Cultivo de células animales y Humanas. Aplicaciones en Medicina Regenerativa. Editorial Visión Libros. Madrid; Cátedra innovación y Salud. Fundación FG-UCM; 2011.

16. Aguirre HI. Colorante Safranina O. Tecnología en salud. Investigación en Discapacidad. 2012 Sep; 1(2):83-85.

17. González-Gutierrez L. Estudio de la degradación de un colorante azo rojo reactivo en un biorreactor anaerobio de flujo descendente. [Tesis doctoral]. [México]. Departamento de ingeniería. Instituto Tecnológico de Celaya; 2006.

18. Banat IM, Nigam P, Singh D, Marchant R. Microbial decolorization of textile-dye containing effluents. A Review. Bioresource Technology. 1996 Dec; 58(3):217-227.

19. Rodríguez S. Dye removal by immobilized fungi. Biotechnology advances 2009 May-June; 27(3):227-235.

20. Zollinger H. 2003. Color Chemistry: Syntheses, Properties, and Applications of Organic Dyes and Pigments. Third, revised edition. Verlag Helvetica Chimica Acta. pp 637.
21. Salas D, Morales I, Terrazas E. Capacidad decolorativa de *Corioloropsis polyzona*, *Pycnoporus sp.* y *Penicillium sp.* sobre Reactive Black 5 a diferentes condiciones de cultivo. BIOFARBO. 2012 Ene; 20(1):41-48.
22. Falcón MA, Rodríguez A, Carnicero A, Regalado V, Perestelo F, Milstein O, De La Fuente G. Isolation of microorganisms with lignin transformation potential from soil of tenerife Island. Soil Biol. Biochem. 1995 Feb; 27(2):121-126.
23. Ali H, Ahmad W, Haq T. Decolorization and degradation of malachite green by *Aspergillus flavus* and *Alternaria solani*. African Journal of Biotechnology. 2009 April 20; 8(8):1574–1576.
24. Cardona M, Osorio J, Quintero J. Degradación de colorantes industriales con hongos ligninolíticos. Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia. 2009 Jun; (48):27-37.
25. Lalitha P, Nageswara Rao Reddy N, Arunalakshmi, K. Decolorization of Synthetic Dyes by *Aspergillus flavus*. Bioremediation Journal. 2011 May 24; 15(2):121–132.

26. Chanagá X, Plácido J, Marín M, Yepes MS. Hongos nativos con potencial degradador de tintes industriales en el valle de Aburrá, Colombia. Rev.Fac.Nac.Agron. 2012 Ago; 65(2): 201-207.
27. Ilyas S. Rehman A. Decolorization and detoxification of Synozol red HF-6BN azo dye, by *Aspergillus niger* and *Nigrospora* sp. Iranian J Environ Health Sci Eng. 2013 Jan 21; 10(1):12.
28. Kuhar F, Nogueyra S, Bonamino G, Bestene S, Herrera M. Degradación de colorantes trifenilmetánicos por aislamientos fúngicos del bosque andino patagónico en viruta de pino. Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónica. Patagonia Forestal. 2013 Mar;(12):19-21.
29. Shahid A, Singh J, Bisht S, Teotia P, Kumar, V. Biodegradation of textile dyes by fungi isolated from north indian field soil. EnvironmentAsia .2013 Jul; 6(2):51-57.
30. Rani B, Kumar V, Singh J, Bisht S, Teotia P, Sharma S, Kela R. Bioremediation of dyes by fungi isolated from contaminated dye effluent sites for bio - usability. Brazilian Journal of Microbiology. 2014 Oct 9; 45(3):1055-63.

31. Rojas J, Hormaza A. Evaluación de la biodegradación del colorante azul brillante utilizando hongos de la podredumbre blanca y sus consorcios. Rev. U.D.C.A. Act. & Div. Cient. 2016 Jun; 19(1):179-187.

32. Ali HM, Shehata SF, Ramadan, KMA. Microbial decolorization and degradation of crystal violet dye by *Aspergillus niger*. International Journal of Environmental Science and Technology. 2016 Dec; 13(12):2917-2926.

33. Kivanc M, Dođruer ÖM. Screening of fungi for decolorization of dye wastewater. International Proceedings of Chemical, Biologic and Environ. Eng. 2017; Vol 01: pp.100.

34. Srinu A, Murali S, Vijaya Lakshmi D, Prasad DVR. Decolorization of anthraquinone dyes by *Aspergillus* strains and also optimization of lignolytic enzymes. International Journal of Recent Scientific Research. 2017 July; 8(7): 18547-18553.

35. Ranjitha J, Shalini P, Anand M, Raghavendra S. Detoxification of dyes by *Aspergillus niger* isolated from dye contaminated soil effluent from the sites of textile industry. Rexsearch Journal of Chemistry and Environment. 2018 May; 22(5):1.

36. López M, Méndez T, Hernández-Hernández, Castañon (2004). Olivares Micología Médica. Ed. Trillas, pp 68-70.
37. Barnett H, Hunter B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. 3th ed.St. Burgess Publishing Company.
38. Piontelli E, Toro A. 1995. Manual de Identificación para microhongos comunes en alimentos. Universidad de Valparaíso, Escuela de Medicina.
39. Joseph C. (1963). Manual de los Hongos del Suelo. 2th ed.St. Compañía Editorial Continental. S.A.
40. Sobrero M, Ronco A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. En: Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas, G. Castillo (Ed.), Ottawa, Canadá. IDRC, IMTA, 2004 Ene:71-79.
41. Wilchez F, Álvarez J, Balguera H. Tamaños de alvéolo y diferentes láminas de riego en obtención de plántulas de tomate. Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 2008 Dec; 11(2):141-151.
42. Jozami E, Pioli RN, Feldman SR. Géneros de hongos necrofiticos asociados a hojas de *Spartina argentinensis* Parodi y *Panicum prionitis* Ness en Argentina. Chilean J. Agric. Anim. Sci., ex Agro-Ciencia. 2016 Sep; 32(3):244-252.

43. Swamy J, Ramsay JA. The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. *Enzyme and Microbial Technology* 1999 Feb-Mar; 24(2):130-137.
44. Robinson T, Chandran B, Nigam P. Studies on the production of enzymes by white-rot fungi for the decolourisation of textile dyes. *Enzyme and Microbial Technology* 2001 Nov; 29(8-9):575-579.
45. McMullan G, Meehan C, Conneely A, Kirby N, Robinson T, Nigam P, Banat IM, Marchant R, Smyth WF. Microbial decolourisation and degradation of textile dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2001 July; 56(1-2): 81-87.
46. Romero-Suárez D. Caracterización inicial de lacasas y peroxidasas producidas por biopelículas de hongos decoloradores de tintes azoicos. [Tesis de título]. [Lima]. Facultad de Ciencia. Universidad Nacional Agraria La Molina; 2015.
47. Gonzalez-Ovando C. Metodología para el control de hongos y bacterias en sistemas de producción de forraje verde hidropónico. [Tesis de especialización]. [México]. Centro de Investigación en Química Aplicada; 2009.
48. Dávila G, Vásquez R. Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. *Mensaje Bioquímico*. 2006 Jan; Vol XXX:29-55.

IX. ANEXOS



Figura. 06. Campos experimentales de la Facultad de Ciencias Biológicas en la Universidad Nacional San Luis Gonzaga. **A.** Muestra de suelo; **B.** Muestra de restos vegetales.

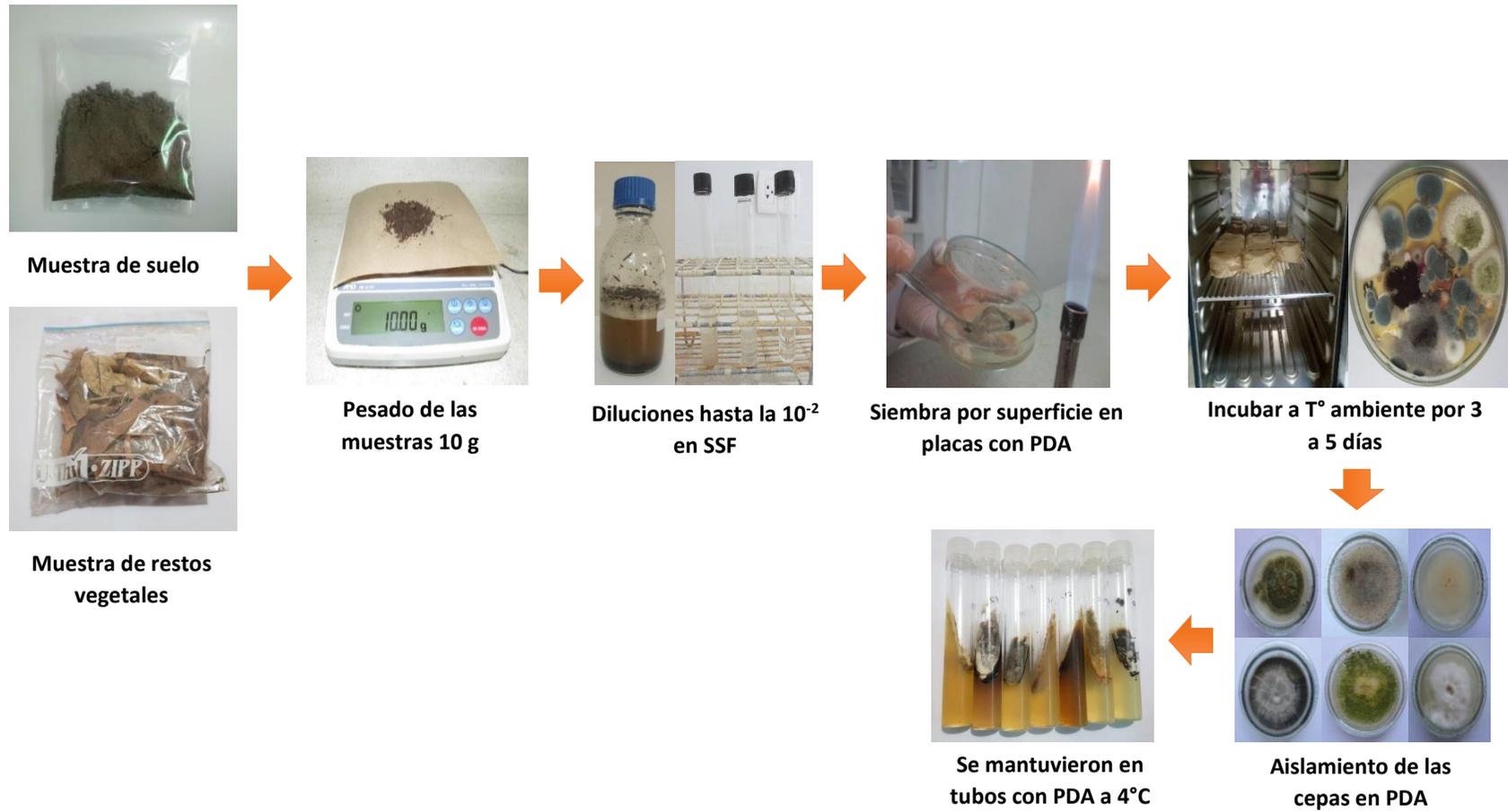


Figura. 07. Flujograma del aislamiento de los hongos ambientales en muestras de suelo y restos vegetales.

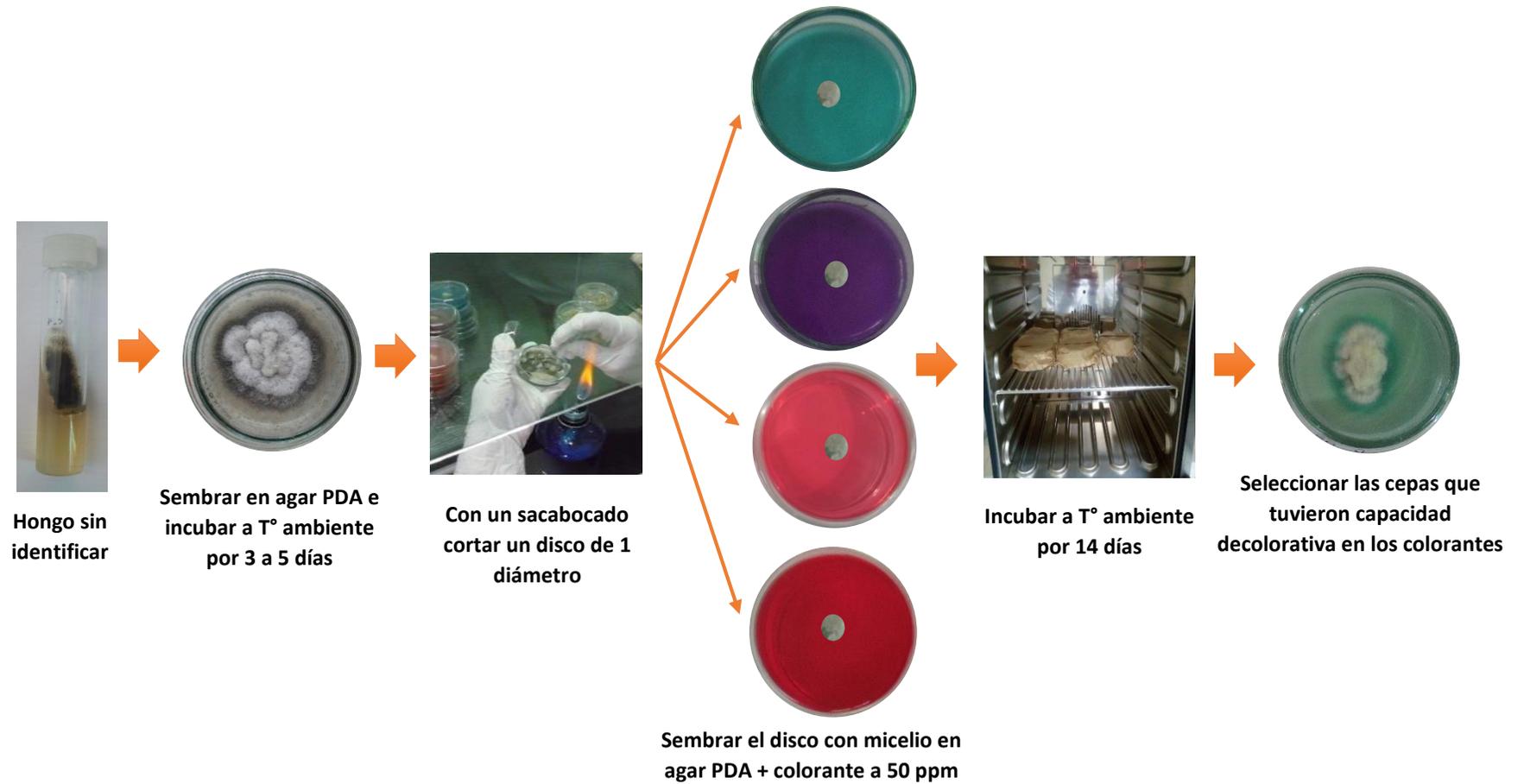


Figura. 08. Flujograma de selección de hongos aislados de suelo y restos vegetales con capacidad decolorativa en los colorantes trifenilmetanos y azoico.

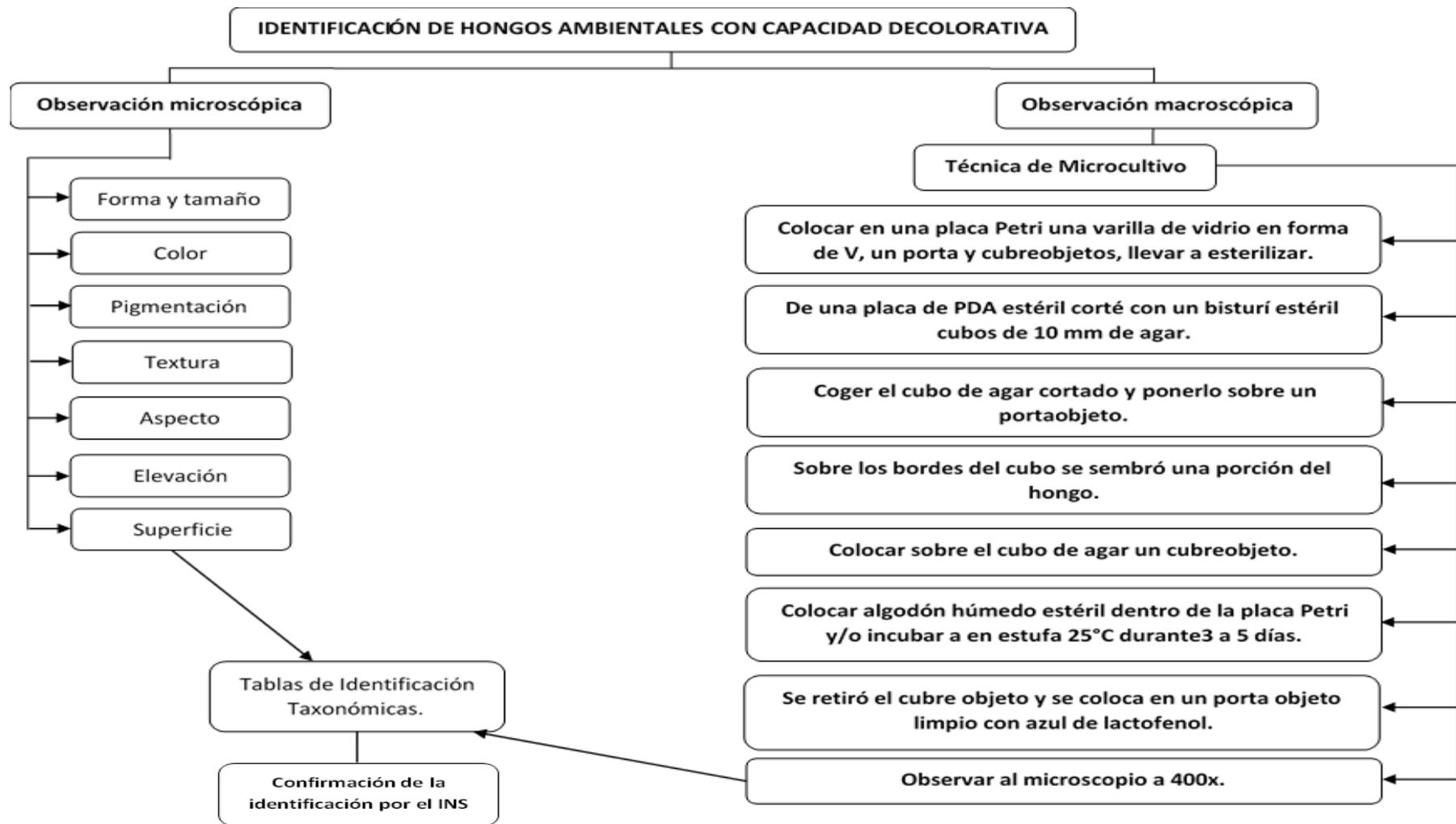


Figura. 09. Flujograma de identificación de hongos aislados de suelo y restos vegetales con capacidad decolorativa.

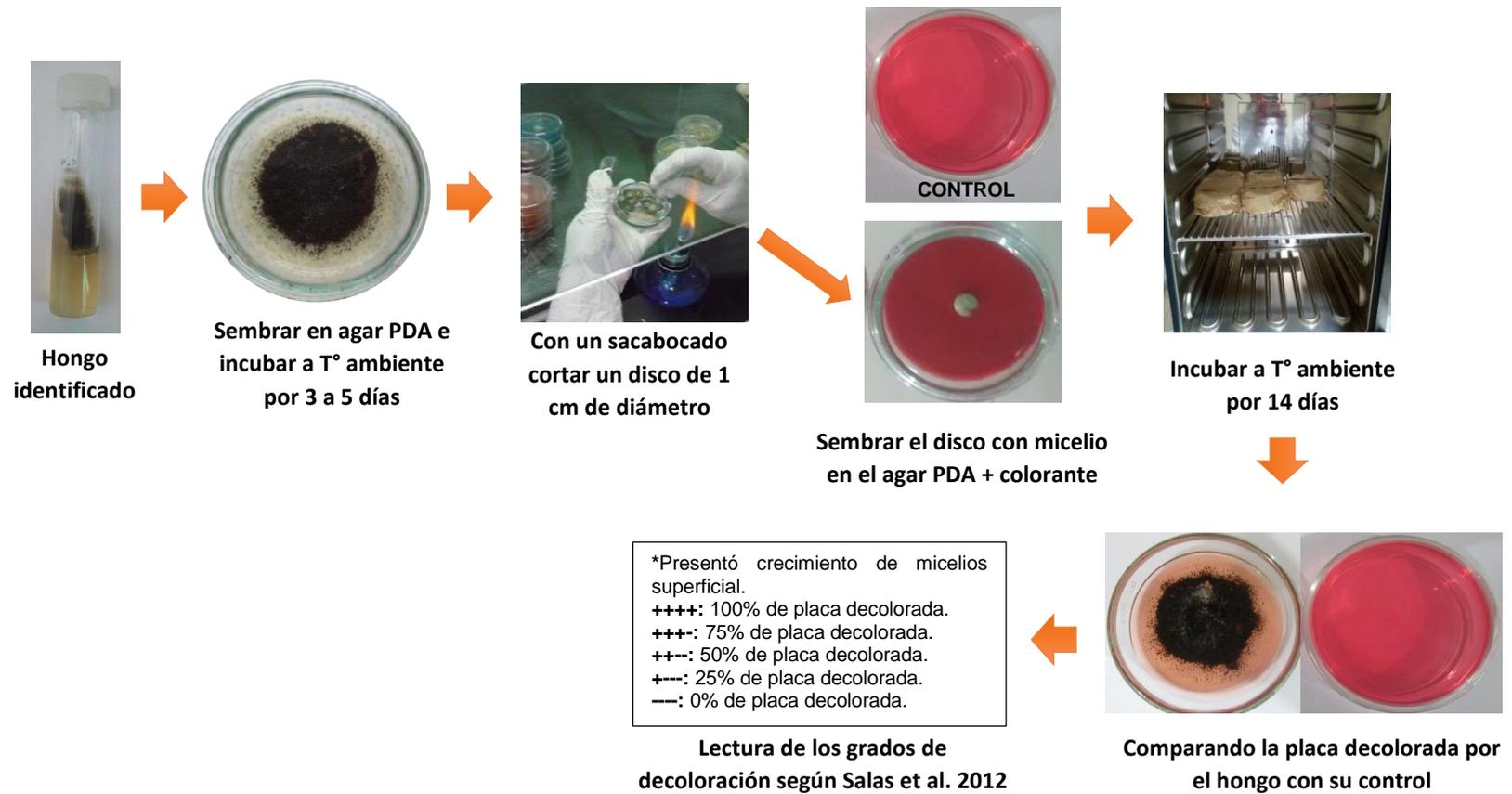


Figura. 10. Flujograma de determinación cualitativa del porcentaje de decoloración en los colorantes trifenilmetanos y azoico.



Figura. 11. Flujograma de determinación cuantitativa del porcentaje de decoloración en los colorantes trifenilmetanos y azoico.

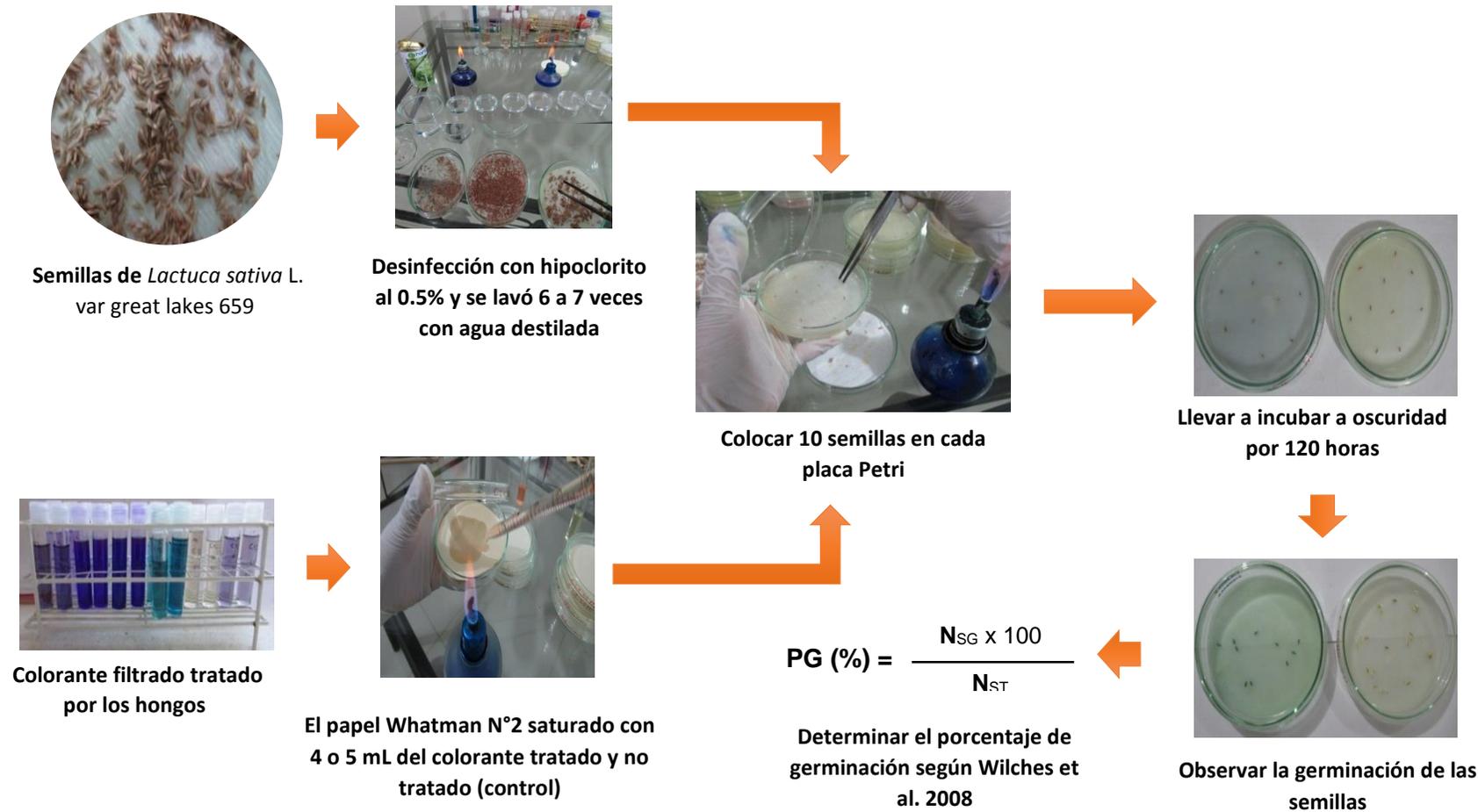


Figura. 12. Flujograma de bioensayo de la germinación en semillas de *Lactuca sativa* L. var great lakes 659. en colorantes tratados y no tratados.

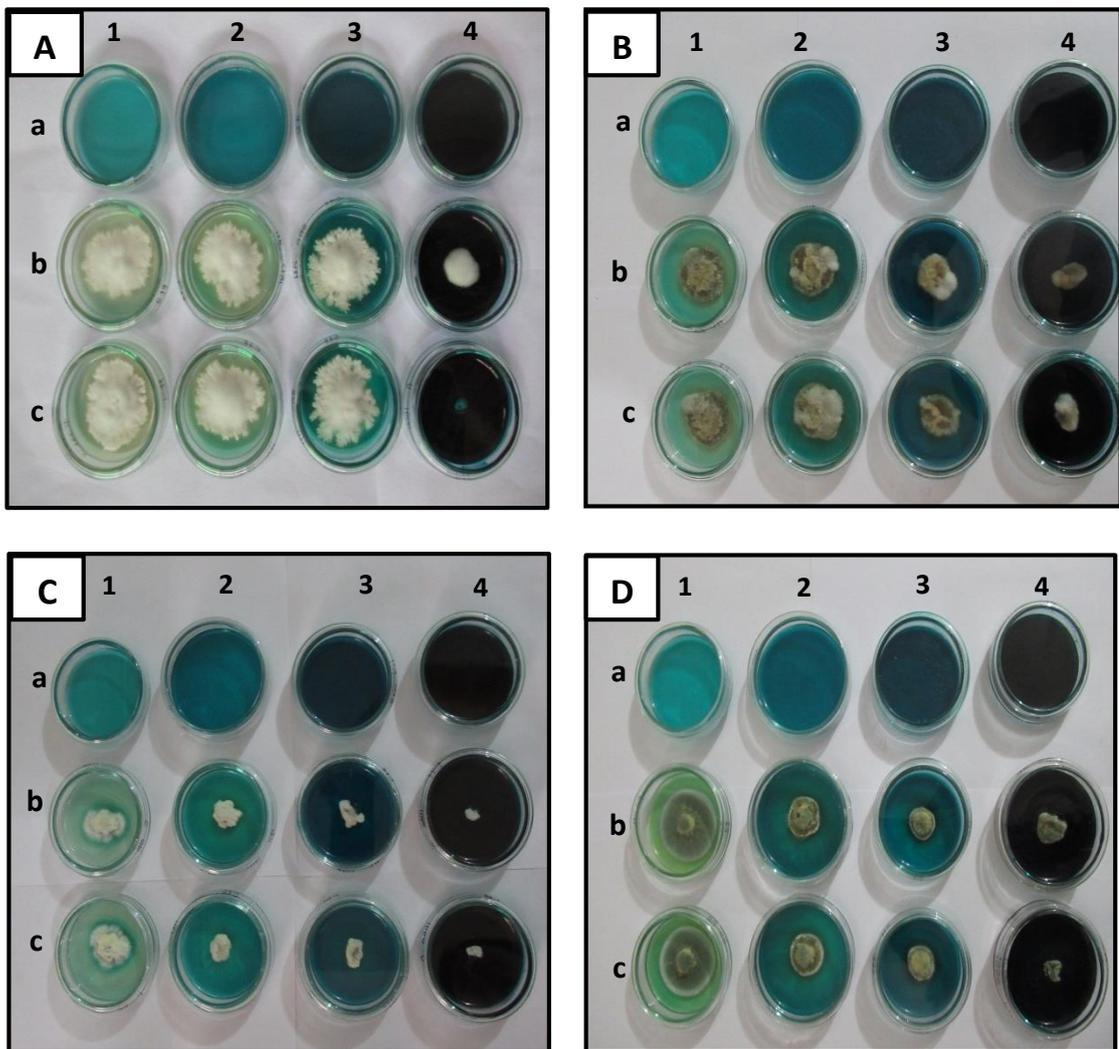


Figura. 13. Decoloración cualitativa de verde malaquita después de 14 días de tratamiento en medio sólido con **A.** Hialofomiceto; **B.** *A. alternata*; **C.** *Oideodendron sp.* y **D.** *P. chrysogenum*. **(a)** Controles sin inóculo fúngico; **(b)** Réplica 1; **(c)** Réplica 2; **(1)** 50 ppm; **(2)** 100 ppm; **(3)** 200 ppm y **(4)** 1000 ppm de concentración.

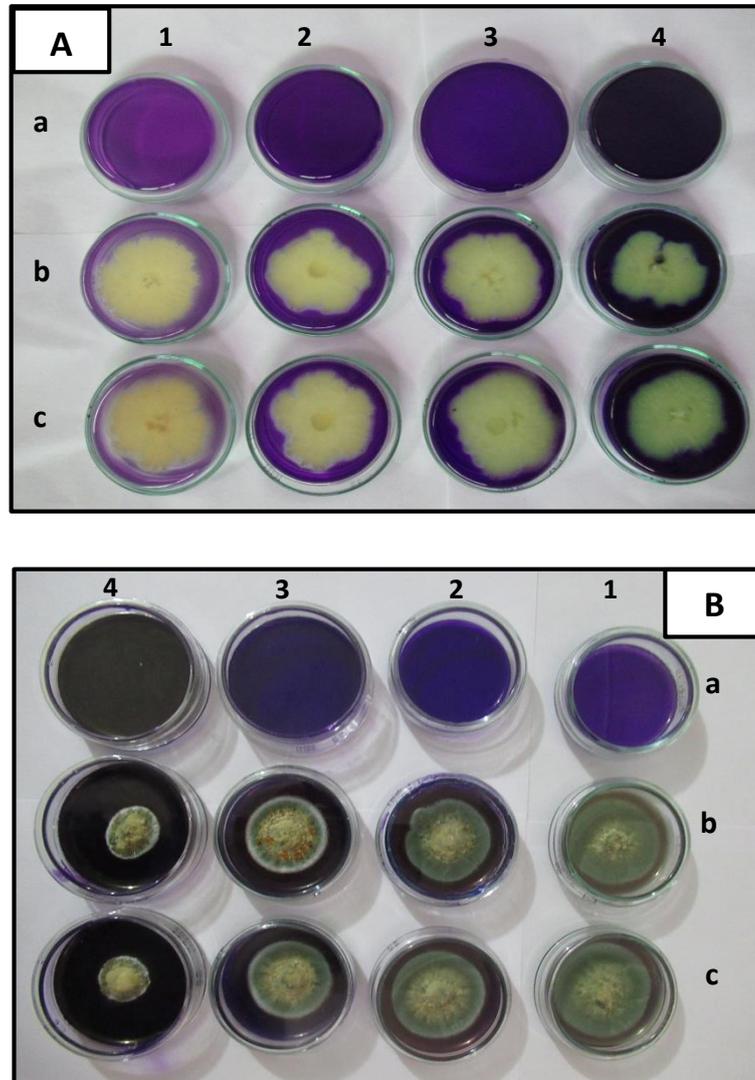


Figura. 14. Decoloración cualitativa de cristal violeta después de 14 días de tratamiento en medio sólido con **A.** Hialofomiceto y **B.** *P. chrysogenum*. **(a)** Controles sin inóculo fúngico; **(b)** Réplica 1; **(c)** Réplica 2; **(1)** 50 ppm; **(2)** 100 ppm; **(3)** 200 ppm y **(4)** 1000 ppm de concentración.

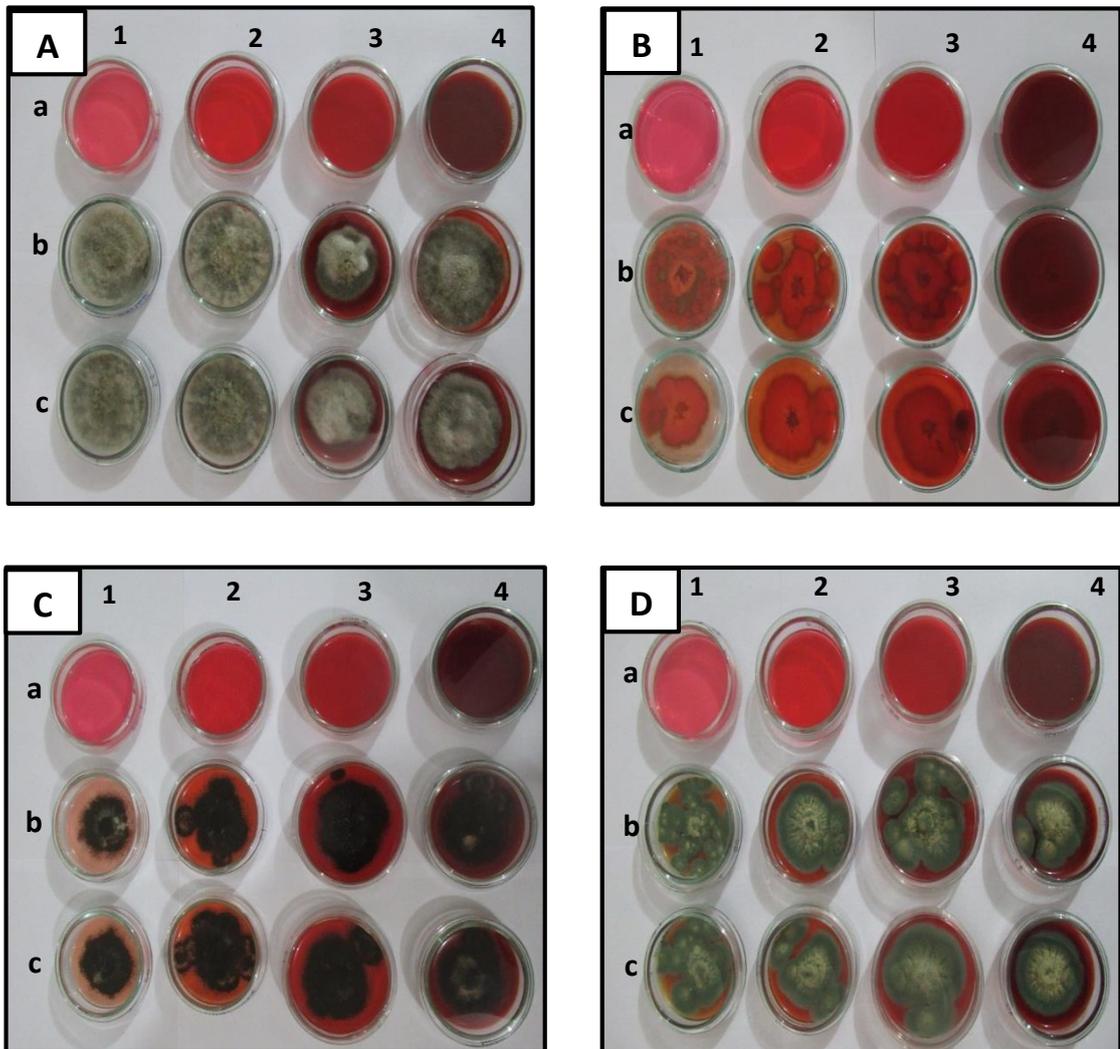


Figura. 15. Decoloración cualitativa de safranina después de 14 días de tratamiento en medio sólido con **A.** *A. alternata*; **B.** *A. nidulans*; **C.** *A. niger* y **D.** *P. chrysogenum*. **(a)** Controles sin inóculo fúngico; **(b)** Réplica 1; **(c)** Réplica 2; **(1)** 50 ppm; **(2)** 100 ppm; **(3)** 200 ppm y **(4)** 1000 ppm de concentración.

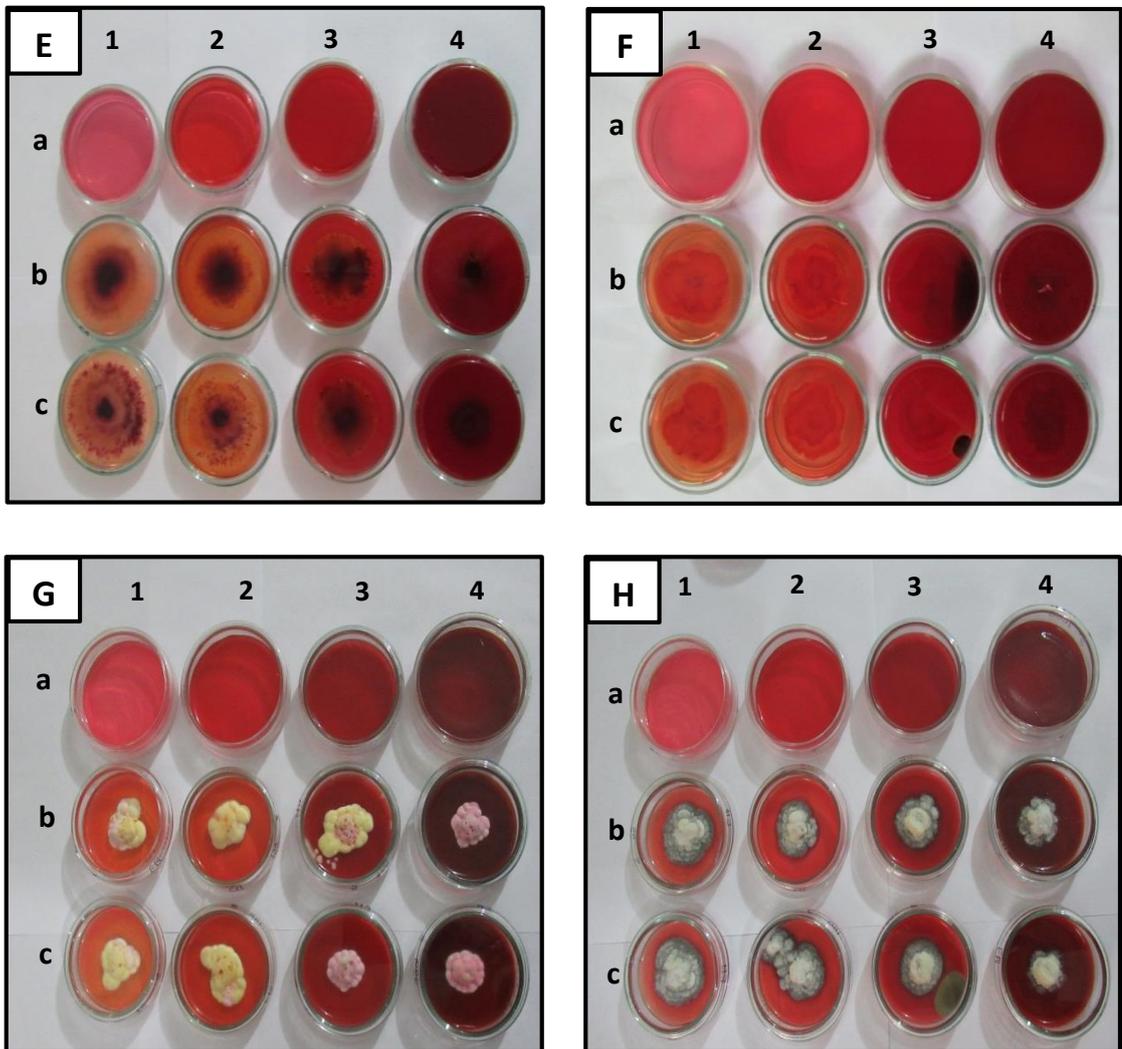


Figura. 16. Decoloración cualitativa de safranina después de 14 días de tratamiento en medio sólido con **A.** *Nigrospora sp.*; **B.** *Hialofomiceto*; **C.** *P. expansum* y **D.** *Oideodendron sp.* **(a)** Controles sin inóculo fúngico; **(b)** Réplica 1; **(c)** Réplica 2; **(1)** 50 ppm; **(2)** 100 ppm; **(3)** 200 ppm y **(4)** 1000 ppm de concentración.

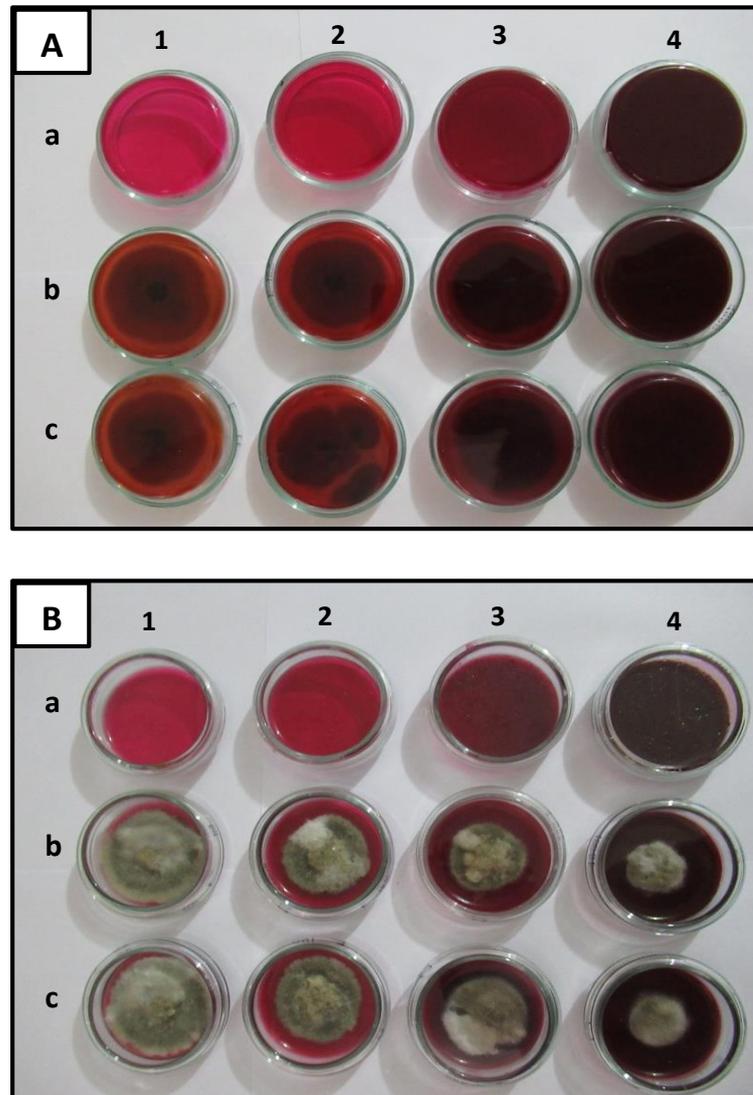


Figura. 17. Decoloración cualitativa de fucsina después de 14 días de tratamiento en medio sólido con **A.** *P. chrysogenum* y **B.** *A. alternata*. **(a)** Controles sin inóculo fúngico; **(b)** Réplica 1; **(c)** Réplica 2; **(1)** 50 ppm; **(2)** 100 ppm; **(3)** 200 ppm y **(4)** 1000 ppm de concentración.

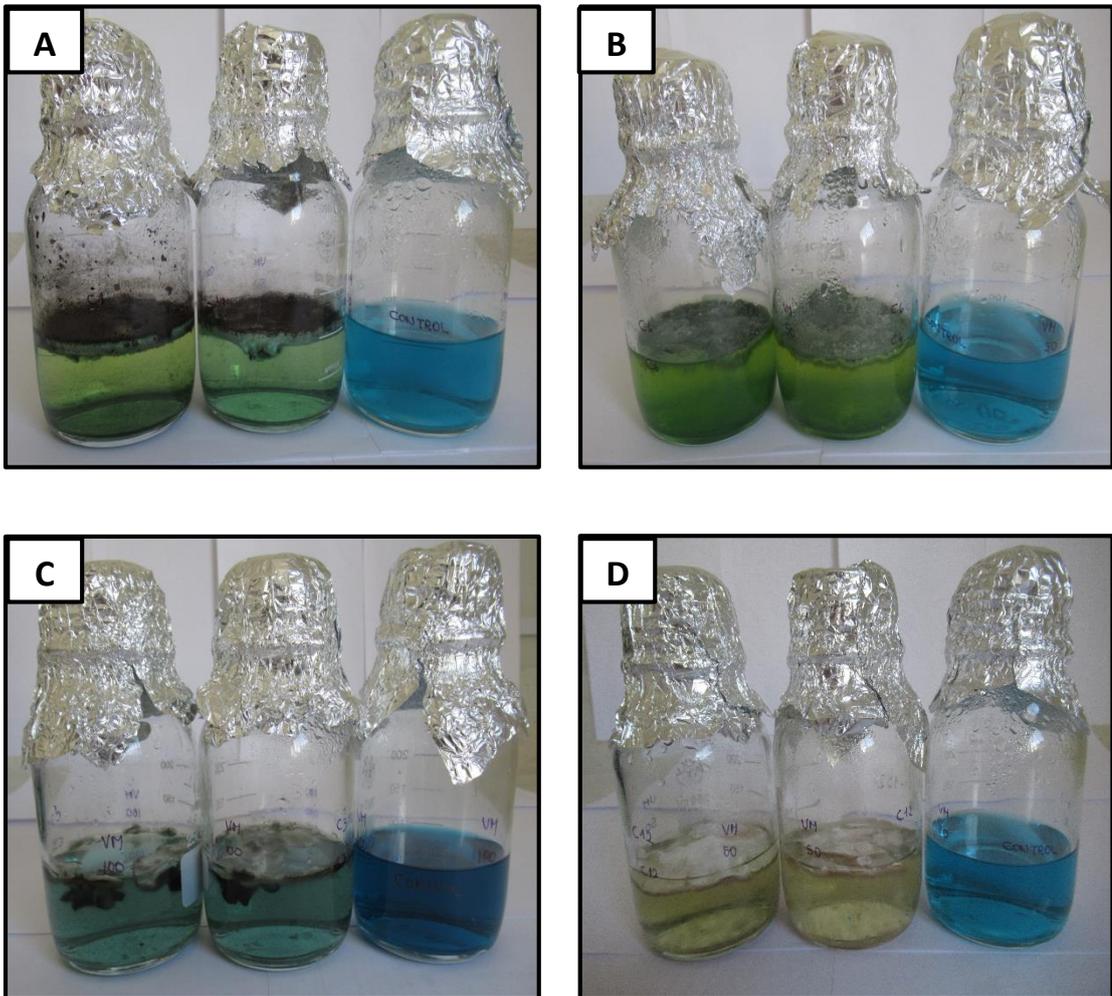


Figura. 18. Decoloración cuantitativa de verde malaquita después de 14 días de tratamiento en medio líquido con **A.** *A. niger* y **B.** *P. chrysogenum* a 50 ppm. **C** *A. alternata* a 100 ppm. **D.** Hialofomiceto a 50 ppm.

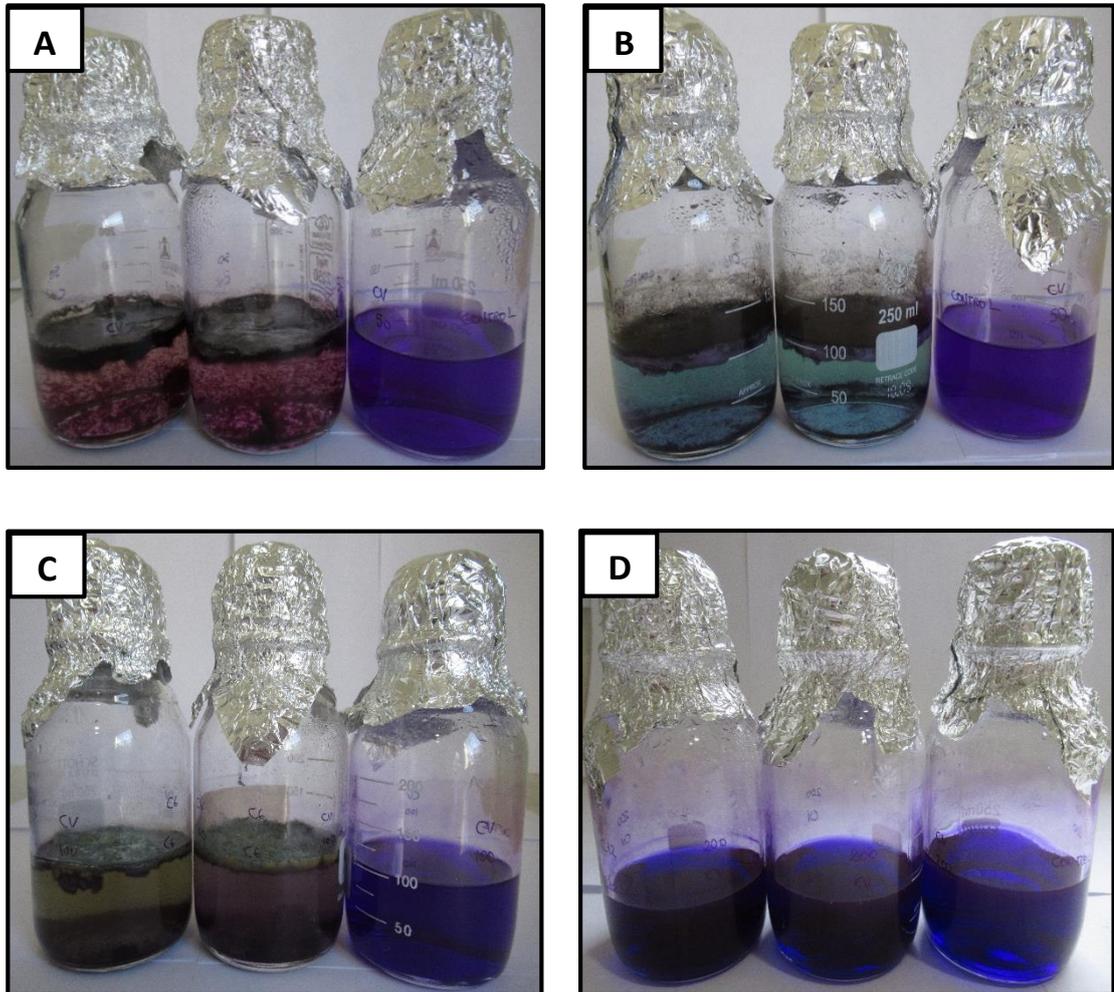


Figura. 19. Decoloración cuantitativa de cristal violeta después de 14 días de tratamiento en medio líquido con **A.** *A. alternata* y **B.** *A. niger* a 50 ppm. **C.** *P. chrysogenum* a 100 ppm. **D.** Hialofomiceto a 200 ppm.

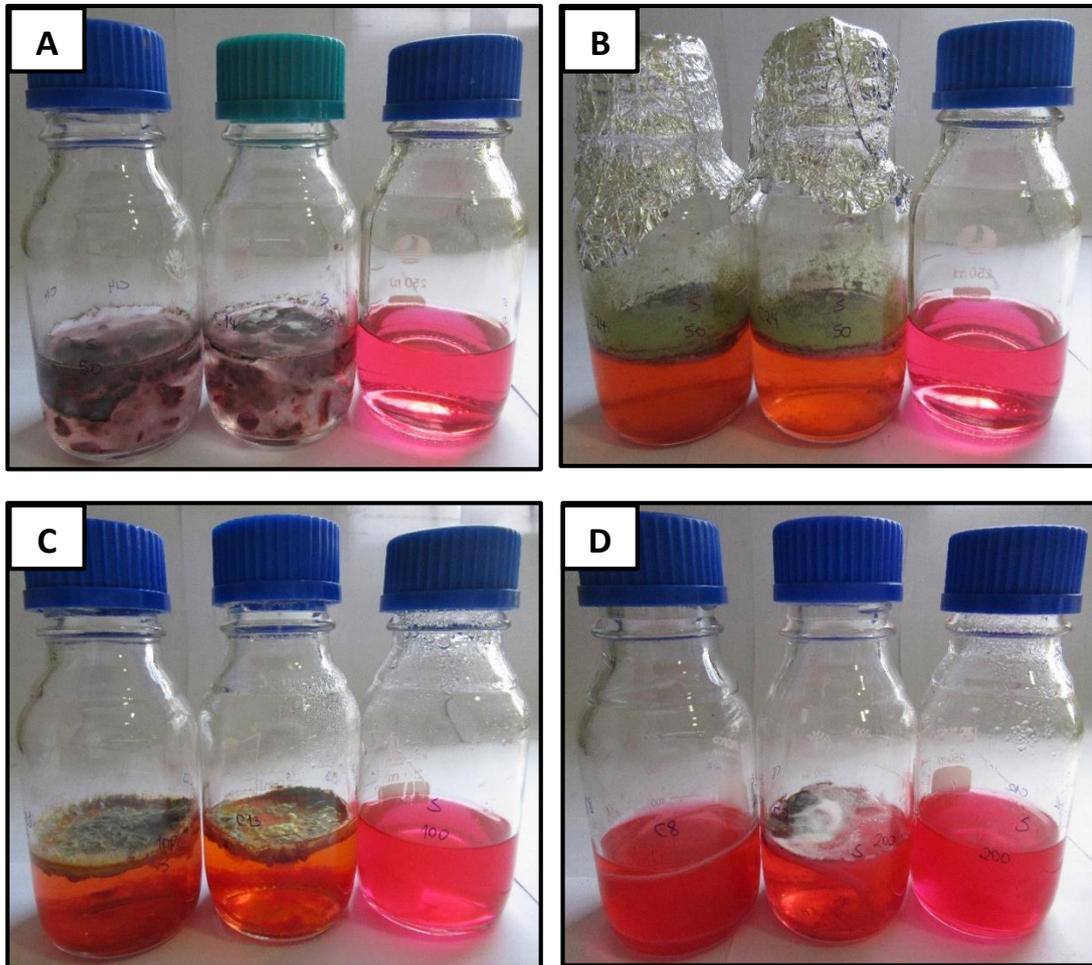


Figura. 20. Decoloración cuantitativa de safranina después de 14 días de tratamiento en medio líquido con **A.** *Oideodendron sp.* y **B.** *A. flavus* 2 a 50 ppm. **C.** *P. expansum* a 100 ppm. **D.** *Nigrospora sp.* a 200 ppm.

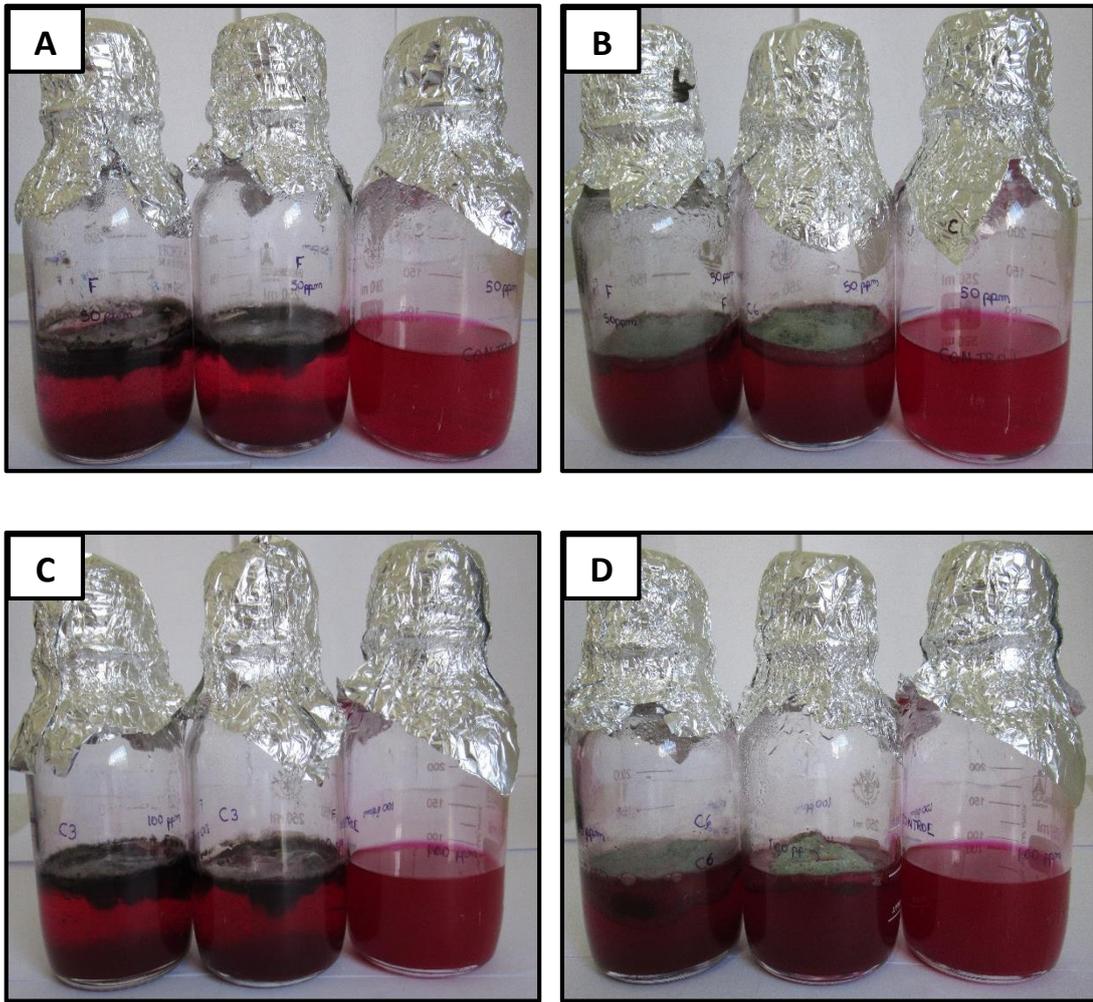


Figura. 21. Decoloración cuantitativa de fucsina después de 14 días de tratamiento en medio líquido con **A.** *A. alternata* y **B.** *P. chrysogenum* a 50 ppm. **C.** *A. alternata* y **D.** *P. chrysogenum* a 100 ppm.

Tabla. 12. Evaluación de las 24 cepas aisladas de suelo y restos vegetales en los colorantes trifenilmetanos y azoico.

CEPAS	Colorantes a la concentración de 50 ppm			
	Verde de malaquita	Cristal violeta	Fucsina	Safranina
S-C01	●	●	X	●
RV-C02	X	X	X	X
RV-C03	●	●	●	●
S-C04	X	X	X	X
S-C05	X	X	X	X
RV-C06	●	●	●	●
S-C07	●	●	X	●
RV-C08	X	X	X	●
RV-C09	X	X	X	X
S-C10	X	X	X	X
S-C11	X	X	X	X
RV-C12	●	●	X	●
S-C13	X	X	X	●
S-C14	●	●	X	●
RV-C15	X	X	X	X
S-C16	X	X	X	X
S-C17	X	X	X	X
RV-C18	X	X	X	X
RV-C19	X	X	X	X
S-C20	X	X	X	X
RV-C21	X	X	X	X
S-C22	X	X	X	X
S-C23	●	●	X	●
S-C24	●	●	X	●

Leyenda:

- : Decoloración en el colorante safranina.
- : Decoloración en el colorante cristal violeta.
- : Decoloración en el colorante verde de malaquita.
- : Decoloración en el colorante fucsina.
- X : No presentó decoloración.
- RV : Restos vegetales.
- S : Suelo.

Tabla. 13. Hongos con capacidad decolorativa en los colorantes trifenilmetanos y azoico a 50 ppm.

CEPAS	Colorantes a la concentración de 50 ppm			
	Verde de malaquita	Cristal violeta	Fucsina	Safranina
<i>A. niger</i>	●	●	X	●
<i>A.alternata</i>	●	●	●	●
<i>P. chrysogenum</i>	●	●	●	●
<i>A. nidulans</i>	●	●	X	●
<i>Nigrospora sp.</i>	●	●	X	●
Hialofomiceto	●	●	X	●
<i>P. expansum</i>	X	X	X	●
<i>Oideodendron sp.</i>	●	●	X	●
<i>A. flavus 1</i>	●	●	X	●
<i>A. flavus 2</i>	●	●	X	●

Leyenda:

- : Decoloración en el colorante safranina.
- : Decoloración en el colorante cristal violeta.
- : Decoloración en el colorante verde malaquita.
- : Decoloración en el colorante fucsina.
- X : No presentó decoloración.

Anexo 01. Espectros de absorbancias y estructura química de los colorantes trifenilmetanos y azoico.

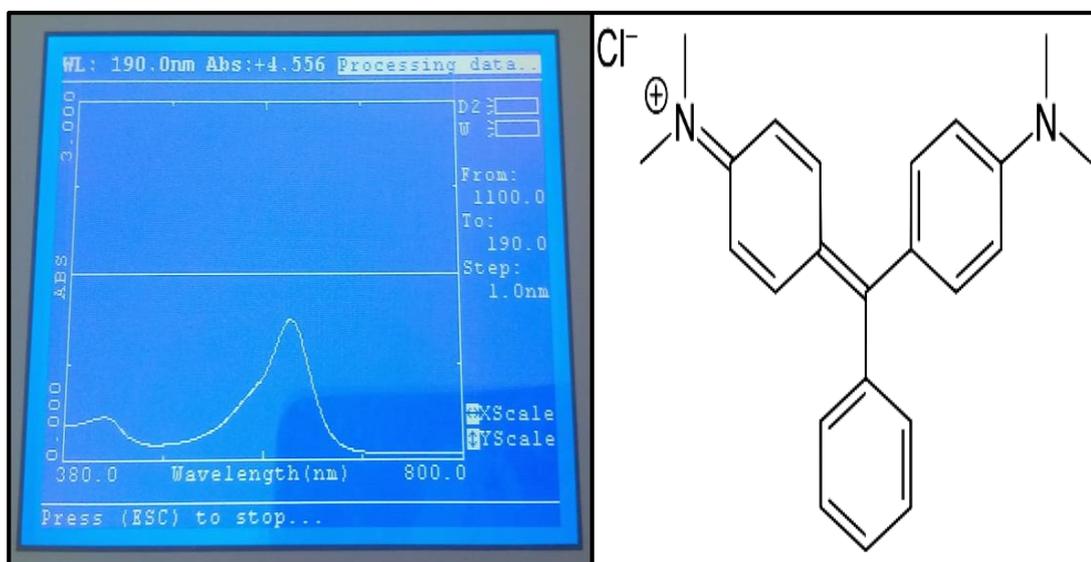


Figura. 22. Espectro de absorbancia y estructura química del colorante verde malaquita.

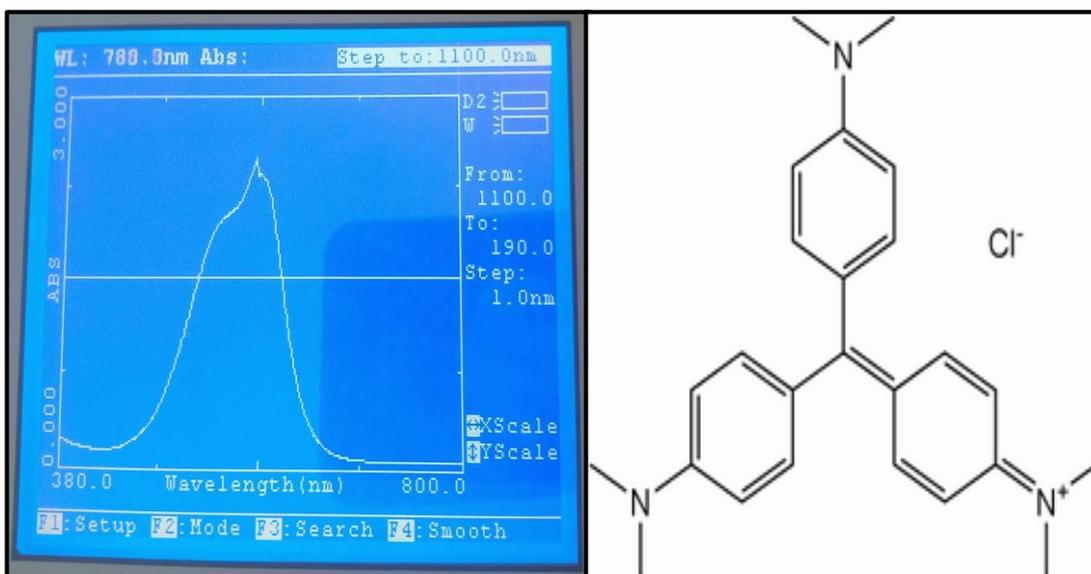


Figura. 23. Espectro de absorbancia y estructura química del colorante cristal violeta.

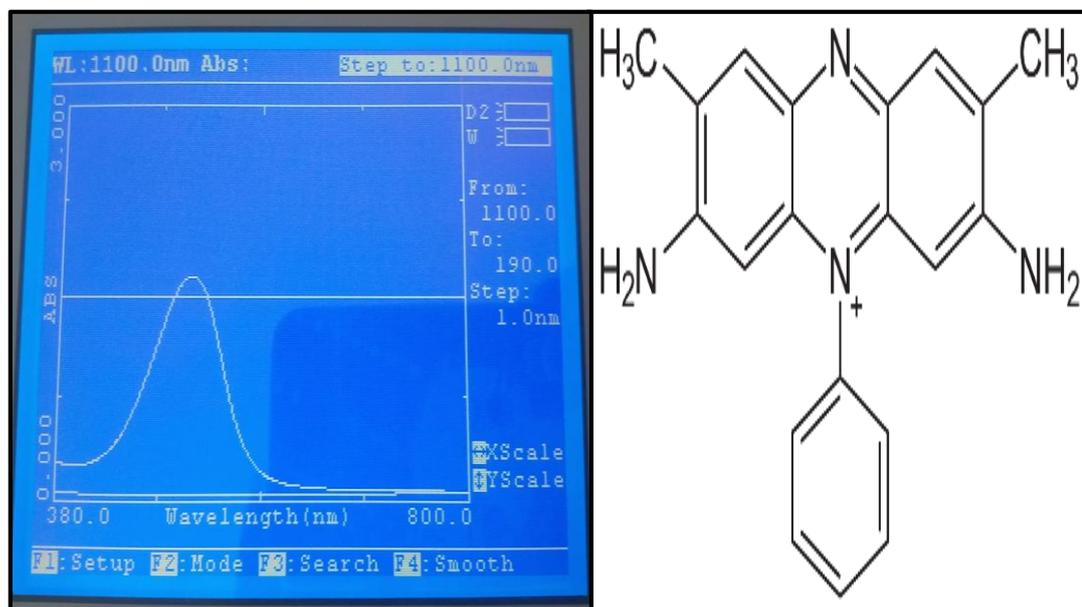


Figura. 24. Espectro de absorbancia y estructura química del colorante safranina.

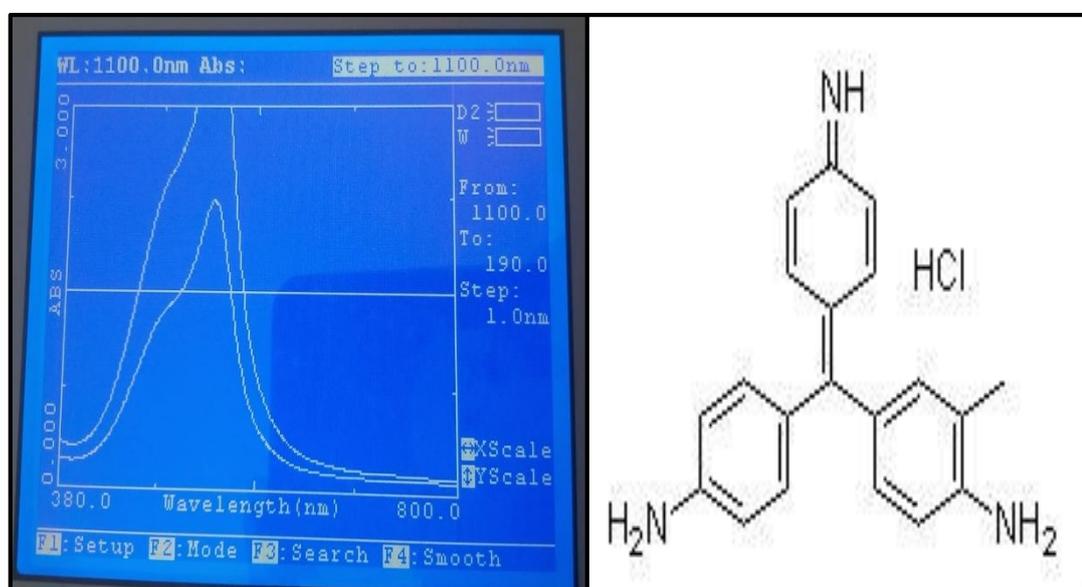


Figura. 25. Espectro de absorbancia y estructura química del colorante fucsina.

Anexo 02. Prueba estadística de Kruskal – Wallis entre los porcentajes de decoloración en los colorantes trifenilmetanos y azoico.

A) Prueba de Kruskal – Wallis en verde de malaquita a 50 ppm.

Rangos		
Colorante Verde de malaquita a 50 ppm	N	Rango promedio
	SC01	2
	RVC03	2
	RVC06	2
	SC07	2
Porcentaje de decoloración	RVC12	2
	SC14	2
	SC23	2
	SC24	2
	Total	16

Estadísticos de prueba ^{a,b}	
	Porcentaje de decoloración
Chi-cuadrado	13,432
GI	7
Sig. asintótica	,062

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: Colorante Verde de malaquita a 50 ppm

B) Prueba de Kruskal – Wallis en cristal violeta a 50 ppm.

Rangos		
Colorante Cristal violeta a 50 ppm	N	Rango promedio
	SC01	2
	RVC03	2
	RVC06	2
	SC07	2
Porcentaje de decoloración	RVC12	2
	SC14	2
	SC23	2
	SC24	2
	Total	16

Estadísticos de prueba^{a,b}	
	Porcentaje de decoloración
Chi-cuadrado	12,485
GI	7
Sig. asintótica	,086

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: Colorante
Cristal violeta a 50 ppm

C) Prueba de Kruskal – Wallis en safranina a 50 ppm.

Rangos		
Colorante Safranina a 50 ppm	N	Rango promedio
	SC01	2
	RVC03	2
	RVC06	2
	SC07	2
	RVC08	2
Porcentaje de decoloración	RVC12	2
	SC13	2
	SC14	2
	SC23	2
	SC24	2
	Total	16

Estadísticos de prueba ^{a,b}	
	Porcentaje de decoloración
Chi-cuadrado	14,279
GI	9
Sig. asintótica	,113

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: Colorante Safranina a 50 ppm

D) Prueba de Kruskal – Wallis en safranina a 100 ppm.

Rangos		
Colorante safranina a 100 ppm	N	Rango promedio
SC01	2	6,50
RVC06	2	13,50
SC07	2	1,50
RVC08	2	9,50
Porcentaje de decoloración RVC12	2	10,00
SC13	2	15,50
SC23	2	3,50
SC24	2	8,00
Total	16	

Estadísticos de prueba^{a,b}	
	Porcentaje de decoloración
Chi-cuadrado	13,721
GI	7
Sig. asintótica	,056

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: Colorante Safranina a 100 ppm

Anexo 03. Informes de resultados de confirmación de 10 especies de hongos, realizados en el Instituto Nacional de Salud (INS).



MINISTERIO DE SALUD DE PERÚ
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
 ORGANISMO PÚBLICO EJECUTOR DEL SECTOR SALUD
"Investigar para proteger la salud"

INFORME DE RESULTADO

CODIGO DE ORIGEN	S-C01		
ESTABLECIMIENTO	UNIV.NAC.SAN LUIS GONZAGA		
LABORATORIO	MICOLOGIA		
ENFERMEDAD	MICOSIS		
MÉDICO			
DOC REFERENCIA	OF002FCBDUNICA2019	FECHA DE OBTENCION DE MUESTRA	07/01/2019
TIPO DE MUESTRA	CEPA	FECHA DE RECEPCION LAB REG	
CODIGO DE MUESTRA	INS013235119	FECHA DE RECEPCION EN INS	23/01/2019

PRUEBAS

CULTIVO Y TIPIFICACION DE MUESTRAS AMBIENTALES	Res Laboratorio de Origen:	Res Lab Referencial	COMENTARIOS
TIPIFICACION DE MUESTRAS AMBIENTALES		Fecha:28/01/2019	ASPERGILLUS NIGER

Observaciones:

Capac Yupanqui 1400 Telefono 4719920 Jesus Maria Lima 11



COORD. DE LABORATORIO:
 Susana Zurita Macalupu
 CMP - 20100

Fecha: 28/01/2019 Hora: 1:01 p.m.

Figura. 26. Informe de resultado de la identificación de *Aspergillus niger*.



MINISTERIO DE SALUD DE PERÚ
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
ORGANISMO PÚBLICO EJECUTOR DEL SECTOR SALUD
"Investigar para proteger la salud"

INFORME DE RESULTADO

CODIGO DE ORIGEN RV-C03
ESTABLECIMIENTO UNIV.NAC.SAN LUIS GONZAGA
LABORATORIO MICOLOGIA
ENFERMEDAD MICOSIS
MÉDICO
DOC REFERENCIA OF002FCBDUNICA2019
TIPO DE MUESTRA CEPA
CODIGO DE MUESTRA INS013234719
FECHA DE OBTENCION DE MUESTRA 07/01/2019
FECHA DE RECEPCION LAB REG
FECHA DE RECEPCION EN INS 23/01/2019

PRUEBAS

CULTIVO Y TIPIFICACION DE MUESTRAS AMBIENTALES	Res Laboratorio de Origen:	Res Lab Referencial	COMENTARIOS
TIPIFICACION DE MUESTRAS AMBIENTALES		Fecha:28/01/2019 Alternaria alternata	

Observaciones:



COORD. DE LABORATORIO:
Susana Zurita Macalupu
CMP - 20100

Capac Yupanqui 1400 Telefono 4719920 Jesus Maria Lima 11

Fecha: 28/01/2019 Hora: 1:01 p.m.

Figura. 27. Informe de resultado de la identificación de *Alternaria alternata*.



MINISTERIO DE SALUD DE PERÚ
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
ORGANISMO PÚBLICO EJECUTOR DEL SECTOR SALUD
"Investigar para proteger la salud"

INFORME DE RESULTADO

CODIGO DE ORIGEN RV-C06
ESTABLECIMIENTO UNIV.NAC.SAN LUIS GONZAGA
LABORATORIO MICOLOGIA
ENFERMEDAD MICOSIS
MÉDICO
DOC REFERENCIA OF002FCBDUNICA2019
TIPO DE MUESTRA CEPA
CODIGO DE MUESTRA INS013234819

FECHA DE OBTENCION DE MUESTRA 07/01/2019
FECHA DE RECEPCION LAB REG
FECHA DE RECEPCION EN INS 23/01/2019

PRUEBAS

CULTIVO Y TIPIFICACION DE MUESTRAS AMBIENTALES	Res Laboratorio de Origen:	Res Lab Referencial	COMENTARIOS
TIPIFICACION DE MUESTRAS AMBIENTALES		Fecha:28/01/2019 Penicillium chrysogenum	

Observaciones:



COORD. DE LABORATORIO:
Susana Zurita Macalupu
CMP - 20100

Capac Yupanqui 1400 Telefono 4719920 Jesus Maria Lima 11

Fecha: 28/01/2019 Hora: 1:01 p.m.

Figura. 28. Informe de resultado de la identificación de *Penicillium chrysogenum*.



MINISTERIO DE SALUD DE PERÚ
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
ORGANISMO PÚBLICO EJECUTOR DEL SECTOR SALUD
"Investigar para proteger la salud"

INFORME DE RESULTADO

CODIGO DE ORIGEN	S-C07		
ESTABLECIMIENTO	UNIV.NAC.SAN LUIS GONZAGA		
LABORATORIO	MICOLOGIA		
ENFERMEDAD	MICOSIS		
MÉDICO			
DOC REFERENCIA	OF002FCBDUNICA2019	FECHA DE OBTENCION DE MUESTRA	07/01/2019
TIPO DE MUESTRA	CEPA	FECHA DE RECEPCION LAB REG	
CODIGO DE MUESTRA	INS013235219	FECHA DE RECEPCION EN INS	23/01/2019

PRUEBAS

CULTIVO Y TIPIFICACION DE MUESTRAS AMBIENTALES	Res Laboratorio de Origen:	Res Lab Referencial Fecha:28/01/2019	COMENTARIOS
TIPIFICACION DE MUESTRAS AMBIENTALES		aSPERGILLUS SP.	Aspergillus nidulans

Observaciones:



COORD. DE LABORATORIO:
Susana Zurita Macalupu
CMP - 20100

Capac Yupanqui 1400 Telefono 4719920 Jesus Maria Lima 11

Fecha: 28/01/2019 Hora: 1:01 p.m.

Figura. 29. Informe de resultado de la identificación de *Aspergillus nidulans*.



MINISTERIO DE SALUD DE PERÚ
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
ORGANISMO PÚBLICO EJECUTOR DEL SECTOR SALUD
"Investigar para proteger la salud"

INFORME DE RESULTADO

CODIGO DE ORIGEN RV-C08
ESTABLECIMIENTO UNIV.NAC.SAN LUIS GONZAGA
LABORATORIO MICOLOGIA
ENFERMEDAD MICOSIS
MÉDICO
DOC REFERENCIA OF002FCBDUNICA2019
TIPO DE MUESTRA CEPA
CODIGO DE MUESTRA INS013234919

FECHA DE OBTENCION DE MUESTRA 07/01/2019
FECHA DE RECEPCION LAB REG
FECHA DE RECEPCION EN INS 23/01/2019

PRUEBAS

CULTIVO Y TIPIFICACION DE MUESTRAS AMBIENTALES	Res Laboratorio de Origen:	Res Lab Referencial Fecha:28/01/2019	COMENTARIOS
TIPIFICACION DE MUESTRAS AMBIENTALES		NIGROSPORA SP	

Observaciones:



COORD. DE LABORATORIO:
Susana Zurita Macalupu
CMP - 20100

Capac Yupanqui 1400 Telefono 4719920 Jesus Maria Lima 11

Fecha: 28/01/2019 Hora: 1:01 p.m.

Figura. 30. Informe de resultado de la identificación de *Nigrospora sp.*



MINISTERIO DE SALUD DE PERÚ
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
ORGANISMO PÚBLICO EJECUTOR DEL SECTOR SALUD
"Investigar para proteger la salud"

INFORME DE RESULTADO

CODIGO DE ORIGEN RV-C12
ESTABLECIMIENTO UNIV.NAC.SAN LUIS GONZAGA
LABORATORIO MICOLOGIA
ENFERMEDAD MICOSIS
MÉDICO
DOC REFERENCIA OF002FCBDUNICA2019
TIPO DE MUESTRA CEPA
CODIGO DE MUESTRA INS013235019

FECHA DE OBTENCION DE MUESTRA 07/01/2019
FECHA DE RECEPCION LAB REG
FECHA DE RECEPCION EN INS 23/01/2019

PRUEBAS

CULTIVO Y TIPIFICACION DE MUESTRAS AMBIENTALES	Res Laboratorio de Origen:	Res Lab Referencial	COMENTARIOS
TIPIFICACION DE MUESTRAS AMBIENTALES		Fecha:28/01/2019 HIALOFOMICETO	

Observaciones:



COORD. DE LABORATORIO:
Susana Zurita Macalupu
CMP - 20100

Capac Yupanqui 1400 Telefono 4719920 Jesus María Lima 11

Fecha: 28/01/2019 Hora: 1:01 p.m.

Figura. 31. Informe de resultado de la identificación de Hialofomiceto.



MINISTERIO DE SALUD DE PERÚ
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
ORGANISMO PÚBLICO EJECUTOR DEL SECTOR SALUD
"Investigar para proteger la salud"

INFORME DE RESULTADO

CODIGO DE ORIGEN S-C13
ESTABLECIMIENTO UNIV.NAC.SAN LUIS GONZAGA
LABORATORIO MICOLOGIA
ENFERMEDAD MICOSIS
MÉDICO
DOC REFERENCIA OF002FCBDUNICA2019 FECHA DE OBTENCION DE MUESTRA 23/01/2019
TIPO DE MUESTRA CEPA FECHA DE RECEPCION LAB REG
CODIGO DE MUESTRA INS013235319 FECHA DE RECEPCION EN INS 23/01/2019

PRUEBAS

CULTIVO Y TIPIFICACION DE MUESTRAS AMBIENTALES	Res Laboratorio de Origen:	Res Lab Referencial	COMENTARIOS
TIPIFICACION DE MUESTRAS AMBIENTALES		Fecha:28/01/2019 Penicillium expansum	

Observaciones:



COORD. DE LABORATORIO:
Susana Zurita Macalupu
CMP - 20100

Capac Yupanqui 1400 Telefono 4719920 Jesus Maria Lima 11

Fecha: 28/01/2019 Hora: 1:01 p.m.

Figura. 32. Informe de resultado de la identificación de *Penicillium expansum*.



MINISTERIO DE SALUD DE PERÚ
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
ORGANISMO PÚBLICO EJECUTOR DEL SECTOR SALUD
"Investigar para proteger la salud"

INFORME DE RESULTADO

CODIGO DE ORIGEN S-C14
ESTABLECIMIENTO UNIV.NAC.SAN LUIS GONZAGA
LABORATORIO MICOLOGIA
ENFERMEDAD MICOSIS
MÉDICO
DOC REFERENCIA OF002FCBDUNICA2019
TIPO DE MUESTRA CEPA
CODIGO DE MUESTRA INS013235419
FECHA DE OBTENCION DE MUESTRA 07/01/2019
FECHA DE RECEPCION LAB REG
FECHA DE RECEPCION EN INS 23/01/2019

PRUEBAS

CULTIVO Y TIPIFICACION DE MUESTRAS AMBIENTALES	Res Laboratorio de Origen:	Res Lab Referencial	COMENTARIOS
TIPIFICACION DE MUESTRAS AMBIENTALES		Fecha:06/02/2019 OIDIODENDRON SP.	

Observaciones:



COORD. DE LABORATORIO:
Susana Zurita Macalupu
CMP - 20100

Capac Yupanqui 1400 Telefono 4719920 Jesus Maria Lima 11

<https://www.netlab.ins.gob.pe>

Fecha: 06/02/2019 Hora: 4:04 p.m.

Usted se encuentra en una zona segura

Figura. 33. Informe de resultado de la identificación de *Oideodendron sp.*



MINISTERIO DE SALUD DE PERÚ
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
ORGANISMO PÚBLICO EJECUTOR DEL SECTOR SALUD
"Investigar para proteger la salud"

INFORME DE RESULTADO

CODIGO DE ORIGEN S-C23
ESTABLECIMIENTO UNIV.NAC.SAN LUIS GONZAGA
LABORATORIO MICOLOGIA
ENFERMEDAD MICOSIS
MÉDICO
DOC REFERENCIA OF002FCBDUNICA2019 FECHA DE OBTENCION DE MUESTRA 07/01/2019
TIPO DE MUESTRA CEPA FECHA DE RECEPCION LAB REG
CODIGO DE MUESTRA INS013235519 FECHA DE RECEPCION EN INS 23/01/2019

PRUEBAS

CULTIVO Y TIPIFICACION DE MUESTRAS AMBIENTALES	Res Laboratorio de Origen:	Res Lab Referencial	COMENTARIOS
TIPIFICACION DE MUESTRAS AMBIENTALES		Fecha:28/01/2019	ASPERGILLUS FLAVUS

Observaciones:



COORD. DE LABORATORIO:
Susana Zurita Macalupu
CMP - 20100

Capac Yupanqui 1400 Teléfono 4719920 Jesus Maria Lima 11

Fecha: 28/01/2019 Hora: 1:01 p.m.

Figura. 34. Informe de resultado de la identificación de *Aspergillus flavus* 1.



MINISTERIO DE SALUD DE PERÚ
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
ORGANISMO PÚBLICO EJECUTOR DEL SECTOR SALUD
"Investigar para proteger la salud"

INFORME DE RESULTADO

CODIGO DE ORIGEN	S-C24		
ESTABLECIMIENTO	UNIV.NAC.SAN LUIS GONZAGA		
LABORATORIO	MICOLOGIA		
ENFERMEDAD	MICOSIS		
MÉDICO			
DOC REFERENCIA	OF002FCBDUNICA2019	FECHA DE OBTENCION DE MUESTRA	07/01/2019
TIPO DE MUESTRA	CEPA	FECHA DE RECEPCION LAB REG	
CODIGO DE MUESTRA	INS013235619	FECHA DE RECEPCION EN INS	23/01/2019

PRUEBAS

CULTIVO Y TIPIFICACION DE MUESTRAS AMBIENTALES	Res Laboratorio de Origen:	Res Lab Referencial	COMENTARIOS
TIPIFICACION DE MUESTRAS AMBIENTALES		Fecha:28/01/2019	ASPERGILLUS FLAVUS

Observaciones:



COORD. DE LABORATORIO:
Susana Zurita Macalupu
CMP - 20100

Capac Yupanqui 1400 Telefono 4719920 Jesus Maria Lima 11

Fecha: 28/01/2019 Hora: 1:01 p.m.

<https://www.netlab.ins.gob.pe>

Usted se encuentra en una zona segura

Figura. 35. Informe de resultado de la identificación de *Aspergillus flavus* 2.

Anexo 04. Cálculos de las concentraciones para la preparación del medio de cultivo más colorante.

Cálculos de concentraciones en ppm

Para la concentración de 50, 100, 200 y 1000 ppm

Ejm: Preparación del colorante verde malaquita (vm) a 50 ppm:

CC del colorante verde malaquita		Cantidad del agar o caldo papa dextrosa
1 ppm	_____	1 mg _____ 1 L
50 ppm	_____	50 mg _____ 1000 mL

➡ Preparar 400 mL de caldo papa dextrosa a 50 ppm o 50 mg

$$\begin{array}{r} 50 \text{ mg} \quad \text{_____} \quad 1000 \text{ mL} \\ X \quad \text{_____} \quad 400 \text{ mL} \\ \hline X = 20 \text{ mg o } 0.02 \text{ g} \end{array}$$

Pesar 0.02 g y diluir en 400 mL de agar o caldo papa dextrosa me daría una concentración de 50 ppm

➡ Este procedimiento se repite en los demás colorantes ensayados.