

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**REMOCIÓN DE DETERGENTES DE AGUAS
RESIDUALES TEXTILES EMPLEANDO HONGOS
SELECCIONADOS OBTENIDOS A PARTIR DE
EFLUENTES DE INDUSTRIA TEXTIL Y EVALUACIÓN
DE SU TOLERANCIA A METALES PESADOS A NIVEL
DE LABORATORIO.**

Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

CAROL ANDREA YÉPEZ GUERRERO

SANGOLQUÍ, 15 de Diciembre del 2011.

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

CAROL ANDREA YÉPEZ GUERRERO

COORDINADOR DE LA CARRERA

INGENIERA GRACE TATIANA PÁEZ BARRERA

Lugar y fecha: Sangolquí, 15 de Diciembre del 2011.

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la SRTA. CAROL ANDREA YÉPEZ GUERRERO como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA.

Sangolquí, 15 de Diciembre del 2011.

Directora del Proyecto,

Lic. Biol. Alma Koch, M.C.

Codirectora del Proyecto,

Dra. Blanca Naranjo

DEDICATORIA

*“Esforzaos y cobrad ánimo, porque tu Dios
va contigo, no te dejará ni desampará”.*

Deuteronomio 31,6

A mis padres:

Jaime Yépez y Ximena Guerrero, por ser el mejor ejemplo de amor, esfuerzo y sacrificio que me ha permitido culminar con éxito ésta meta en mi vida.

A mis hermanos:

Nicole y Juan Carlos Yépez por todo su cariño y apoyo que los hace más que mis hermanos, mis compañeros de vida.

A mis angelitos del cielo:

Coronel Jaime Guerrero Rivas y Laura Yépez, que a pesar de no tenerlos conmigo yo sé que desde el cielo me cuidan y están orgullosos de este logro. Quiero que sepan que lo que soy como persona, es por todo el cariño, amor y tiempo que me dieron en mi niñez, con quienes compartí grandes momentos de mi vida. Nunca dejen de estar en mi corazón, les quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, porque durante toda mi vida es quien ha guiado mi camino, me ha llenado de bendiciones y sabiduría, ha sido mi roca fuerte en cada momento de mi vida y me ha demostrado que él es el principio y el fin, por esto mi gloria y agradecimiento solo a él, quien me permitió culminar con éxito ésta etapa de mi vida.

A mi directora de tesis, M.C. Alma Koch por la oportunidad de desarrollar ésta investigación confiando en mí trabajo. Gracias por sus consejos, comprensión y paciencia en cada momento compartido, no solo durante ésta etapa pues desde las aulas recibí sus conocimientos y apoyo incondicional.

A mi codirectora de tesis, Dra. Blanca Naranjo por ser el soporte de ésta investigación pues sin su guía y sabiduría la culminación de ésta investigación no hubiera sido posible. Gracias por brindarme su confianza y cariño.

A mi papá, Jaime Antonio Yépez (Peter) por su apoyo y cariño incondicional, por sus palabras de aliento en los momentos difíciles, por ser mi chofer y siete oficios, gracias por confiar en mí sin ninguna duda.

A mi mamá, Ximena Guerrero por sus oraciones, por creer en mí e impulsarme siempre a salir adelante y luchar por lo que quiero, por buscar siempre lo mejor para mí sin importar el precio que sea necesario pagar.

A mis hermanos, por ser mi razón para seguir adelante, por ser mi apoyo en los buenos y malos momentos. Gracias a Nicole, porque es la estrellita de mi vida y por su cariño sincero; a Juan Carlos, gracias por sus palabras de ánimo, por confiar en mí, por tener la palabra justa siempre que lo necesito.

A mi abuelita, María Elisa por ser la piedra angular de toda la familia, gracias por darme la oportunidad de tenerle a mi lado y disfrutarle cada día de su vida, gracias por todas sus oraciones, apoyo y cariño.

A mi tía, Susi gracias por ser un ejemplo de mujer, madre y hermana para mí, solo quiero que sepa que sin su cariño sincero, su preocupación y apoyo este logro no habría sido posible, usted es mucho más que mi tía, es una persona muy especial para mí.

A mis tías, María del Carmen y Marianita por ser una pieza importante que complementa mi vida, por quererme tanto y demostrármelo en cada instante, porque cuando he necesitado me han ayudado en todo momento ya sea de chofer, cocineras, pintoras, dibujantes entre otras ocupaciones mas.

A todos mis compañeros y amigos que durante todo este tiempo me han apoyado, me han permitido disfrutar con cada uno buenos y malos momentos que con el tiempo han sido y serán lindos recuerdos que forman parte de mi vida. Quiero que sepan que ustedes, mis amigos, son muy importantes para mí y que su presencia en estos seis años ha marcado mi vida. Le agradezco a Dios por haberme dado la oportunidad de conocerles, de todo corazón gracias a Pato V., Pato O., José, Danilo, Dany, Naya, Dolly, Gaby V., Iván y Karen. No puedo olvidarme de tres personas muy especiales para mí Adri, Belén y Wlady, les quiero mucho.

Quiero agradecer a Javo y Aleja por haber compartido todos los momentos de estudio y sacrificio sin dejar de disfrutar de los buenos tiempos entre amigos, gracias por su apoyo y esfuerzo pues juntos aprendimos a salir adelante, superando todo obstáculo sin importar cual sea.

Dejo constancia de mi gratitud y cariño a mis dos amigos Gaby Z. y Gus, por todo el tiempo y experiencias compartidas, porque han calado en lo más profundo de mi corazón, han llegado a ser más que mis amigos. Mi Gaby de todo corazón gracias por tu amistad sincera, siempre juntitas, mis palabras quedan cortas para decirte lo mucho que te quiero.

Un agradecimiento especial a Gustavo Velásquez (Alien - Amagu), por tu amistad y apoyo incondicional, porque me enseñaste a ver la vida de diferente manera y a disfrutarla, a levantarme si me caigo las veces que sean necesarias tomando en cuenta que gracias a personas como tú siempre lo voy a poder hacer. Te quiero mucho mi Gus y espero que Dios te bendiga porque te lo mereces, este logro no habría podido ser concluido sin tu confianza y cariño, solo puedo decir Gracias.

Carol Andrea Yépez Guerrero

ÍNDICE CONTENIDOS

| | |
|--|------|
| HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS | ii |
| CERTIFICACIÓN | iii |
| DEDICATORIA..... | iv |
| AGRADECIMIENTOS | v |
| LISTADO DE TABLAS | xi |
| LISTADO FIGURAS..... | xiii |
| LISTADO DE ANEXOS..... | xiv |
| RESUMEN | xv |
| ABSTRACT | xvii |
| ABREVIATURAS | xix |
| CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1. ANTECEDENTES..... | 1 |
| 1.2. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DEL PROBLEMA A RESOLVER . | 5 |
| 1.3. OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO | 9 |
| 1.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 9 |
| 1.5. MARCO TEÓRICO | 10 |
| 1.5.1. Industria Textil | 10 |
| 1.5.2. Metales Pesados | 11 |
| 1.5.3. Biodisponibilidad..... | 14 |
| 1.5.4. Detergentes..... | 15 |
| 1.5.5. Norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes: Recurso Agua, de acuerdo a TULAS y al Municipio Metropolitano de Quito. | 17 |
| 1.5.6. Hongos..... | 18 |
| 1.5.7. Microorganismos y metales pesados. | 19 |
| 1.5.8. Mecanismos de tolerancia a metales pesados en hongos. | 21 |

| | |
|---|----|
| 1.5.9. Remoción de Tensoactivos con hongos..... | 21 |
| 1.6. HIPÓTESIS..... | 22 |
| CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS..... | 23 |
| 2.1. Participantes..... | 23 |
| 2.1.1. Escuela Politécnica del Ejército..... | 23 |
| 2.1.2. Personas..... | 23 |
| 2.2. Zona de estudio..... | 24 |
| 2.2.1. Laboratorio..... | 24 |
| 2.2.2. Campo..... | 24 |
| 2.3. Período de tiempo de investigación..... | 24 |
| 2.4. Diseño Experimental..... | 25 |
| 2.4.1. Diseño para la tolerancia de metales pesados y detergentes con hongos..... | 25 |
| 2.4.2. Diseño para la remoción de detergentes con hongos..... | 26 |
| 2.5. METODOLOGÍA..... | 27 |
| 2.5.1. Diseño de la Investigación..... | 27 |
| 2.5.2. Métodos..... | 27 |
| CAPÍTULO 3: RESULTADOS..... | 36 |
| 3.1. Tolerancia de Hongos seleccionados a metales pesados..... | 36 |
| 3.1.1. Cultivo y crecimiento de hongos en medio sólido AEM..... | 36 |
| 3.1.2. Evaluación de la tolerancia a metales con hongos..... | 39 |
| 3.2. Tolerancia de los hongos a detergentes..... | 47 |
| 3.2.1. Cultivo y crecimiento de hongos en medio sólido AEM..... | 47 |
| 3.2.2. Evaluación de la tolerancia a detergentes con hongos..... | 50 |
| 3.2.3. Remoción de detergentes por hongos seleccionados..... | 53 |
| CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN..... | 60 |
| 4.1. Concentraciones de metales pesados y detergentes elegidas para el estudio..... | 60 |

| | |
|--|--------------------------------------|
| 4.2. Tolerancia de los hongos a metales pesados..... | 61 |
| 4.3. Producción de Biomasa..... | 63 |
| 4.4. Tolerancia y remoción de tensioactivos..... | 63 |
| 4.5. Método de SAAM..... | 65 |
| CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES..... | 66 |
| CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES..... | 67 |
| CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA..... | 68 |
| CAPÍTULO 8: ANEXOS..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD | 76 |
| CERTIFICACIÓN | 77 |
| AUTORIZACIÓN..... | 78 |

LISTADO DE TABLAS

| | |
|---|-----------|
| <i>Tabla 1. Principales sustancias contaminantes del sector industrial (Echarri, 2009).....</i> | <i>12</i> |
| <i>Tabla 2. Principales orígenes antropogénicos de los metales pesados (Realpe, 2009).....</i> | <i>14</i> |
| <i>Tabla 3. Tratamientos aplicados en el proceso de tolerancia a metales.....</i> | <i>25</i> |
| <i>Tabla 4. Tratamientos aplicados en el proceso de tolerancia a detergentes. ..</i> | <i>25</i> |
| <i>Tabla 5. Tratamientos aplicados en el proceso de remoción de detergentes. .</i> | <i>26</i> |
| <i>Tabla 6. Soluciones del Método de Sustancias Activas al Azul de Metileno (SAAM) (Standard Methods, 2005).....</i> | <i>32</i> |
| <i>Tabla 7. ANOVA para el experimento tolerancia de metales cromo con Hongos.</i> | <i>40</i> |
| <i>Tabla 8. Prueba de Duncan para similitud de medias del factor Hongo según la concentración de cromo.....</i> | <i>41</i> |
| <i>Tabla 9. ANOVA para el experimento tolerancia de metales cobre con Hongos.</i> | <i>42</i> |
| <i>Tabla 10. Prueba de Duncan para similitud de medias del factor Hongo según la concentración de cobre.....</i> | <i>42</i> |
| <i>Tabla 11. ANOVA para el experimento tolerancia de metales zinc con Hongos.</i> | <i>43</i> |
| <i>Tabla 12. Prueba de Duncan para similitud de medias del factor Hongo según la concentración de zinc.....</i> | <i>44</i> |
| <i>Tabla 13. ANOVA para el experimento tolerancia de metales hierro con Hongos.....</i> | <i>45</i> |
| <i>Tabla 14. Prueba de Duncan para similitud de medias del factor Hongo según la concentración de hierro.....</i> | <i>45</i> |
| <i>Tabla 15. ANOVA para el experimento tolerancia de detergentes con Hongos.</i> | <i>51</i> |
| <i>Tabla 16. Prueba de Duncan para similitud de medias del factor Hongo según la concentración de detergentes.</i> | <i>51</i> |
| <i>Tabla 17. ANOVA para el experimento remoción de detergentes con Hongos a partir de 0,5 mg.L⁻¹.....</i> | <i>55</i> |

| | |
|--|-----------|
| <i>Tabla 18. Prueba de Duncan para similitud de medias del factor Hongo según la remoción de detergentes.....</i> | <i>56</i> |
| <i>Tabla 19. ANOVA para el experimento remoción de detergentes con Hongos a partir de 5 mg.L⁻¹.....</i> | <i>57</i> |
| <i>Tabla 20. Prueba de Duncan para similitud de medias del factor Hongo según la remoción de detergentes.....</i> | <i>58</i> |

LISTADO FIGURAS

| | |
|--|----|
| <i>Figura 1. Biomasa seca obtenida del Hongo C1-BA.....</i> | 29 |
| <i>Figura 2. Diferencia entre fase acuosa y fase orgánica.....</i> | 33 |
| <i>Figura 3. Formación del par iónico: tensioactivo aniónico (AS) - azul de metileno (MB), Lechuga, 2005.....</i> | 34 |
| <i>Figura 4. Tolerancia a metales del hongo C7-AL.....</i> | 36 |
| <i>Figura 5. Tolerancia a metales del hongo C2-BL.....</i> | 37 |
| <i>Figura 6. Tolerancia a metales del hongo C1-BA.....</i> | 38 |
| <i>Figura 7. Tolerancia a metales del hongo C18-BL.....</i> | 38 |
| <i>Figura 8. Tolerancia a metales del hongo C20-AL.....</i> | 39 |
| <i>Figura 9. Medias Marginales para las Interacciones hongo-metal.....</i> | 46 |
| <i>Figura 10. Crecimiento del hongo C18-BL tolerante a detergentes.....</i> | 47 |
| <i>Figura 11. Crecimiento del hongo C1-BA tolerante a detergentes.....</i> | 48 |
| <i>Figura 12. Crecimiento del hongo C2-BL tolerante a detergentes.....</i> | 48 |
| <i>Figura 13. Crecimiento del hongo C7-AL, tolerante a detergentes.....</i> | 49 |
| <i>Figura 14. Crecimiento del hongo C20-AL tolerante a detergentes.....</i> | 50 |
| <i>Figura 15. Interacción peso seco según las concentraciones de detergentes.....</i> | 52 |
| <i>Figura 16. Curva promedio de calibración para la determinación de la concentración de tensioactivo degradada por los hongos seleccionados.....</i> | 53 |
| <i>Figura 17. Ensayo de remoción de detergentes con cinco cultivos de hongos.....</i> | 54 |
| <i>Figura 18. Remoción de detergentes con Hongos a 0,5 mg.L⁻¹.....</i> | 56 |
| <i>Figura 19. Remoción de detergentes con Hongos a 5 mg.L⁻¹.....</i> | 58 |
| <i>Figura 20. Medición de la concentración de 0,5 mg.L⁻¹ de tensioactivo aniónico después de su remoción por los cultivos de hongos: (A) C2-BL, (B) C20-AL, (C) C18-BL, (D) C1-BA, (E) C7-AL.....</i> | 59 |
| <i>Figura 21. Medición de la concentración de 5 mg.L⁻¹ de tensioactivo aniónico después de su remoción por los cultivos de hongos: (A) C2-BL, (B) C20-AL, (C) C18-BL, (D) C1-BA, (E) C7-AL.....</i> | 59 |

LISTADO DE ANEXOS

Anexo A. Límites de descarga a un cuerpo de agua dulce (TULAS). ¡Error!

Marcador no definido.

Anexo B. Límites permisibles emitidos por la Dirección Metropolitana de Medio Ambiente de Quito. ¡Error! Marcador no definido.

Anexo C. Resultados confidenciales de análisis de laboratorio de las aguas residuales de una empresa textil antes de ser tratadas.¡Error! Marcador no definido.

RESUMEN

La ESPE financió el Proyecto de investigación ESPE – CEINCI 014 (2010): “Selección de hongos eficientes en la biodegradación de materia orgánica y colorantes reactivos, tolerantes a metales, para su uso en biorremediación de aguas residuales de la industria textil”. Para cumplir con los objetivos del proyecto se aisló previamente a nivel de laboratorio hongos de muestras de aguas y lodos residuales recolectadas en los puntos de salida a los cuerpos de agua de una industria textil. Estos hongos se utilizaron en la primera parte de investigación para la remoción de colorantes. Los mejores cultivos o consorcios fueron seleccionados.

Se utilizaron cuatro cultivos y un consorcio de hongos aislados a nivel de laboratorio para evaluar su tolerancia a detergentes y metales pesados. Los metales pesados a evaluarse fueron: cobre (Cu) a 1 y 10 mg.L⁻¹, hierro (Fe) a 10 y 100 mg.L⁻¹, zinc (Zn) a 5 y 50 mg.L⁻¹, cromo (Cr) a 0.5 y 5 mg.L⁻¹; y en detergentes a 0.5 y 5 mg.L⁻¹. La tolerancia se evaluó sembrando los hongos en medios de cultivo Agar Extracto de Malta (AEM) con una alícuota del contaminante, estos medios de cultivo se incubaron durante 15 días a 30 °C y 80% de humedad, posteriormente se realizó un raspado del hongo para mediante la técnica de diferencia de peso seco determinar la tolerancia. En ésta investigación se estudió la tolerancia de los hongos en base a la cantidad producida de biomasa.

De esta manera se determinó que los cuatro cultivos y el consorcio de hongos presentaron tolerancia a metales pesados y detergentes en las dos concentraciones a los que fueron evaluados.

Tomando en cuenta este resultado se realizó la segunda parte de la investigación donde se evaluó la remoción de detergentes con los hongos mencionados. Se sembraron los hongos en Caldo Potato Dextrosa (PDB) con la alícuota de detergente, estos medios se incubaron en agitación a 100 r.p.m. durante 15 días a 30 °C y 80 % de humedad. El medio PDB con el hongo se filtró al vacío y el sobrenadante se utilizó en el Método de Sustancias Activas al Azul de Metileno (SAAM) que determinó el porcentaje de remoción de los detergentes.

Se concluyó que los cuatro cultivos y el consorcio de hongos removieron detergentes, sin embargo dos de ellos presentaron mayor porcentaje de remoción.

ABSTRACT

ESPE granted the project ESPE-CEINCI 014 (2010): "Selection of efficient fungus in the biodegradation of organic material and coloured reactives, with tolerance to metals, in order to be used in bioremediation of residual waters in the textile industry". To reach the objectives of the Project, previously there were isolated at laboratory level, fungus of textile industry samples waters and residual muds which were recollected. These fungus were used in the first part of the investigation to remove colorants.

There were used four isolated fungus and one consortium at laboratory level to evaluate its tolerance to detergents and heavy metals. Heavy metals evaluated were copper (Cu) to 1 y 10 mg.L⁻¹, iron (Fe) to 10 y 100 mg.L⁻¹, zinc (Zn) to 5 y 50 mg.L⁻¹, chrome (Cr) to 0.5 y 5 mg.L⁻¹; and detergents as to 0.5 y 5 mg.L⁻¹. Tolerance was evaluated through incubating a fungus aliquot in Agar's extract of malt crops (AEM). Cultures were incubated for 15 days at 30 °C and 80% of humidity. It was made a backup of the fungus to determinate the tolerance with dry weight method. In this investigation we studied the fungus's tolerance based on the amount of biomass (fungi's mass).

The four isolated cultures and the fungus consortium showed tolerance to heavy metals and detergents within both concentrations evaluated.

Based on this results, it was evaluated the removal of detergents in Potato dextrose broth (PDB), (100 r.p.m., 15 days, 30 °C and 80 % of humidity). Fungus growth obtained was vacuum filtered and the flotating remains were used to run the blue methylene active method (SAAM) in which it was determined the removal percentage of detergents. It was concluded all the fungus removed detergents; however, two of them showed a major of 50 removal percentage.

ABREVIATURAS

ABS: alquil benceno sulfonatos.

AEM: Agar extracto de malta.

AITE: Asociación de Industriales Textiles del Ecuador.

AS: Tensioactivo aniónico.

CEINCI: Centro de Investigaciones Científicas.

DCA: Diseño completamente al azar.

GSH: Glutatión.

LAS: alquil aril sulfonatos.

MB: Azul de metileno.

MT: Metalotioneína.

PDB: Caldo potato dextrosa.

SAAM: Sustancias activas al azul de metileno.

TULAS: Texto Unificado de la Legislación Ambiental Secundaria.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES

Los Laboratorios de la ESPE desarrollan continuamente proyectos de investigación cuyo principal objetivo es proporcionar un servicio a la comunidad aportando con soluciones alternativas para los problemas actuales de la sociedad.

El Laboratorio de Microbiología Ambiental desarrolla, investiga e implementa técnicas de remoción de detergentes de aguas residuales textiles empleando microorganismos seleccionados obtenidos a partir de efluentes de la industria textil y la evaluación de su tolerancia a metales pesados. El uso de estas técnicas es una herramienta útil para evitar la contaminación ambiental y realizar tratamientos de aguas residuales.

Las líneas de investigación de este laboratorio incluyen la ejecución de este proyecto en diferentes concentraciones de los contaminantes a tratar y aislamiento de cultivos de hongos.

La presencia de surfactantes en aguas residuales constituye un problema debido a que los detergentes aniónicos utilizados no son biodegradables. Estos detergentes acarrear serios problemas cuando son vertidos en cuerpos de agua ya que su remoción no es fácil y de acuerdo a su concentración representa un peligro potencial para la sobrevivencia de peces y algas aumentando la susceptibilidad de los organismos acuáticos a otros tóxicos presentes en aguas residuales (Castro & Chunga, 1985).

Otro aspecto importante a considerar es la presencia simultánea (mezcla) de los metales pesados, ya que sus efectos pueden ser tóxicamente sinérgicos o antagónicos (la toxicidad se reduce al mezclarse). Existe cierta dificultad para predecir los efectos reales de los contaminantes en el medio. La causa primaria de la alta toxicidad a nivel químico es que los metales pesados poseen una gran capacidad para unirse con moléculas orgánicas (Realpe, 2009).

La industria textil constituye una importante fuente de ingresos y empleo para muchos países, en particular para países en desarrollo como el Ecuador (Rodríguez, *et al.*, 1999).

La producción de aguas residuales no va a parar, por lo tanto, el propósito del desarrollo de este proyecto es contribuir con la remediación de contaminantes en medios acuáticos, la muerte e intoxicación de seres vivos, aplicando las técnicas mencionadas anteriormente de forma rápida y precisa con microorganismos que remueven los contaminantes de estos efluentes. Se han reportado estudios desde el año de 1971 para remoción de contaminantes de aguas residuales textiles.

Díaz, *et al.*, 2002 aislaron siete hongos (5 *Aspergillus flavus* y 2 *Aspergillus fumigatus*), que crecieron bien en medio Agar Extracto de Malta con 500 mg.L⁻¹ de Plomo y Zinc, y a 200 mg.L⁻¹ de Cobre y Plata, pero no crecieron en presencia de Cadmio, Arsénico y Mercurio.

De igual manera, Cárdenas, *et al.*, 2010; realizaron el aislamiento y caracterización de hongos contaminantes resistentes a metales pesados a partir de agua de diferentes ríos de la Huasteca Potosina. Sembraron alícuotas

de 100 μL en AEM, complementado con 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de diferentes metales pesados. En este trabajo se aislaron 23 hongos con diferente resistencia a los metales analizados los cuales fueron *Alternaria* sp, *Penicillium* sp, *Curvularia* sp, *A. niger*, Micelio estéril, *A. flavus*, *Cephalosporium* sp, *Fusarium* sp y *Cladosporium* sp, lo que coincide con algunos reportes de la literatura (Mendoza, *et al.*, 1994; Díaz, *et al.*, 2002; Cañizares-Villanueva, 2000).

Insu Agro, 2008 y AISE, 2009 establecen que la degradación de tensoactivos en el suelo, ocurre por degradación microbiana en la que participan bacterias (*Pseudomonas* sp, *Arthrobacter* sp, *Bacillus* sp, *entre otros*) y hongos (*Trichoderma* sp, *Penicillium* sp, *Aspergillus* sp, *entre otros*).

La presencia de oxígeno es fundamental en una primera etapa, otros factores que influyen son la presencia de agua y el pH. Además con el estudio determinan que la degradación biótica de los tensoactivos en el suelo genera dióxido de carbono, agua y un incremento en la masa de microorganismos debido a que utilizan a éste como sustrato. Parte del mecanismo oxidativo se ve favorecido por la producción de metabolitos (ácidos grasos) por acción de los microorganismos, generando una especie de emulsificante que facilita el rompimiento de la cadena etoxilada.

Argumedo-Delira, *et al.*, 2009, realizaron una revisión que pretende compilar toda la información actualizada disponible, respecto a la interacción de *Trichoderma* en presencia de contaminantes de origen orgánico (hidrocarburos de petróleo, explosivos y plaguicidas) e inorgánico (metales pesados y cianuro) con el fin de conocer el potencial de este grupo fúngico en la biorremediación de ambientes contaminados.

Además estudios realizados previamente en el laboratorio de Microbiología Ambiental-CEINCI aportan información importante para el desarrollo de ésta investigación, dentro de los trabajos que se mencionan, se encuentran:

- *Paladines, C. (2010) Evaluación de la degradación microbiana de tensoactivos aniónicos a partir de dos consorcios bacterianos, a nivel de laboratorio.*
- *Valenzuela, C. (2010) Selección de hongos para la remoción de colorantes reactivos y materia orgánica, en aguas residuales de la industria textil.*
- *Ayala, D. (2010). Obtención de un inóculo bacteriano, proveniente de suelos contaminados por agua residual textil, capaz de degradar colorantes textiles reactivos en condiciones aerobias a escala de laboratorio.*

Adicionalmente, se consideraron otros estudios que serán utilizados como referencia bibliográfica para el presente proyecto:

- *Biodegradación y toxicidad de tensoactivos comerciales, por Lechuga M., Granada, España, 2005.*
- *Microbial degradation of anionic detergent in natural water, por Pornsawan V., Siwilai E. y Suchart U., Tailandia, 1988.*
- *Microorganismo y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente, por Diana L. Vullo, Buenos Aires, Argentina, 2003.*

- *Ma. Del Pilar Díaz, Ma. de Guadalupe Moctezuma e Ismael Acosta. Aislamiento de hongos resistentes a metales pesados a partir de desechos mineros y su capacidad de remoción de metales pesados y flúor en solución, 2002.*
- *Vílchez, R.; Eliminación de metales pesados en aguas mediante sistemas de lechos sumergidos: estudio microbiológico en las biopelículas, Tesis Doctoral, Universidad de Granada, Granada, España, 2005.*

1.2. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DEL PROBLEMA A RESOLVER

Los inicios de la industria textil ecuatoriana se remontan a la época de la colonia, cuando la lana de oveja era utilizada en los obrajes donde se fabricaban los tejidos.

Actualmente el sector textil genera varias plazas de empleo directo en el país, según estimaciones hechas por la Asociación de Industriales Textiles del Ecuador – AITE, alrededor de 50.000 personas laboran directamente en empresas textiles, y más de 200.000 lo hacen indirectamente, siendo así que una empresa textil puede llegar a consumir un promedio de 386000 litros por día de agua (AITE, 2011).

Este sector industrial genera altas cantidades de aguas residuales, con contaminantes como metales pesados y detergentes, representando un promedio de 3655 m³/mes, con un mínimo de descarga de 25 m³/mes y un máximo de 13420 m³/mes (Da Ros, 1995).

Tomando en cuenta estos datos, es importante tener en cuenta los riesgos que las aguas residuales y sus contaminantes producen en los seres vivos y la naturaleza.

La toxicidad de los metales pesados depende, como se ha mencionado la concentración, la forma química y la persistencia. Un elemento indispensable para un ser vivo en concentraciones traza puede llegar a ser tóxico en concentraciones elevadas. Por otra parte, la mayoría de metales pesados se combina con otras formas químicas, antes de entrar en los organismos o cuando se encuentra en el interior; por tanto, es importante establecer la forma química en la que se encuentran los elementos y así determinar la toxicidad que presentan. La persistencia se define como el tiempo que tarda un contaminante en transformarse en una forma no tóxica (Realpe, 2009).

Los metales pesados están considerados como muy peligrosos para los seres vivos en general, pues poseen toxicidad, en parte debido a su elevada tendencia a bioacumularse (Cortés, 2008).

Evidencias experimentales han llegado a demostrar que el grado de importancia biológica de los iones metálicos pesados con respecto a los sistemas vivos, de los que algunos son oligoelementos, es según el patrón que tienen de disponibilidad en la naturaleza. Además existe una aparente correlación entre la abundancia de los elementos en la corteza terrestre y las necesidades alimentarias de las células microbianas (Realpe, 2009).

Estos metales en cantidades mínimas o traza, pueden ejercer efectos positivos o negativos sobre los seres vivos. Algunos de ellos en determinadas concentraciones, siempre menos al 0.01% de la masa total del organismo, son elementos esenciales para la vida y así el V, Cr, Mo, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn lo son para el hombre. No obstante pequeñas variaciones de sus

concentraciones, tanto disminuciones como incrementos, pueden producir efectos nocivos, a veces graves, crónicos e incluso letales sobre los seres vivos (Tenorio, 2006).

Iguals efectos nocivos pueden ser causados por los metales trazas no esenciales que de forma natural o principalmente como consecuencia de la actividad humana se encuentran, actualmente, en el medio ambiente de forma accesible (Realpe, 2009).

El grado de toxicidad potencial y la biodisponibilidad que un metal pesado presenta en un ambiente dado depende de una serie de factores que si bien están muy interrelacionadas, los hemos clasificado en dos grupos: factores abióticos y bióticos (Realpe, 2009).

El amplio uso que tienen los tensoactivos en la actualidad, ha hecho que se prestara atención a sus consecuencias ambientales, debido al uso indiscriminado y a la formación de espuma en las descargas de efluentes; trayendo como consecuencia la inhibición del proceso de depuración natural, concentración de las impurezas, disminución de la absorción de oxígeno de la atmósfera y de su disolución.

La eutrofización de los lagos es otro de los grandes problemas a causa del aumento de la concentración de fosfatos provenientes de los tensoactivos, provocando un aumento en el crecimiento de biomasa, déficit de oxígeno en capas profundas, aparición de algas, cambio de coloración verde a marrón, entre otros (Castro & Chunga, 1987).

La biodegradabilidad es el proceso en el que intervienen organismos vivos como bacterias, levaduras, hongos, algas o parte de los sistemas de los microorganismos presentes en el ecosistema (Nápoles, 2005).

Un compuesto que es biodegradable, al entrar en contacto con el suelo o el agua, es utilizado por los organismos como sustrato o fuente de energía, lo transforman, mineralizan en el mejor de los casos como oxígeno o agua siendo estos dos productos inocuos para la naturaleza (Meléndez, 2008).

Los productos biodegradables deben tener un enlace que sea reconocido por los microorganismos para que puedan ser reintegrados en la naturaleza. En el caso de los detergentes, los primeros recalcitrantes eran compuestos derivados del petróleo que contaba con una estructura molecular ramificada, haciendo imposible que un microorganismo lo degrade, provocando de esta manera la acumulación en el ambiente.

Posteriormente, aparecen los detergentes fosfatados que si son biodegradables pero introducen en los sistemas lacustres, ríos y suelos gran cantidad de fósforo provocando la eutrofización y la propagación de plantas y microalgas ocasionando un cambio en el equilibrio del ecosistema (Meléndez, 2008).

Por los motivos expuestos, en la presente investigación se evaluará la remoción de detergentes y tolerancia a metales pesados, siendo de utilidad el tratamiento con hongos seleccionados en el laboratorio como suplemento de un íntegro tratamiento de remediación ambiental en sus efluentes.

1.3. OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO

- *Remover detergentes presentes en muestras de aguas residuales textiles a partir de cinco cultivos de hongos previamente seleccionados, tolerantes a metales pesados presentes en las aguas residuales textiles, a nivel de laboratorio.*

1.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- *Identificar y caracterizar los diferentes tipos de detergentes y metales pesados presentes en las muestras de aguas residuales de textiles.*
- *Determinar la tolerancia a metales pesados de los cinco cultivos de hongos seleccionados en medios de cultivo que contienen estos metales.*
- *Determinar la tolerancia a detergentes de los cinco cultivos de hongos seleccionados.*
- *Evaluar la efectividad del proceso de remoción de detergentes determinando el porcentaje de concentración de los mismos, mediante espectrofotometría en cinco cultivos de hongos seleccionados.*

1.5. MARCO TEÓRICO

1.5.1. Industria Textil

La industria textil constituye una importante fuente de ingresos y empleo para muchos países, en particular para países en desarrollo como el Ecuador (Rodríguez, *et al.*, 1999).

Originalmente, un textil se refería a una tela tejida; pero hoy día esta palabra sirve para designar cualquier cosa que se fabrique con fibras o hilazas (fibras unidas con el hilado) (CGPL, 2008).

La industria textil primaria está constituida por sectores diferentes aunque interrelacionados que producen una serie de productos, desde fibras clasificadas hasta productos para el hogar.

Cada uno de estos productos puede ser elaborado con distintos tipos de telas y tras un proceso de fabricación distinto. Uno de los procesos a seguir es el teñido de hilo donde los carretes o bobinas de hilado se someten a un tratamiento con soluciones de sosa cáustica y detergentes (descrude) en máquinas a presión, que eliminan impurezas naturales.

Posteriormente llegan a la unidad de engomado que le da al tejido una resistencia necesaria. Después de ser hilado y quemado, se desengoma previo al teñido, para lo que se remueve el agente encolante que puede ser ácido o enzimático y con enzimas ácidas y detergentes alcalinos (CGPL, 2008).

Durante el proceso de descruce se remueven impurezas naturales adheridas a las fibras y a la tela para acondicionarla para las etapas de blanqueo o tintura. Para el teñido directo se emplean soluciones alcalinas y detergentes en caliente (CGPL, 2008).

1.5.2. Metales Pesados

El término “metal pesado” suele referirse a metales cuyo peso específico es superior a 5 g.cm^{-3} , poseen un peso atómico comprendido entre 63.55 (Cu) y 200.59 (Hg), y tienen un número atómico por encima de 20 (Codina y Pérez, 1993).

Desde el punto de vista de los seres vivos, hay metales pesados que son nutrientes esenciales (Fe, Mn, Zn, Cu y Mo), elementos beneficiosos en ciertas circunstancias (Ni, Cr, V, Ti) y elementos que, por ahora, no se consideran que tengan funciones en los seres vivos como Cd, Hg, Pb (Realpe, 2009).

La contaminación de los ríos se produce, bien por la presencia de compuestos o elementos que normalmente no estarían sin la acción del hombre, o por el aumento de descenso de la concentración normal de las sustancias ya existentes debido a la acción humana (*Echarri, 2009*) como podemos observar en la Tabla 1.

**Tabla 1. Principales sustancias contaminantes del sector industrial
(Echarri, 2009)**

| Sector Industrial | Substancias Contaminantes Principales |
|-----------------------------|---|
| Construcción | Sólidos en suspensión, metales, pH. |
| Minería | Sólidos en suspensión, metales, materia orgánica, pH, cianuros |
| Textil y piel | Cromo, taninos, tensoactivos, sulfuros, colorantes, grasas, disolventes orgánicos, sólidos en suspensión y metales. |
| Automoción | Aceites lubricantes, pinturas y aguas residuales. |
| Pasta y papel | Sólidos en suspensión y otros que afectan al balance de oxígeno. |
| Fibras químicas | Aceites minerales y otros que afectan al balance de oxígeno. |
| Pinturas, barnices y tintas | Compuestos órgano estánmicos, compuestos de Zn, Cr, Se, Mo, Ti, Sn, Ba, Co. |

Entre los metales más tóxicos tenemos Sb, As, Cd, Cu, Cr, Hg, Ni, Pb, Se, Zn.

El aporte de estos metales al ciclo hidrológico procede de diversas fuentes, siendo una de ellas de origen litogénico o geoquímico a partir de los minerales que por causa de erosión, lluvias, entre otros; son arrastradas al agua. No obstante, actualmente la mayor concentración es de origen antropógeno o debido a la actividad humana (Herbas, *et al.*, 2006).

En la actualidad se estima en más de un millón de sustancias diferentes las que son introducidas en las aguas naturales a través de los

vertidos antropogénicos. Muchas de ellas no son consideradas tóxicas, si bien pueden alterar las características organolépticas del agua, perturbar severamente el ecosistema y/o ser directamente nocivas para el hombre (Realpe, 2009).

Al contrario de muchos contaminantes orgánicos, los metales pesados generalmente no se eliminan de los ecosistemas acuáticos por procesos naturales debido a que no son biodegradables. Son muy contaminantes y sufren un ciclo global eco-biológico, donde las aguas naturales son el principal camino. Hoy en día los metales pesados tienen un gran significado como indicadores de la calidad ecológica de todo flujo de agua debido a su toxicidad y especialmente al comportamiento bioacumulativo (Herbas, *et al.*, 2006).

Así mismo, los metales pesados tienen tendencia a formas asociaciones con sustancias minerales (carbonos, sulfatos) y en mayor grado con sustancias orgánicas mediante fenómenos de intercambio químico, por lo que se acumulan en el ambiente principalmente los sedimentos de ríos, lagos y mares (Realpe, 2009).

Los metales pesados son introducidos en los sistemas acuáticos como resultado de la acción de procesos naturales y antropogénicos (Tabla 2).

Tabla 2. Principales orígenes antropogénicos de los metales pesados (Realpe, 2009).

| Origen | Sb | As | Cd | Cu | Cr | Hg | Ni | Pb | Zn |
|-----------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Baterías eléctricas | | | x | X | | | X | x | |
| Curtidos de pieles | | | | X | x | | | | |
| Eléctrica y electrónica | | | x | X | x | | X | x | x |
| Farmacéuticas | | X | | X | x | | | | x |
| Fertilizantes | | X | x | X | x | X | X | x | x |
| Fotografía | | | x | X | x | | | x | |
| Minería | x | X | x | X | x | X | X | x | x |
| Motores | | | x | X | x | | | | x |
| Pigmentos, tintes, pinturas | x | | x | X | x | | X | x | x |
| Plásticos | x | | x | | x | | | x | x |
| Textiles | x | | | X | x | | | | x |

1.5.3. Biodisponibilidad.

Los metales pesados son tóxicos sólo si se encuentran biodisponibles para ser captados por los organismos, es decir, los que se encuentran solubles y los adsorbidos en los sitios de intercambio. Se entiende por biodisponibilidad a la cantidad de un elemento que puede ser absorbido por un organismo, y ésta se relaciona con las condiciones fisicoquímicas del ambiente y, por lo tanto, la concentración disponible para un organismo (Greger, 2004). Es por ello que para predecir el efecto de un metal sobre un ecosistema terrestre, además de determinar el grado de contaminación, es fundamental conocer su biodisponibilidad (Lloyd y Lovley, 2000).

1.5.4. Detergentes.

Un detergente está formado por uno o varios tensoactivos y una serie de componentes que complementan la acción de los primeros, tales como aditivos, coadyuvantes y auxiliares de presentación. El resultado final es un producto que además de producir una limpieza eficiente, ejerce un efecto de protección sobre las superficies a las cuales se aplica, proporciona al objeto lavado una serie de características deseadas en cuanto color, olor, tacto, entre otros (Altmajer, 2004).

Los compuestos químicos que adicionados en pequeñas cantidades a un disolvente, modifican las propiedades superficiales del mismo, promoviendo actividades (dañinas) como la humectación, detergencia, emulsificación, lubricación y otros fenómenos de superficie, están formados por dos grupos (Aranberri, *et al.*, 2006):

Tensoactivos Hidrófilos: la parte hidrófila de un tensoactivo le confiere solubilidad. Los principales son:

- *Surfactantes aniónicos: contenido Na^+ , K^+*
- *Surfactantes catiónicos: Cl^- , Br^-*
- *Surfactantes no iónicos: óxidos de etileno*

*Tensoactivos Hidrofóbicos: compuestos de estructuras alifáticas o aromáticas, saturados o insaturados, de cadenas lineales o ramificadas. Por razones ecológicas y ambientales se deben escoger o sustituir por productos de cadena lineal (Aranberri, *et al.*, 2006).*

Cuando se alcanza una concentración crítica de surfactante, la capa superficial se rompe en unidades más pequeñas, en agrupaciones de iones llamadas micelas. Las micelas son partículas en las que la parte hidrofóbica de

la molécula, repelida por el agua, se sitúa en el interior mientras que las cabezas hidrofílicas, cargadas negativamente, se colocan en el exterior de la micela e interaccionan con las moléculas de agua y los iones positivos del medio (Katime, *et al.*, 2003).

Los efectos de los detergentes son:

- a) Formación de espumas: La formación de espumas tiene lugar con débiles contenidos de detergentes, formación más abundante en presencia de sales de calcio y más aún cuando existen proteínas en el medio. Además de los efectos físicos representan una gran alteración de la estética y la posibilidad de vehicular bacterias patógenas y concentrar virus (hepatitis y polio).
- b) Inhibición de la oxidación: Un contenido de 30 mg.L^{-1} de detergentes inhibe totalmente la actividad de bacterias celulolíticas.
- c) Alteración de la transferencia y la disolución del oxígeno: La presencia de una capa superficial protectora que dificulta la renovación del oxígeno disuelto en la interfase aire-agua y, en consecuencia, ralentizan la autodepuración de las corrientes de agua.
- d) Perturbación de la sedimentación primaria: Parece que los detergentes obran de distinta manera según el grosor de las partículas en suspensión. Se ha demostrado que la presencia de agentes tensoactivos aumenta la velocidad de caída de las partículas superiores a 25 micras. También es preciso señalar que ciertas sales minerales que forman parte de los detergentes pueden ejercer una posible acción sobre la sedimentación.
- e) Disminución del rendimiento de los procesos de tratamiento biológico más en lodos activados que en biofiltros: Concentraciones del orden de 30 mg.L^{-1} pueden provocar perturbaciones.
- f) Acción más o menos marcada sobre la flora nitrificante: Los detergentes aniónicos del tipo alquil benceno sulfonatos (ABS) y alquil aril sulfonatos (LAS) a la dosis de $6-12 \text{ mg.L}^{-1}$ tienen una acción marcada sobre la flora

nitrificante, a la dosis de 50-60 mg.L⁻¹ provocan una inhibición total de estos fermentos. Detergentes aniónicos en dosis de 120 mg.L⁻¹ impiden el desarrollo de algas.

- g) Alteración de la permeabilidad de los suelos: Facilitan la penetración de microorganismos en las aguas subterráneas, los detergentes facilitan el desplazamiento de bacilocoliformes.
- h) Alteración del olor y el sabor de las aguas de consumo público: Se necesitan grandes cantidades de detergentes para comunicar olor desagradable al agua (olor a pescado), del orden de 50 mg.L⁻¹. El umbral del sabor es frecuente situarlo en 40 mg.L⁻¹.
- i) Posibilidad de ejercer efectos tóxicos: El ABS puede ser consumido en concentraciones mucho mayores que las presentes en las aguas de bebida sin producir a largo plazo efectos fisiológicos. Ratas mantenidas durante dos años con 2000, 1000 y 200 mg.L⁻¹ en la dieta no han presentado alteraciones en el crecimiento, cuadro hemático, peso, examen microscópico, tejidos, entre otros (Nápoles, 2005).

1.5.5. Norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes: Recurso Agua, de acuerdo a TULAS y al Municipio Metropolitano de Quito.

La legislación ambiental en el Ecuador establece los límites permisibles por cuerpo receptor de contaminación, en donde nomina a los tensioactivos a una concentración máxima permisible de 0,5 mg.L⁻¹ y a los metales pesados como el hierro (Fe) en una concentración de 10 mg.L⁻¹, cobre (Cu) 1 mg.L⁻¹, zinc (Zn) 5 mg.L⁻¹, cromo (Cr) 0,5 mg.L⁻¹. Éstas concentraciones se aplican para descargas tanto en alcantarillado como en cauce de agua como se puede ver en el Anexo A y B.

1.5.6. Hongos.

Los hongos son organismos eucariotas típicos que realizan una digestión externa de sus alimentos absorbiendo sustancias disueltas. Los hongos poseen un núcleo que contiene varios cromosomas delimitado por una membrana nuclear, con nucléolo rico en ARN y orgánulos citoplásmicos. El citoplasma se encuentra limitado por la membrana citoplásmica, que es una doble capa de lípidos que contiene proteínas y esteroides y que controla la permeabilidad celular y participa en la síntesis de la pared celular. La estructura de las células de los hongos es muy diferente a las bacterias que son organismos procariontes (Bial, 2002).

Los hongos constituyen un grupo muy numeroso de organismos que presentan una amplia distribución en la naturaleza, contribuyendo a la descomposición de la materia orgánica. Los hongos presentan básicamente dos tipos de morfologías: una multicelular denominada filamentosa y otra unicelular denominada levaduriforme (Bial, 2002).

→ Los hongos **filamentosos** (miceliares o mohos), representan el crecimiento más típico de los hongos microscópicos. En medios de cultivos sólidos y también sobre cualquier superficie en la que se desarrollen, por ejemplo frutas u otros alimentos, producen colonias algodonosas o pulverulentas que son muy características. Al microscopio óptico, los hongos filamentosos presentan unas estructuras tubulares, formadas por múltiples células, que se denominan hifas.

→ Los hongos que presentan crecimiento **levaduriforme** generalmente dan lugar a colonias lisas que recuerdan a las bacterianas en medios de cultivo sólidos (Bial, 2002).

1.5.6.1. Mecanismo de crecimiento y nutrición de los Hongos.

Los hongos obtienen los nutrientes por absorción (Silva, 1995) y tienen un metabolismo quimioheterótrofo, ya que consiguen la energía y el carbono de compuestos orgánicos sintetizados por otros organismos. Este hecho condiciona su modo de vida, ya que en la naturaleza se encuentran asociados a la materia orgánica en descomposición, participando en los ciclos naturales de reciclado del carbono y otros elementos naturales o como patógenos oportunistas de los animales y plantas. Los hongos pueden degradar una gran cantidad de componentes, para lo que disponen de potentes exoenzimas (Aristegui, 2002).

En el laboratorio, los hongos crecen fácilmente en la mayoría de los medios de cultivo, necesitando una fuente de carbono orgánica y iones de amonio o nitrato como fuentes de nitrógeno (Aristegui, 2002).

Los hongos filamentosos son aerobios y los levaduriformes anaerobios facultativos. Sus requerimientos de temperatura y de pH son poco exigentes y la mayoría crecen en un rango de pH de 2 a 9 y a temperaturas entre 10 y 40 °C. Los niveles de humedad relativa son necesarios entre 80-95% al inicio, durante y al final de la etapa de crecimiento (Baek, 2005).

1.5.7. Microorganismos y metales pesados.

Las interacciones metal-microbiota son estudiadas en profundidad en el contexto de la biotecnología ambiental, con el objeto de implementar métodos de remoción, recuperación o detoxificación de metales pesados. Dependiendo del estado de oxidación que se presente un metal y la especie que esté

conformando, un microorganismo puede realizar dos transformaciones posibles (Vullo, 2003).

Una correspondería a la movilización del metal, es decir el pasaje de un estado insoluble inicial (metales asociados a suelos, sulfuros u óxidos metálicos, por ejemplo) correspondiente a una fase sólida, a un estado soluble final, en fase acuosa. Este proceso se conoce con el nombre de lixiviación microbiana.

El otro corresponde a la inmovilización del metal, es decir el pasaje de un estado soluble inicial en fase acuosa a uno insoluble final en fase sólida. A su vez existen en la naturaleza diferentes mecanismos por los cuales la inmovilización del metal puede llegar a ocurrir (Vullo, 2003).

Dentro de la amplia diversidad de microorganismos presentes en los suelos, existen microorganismos resistentes y tolerantes a metales pesados. Comúnmente, tolerancia y resistencia son términos utilizados como sinónimos; sin embargo, es más adecuado definir como “resistentes” a aquellos grupos de microorganismos que poseen mecanismos de detoxificación, que son inducidos por la presencia de metales tóxicos. En cambio, la capacidad de “tolerancia” está relacionada con ciertas propiedades bioquímicas y estructurales propias de los organismos, es decir, propiedades no inducibles como la permeabilidad de su pared celular, producción de polisacáridos extracelulares y excreción de metabolitos (Cuahutémoc, 2010). En este trabajo se definió la tolerancia de los hongos en base al crecimiento de los mismos (producción de biomasa) en medios de cultivo con metales pesados y detergentes.

Esta capacidad propia de los organismos ha permitido la recuperación de sitios contaminados a través de procesos como la biosorción,

bioacumulación, biomineralización, biotransformación y quimiosorción (Lovley, 2000).

1.5.8. Mecanismos de tolerancia a metales pesados en hongos.

Cuando un hongo filamentoso entra en contacto con un contaminante como los metales, se activan algunos mecanismos que le permiten tolerar su presencia. Estos mecanismos, que inciden directamente sobre la detoxificación de los metales, se clasifican en extracelulares e intracelulares. Los mecanismos extracelulares participan evitando la entrada de los metales al interior de la célula, mientras que la función de los mecanismos intracelulares es reducir la toxicidad de estos iones en el interior de las células (Bellion *et al.*, 2006; Gadd, 1993).

1.5.9. Remoción de Tensioactivos con hongos.

La biodegradación es el proceso por el cual los microorganismos disuelven materiales orgánicos en fragmentos más pequeños y simples. Las bacterias y los hongos son los organismos más frecuentemente asociados con la biodegradación. La materia orgánica sirve también como “alimento” para los microorganismos proporcionándoles energía y creando bloques desde los cuales se producen más microorganismos. Nos referimos a una sustancia orgánica como biodegradable cuando es un buen sustrato de crecimiento y energía para los microorganismos que comúnmente se encuentran en la naturaleza (AISE, 2009).

Desde hace décadas se han empleado medidas biocorrectoras en ambientes contaminados, con importante éxito. La aplicación más frecuente de la biorremediación resalta el uso de microorganismos como biosurfactantes, en especial bacterias y hongos, para ayudar a la descontaminación y recuperación

de ambientes naturales y para el tratamiento de efluentes industriales o municipales (Araujo, *et al.*, 2008).

El término 'biosurfactante' ha sido ampliamente aplicado a compuestos de origen biológico con la capacidad de disminuir la tensión superficial; muchos de ellos abarcan un amplio rango de propiedades funcionales como son emulsificación, separación de fases, actividad superficial y reducción de la viscosidad de aceites crudos, y han sido aplicados en las industrias agrícola, textil y petroquímica (Araujo, *et al.*, 2008).

La degradación de los tensoactivos se puede dividir en tres etapas:

- ❖ Degradación primaria: Se consigue cuando la sustancia química pierde sus propiedades tensoactivos o capacidad de formar espuma.
- ❖ Degradación avanzada: Cuando la molécula del tensoactivo es transformada sucesivamente en fragmentos cada vez menores.
- ❖ Degradación completa: Cuando la molécula es transformada totalmente en dióxido de carbono (CO₂) y agua (H₂O) (Sibila, 2008).

1.6. HIPÓTESIS

Hongos aislados a nivel de laboratorio degradan detergentes y presentan tolerancia a metales pesados presentes en muestras de aguas residuales textileras.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Participantes.

2.1.1. Escuela Politécnica del Ejército.

La Escuela Politécnica del Ejército participó en la realización de este trabajo de investigación mediante el financiamiento del proyecto “Selección de hongos eficientes en la biodegradación de materia orgánica y colorantes reactivos, tolerantes a metales, para su uso en biorremediación de aguas residuales de la industria textil (2010-2011)”; se concedió el uso de los Laboratorios de Biotecnología y de Microbiología con el fin de utilizar los equipos.

El Centro de Investigaciones Científicas de la ESPE (CEINCI) es el lugar donde se realizaron todos los ensayos de tolerancia a metales pesados y remoción de detergentes con hongos.

2.1.2. Personas.

La participación de Alma Koch, M.C. como directora del proyecto y la Dra. Blanca Naranjo como codirectora del proyecto ha permitido el aporte de valiosas ideas y conocimientos de su parte, la continua revisión del avance del proyecto y su colaboración incondicional para lograr que ésta tesis se lleve a cabo. Alma Koch, M.C. ha tenido la predisposición para facilitar el laboratorio de Microbiología del que está a cargo actualmente con el fin de que el proyecto avance de acuerdo al cronograma establecido.

2.2. Zona de estudio.

2.2.1. Laboratorio.

Centro de Investigaciones Científicas (CEINCI), Laboratorio de Microbiología, Escuela Politécnica del Ejército, Ecuador, provincia de Pichincha, cantón Rumiñahui, Sangolquí.

Ubicación geográfica: 0° 18' 53", 52° S.

2.2.2. Campo.

Las muestras de agua fueron tomadas del Río Monjas, en el sector de San Antonio de Pichincha el que recibe los efluentes de la empresa textil.

Ubicación geográfica: Latitud: 0° 0' 29.43" S / Longitud: 78° 26' 14.93" O

2.3. Período de tiempo de investigación.

Fecha de inicio del trabajo: 2010

Fecha de término del trabajo: 2011

2.4. Diseño Experimental.

2.4.1. Diseño para la tolerancia de metales pesados y detergentes con hongos.

Se analizó la tolerancia a metales pesados usando un Diseño Completamente al Azar (DCA) aplicando los tratamientos mencionados en la Tabla 3.

Tabla 3. Tratamientos aplicados en el proceso de tolerancia a metales.

| Hongos | Metales | Concentraciones |
|---------------|----------------------------------|---|
| C7 – AL | Cobre Zinc Hierro Cromo | 1 mg.L ⁻¹ y 10 mg.L ⁻¹ 5 mg.L ⁻¹ y 50 mg.L ⁻¹ 10 mg.L ⁻¹ y 100 mg.L ⁻¹ 0.5 mg.L ⁻¹ y 5 mg.L ⁻¹ |
| C2 – BL | | |
| C20 – AL | | |
| C18 – BL | | |
| C1 – BA | | |

La tolerancia de detergentes se evaluó con un Diseño Factorial 5x2x3, con los tratamientos citados en la Tabla 4.

Tabla 4. Tratamientos aplicados en el proceso de tolerancia a detergentes.

| Hongos | Concentraciones de Detergentes |
|---------------|--|
| C7 – AL | 0.5 mg.L ⁻¹ 5 mg.L ⁻¹ |
| C2 – BL | |
| C20 – AL | |
| C18 – BL | |
| C1 – BA | |

La tolerancia de los hongos seleccionados a nivel de laboratorio fue evaluado mediante determinación de biomasa.

2.4.2. Diseño para la remoción de detergentes con hongos.

Se analizó la remoción de detergentes usando un Diseño Factorial de 5x2x3 de acuerdo a los tratamientos propuestos en la Tabla 5. Estos contaminantes fueron degradados mediante el uso de hongos seleccionados a nivel de laboratorio.

Tabla 5. Tratamientos aplicados en el proceso de remoción de detergentes.

| Hongos | Concentraciones de Detergentes |
|---------------|--|
| C7 – AL | 0.5 mg.L ⁻¹ 5 mg.L ⁻¹ |
| C2 – BL | |
| C20 – AL | |
| C18 – BL | |
| C1 – BA | |

Cada experimento se realizó por triplicado, con dos controles y un blanco, esto se efectuó en condiciones ideales de crecimiento respecto a: pH, temperatura, humedad y nutrientes.

2.5. METODOLOGÍA.

2.5.1. Diseño de la Investigación.

Debido al carácter de esta investigación, el proyecto se desarrolló utilizando el método experimental, bajo condiciones controladas para la obtención de resultados aplicables en su ejecución.

2.5.2. Métodos.

2.5.2.1. Tolerancia de Hongos seleccionados a metales pesados.

2.5.2.1.1. Relación estequiométrica y cálculos de la cantidad de metal a añadir en el Agar Extracto de Malta (AEM) a partir de reactivos obtenidos en el Laboratorio.

El cálculo se realizó en base a los reactivos que se utilizaron del laboratorio para cada uno de los metales, elaborando una solución madre. La concentración de los metales se refirió a los valores permitidos de cada metal en aguas según el Ministerio del Ambiente – TULAS y el Municipio de Quito (Anexos A y B).

2.5.2.1.2. Siembra de las cinco cepas de hongos en medio líquido Caldo Potato Dextrosa (PDB).

Se sembró una alícuota de 1 mL de cada una de los hongos previamente aislados en medios líquidos PDB con cloranfenicol, manteniéndolos en agitación a 100 rpm e incubación a 35°C, durante tres días.

Posteriormente se los mantuvo en refrigeración a 4°C por 5 días (Hatvani & Mees, 2002).

2.5.2.1.3. Siembra de las cinco cepas de hongos en Agar Extracto de Malta (AEM).

Se colocó una alícuota del metal de la solución madre en el centro de la base de una caja Petri vacía estéril. Sobre ésta gota, se dispuso el medio sólido AEM y se homogenizó. Se sembraron los hongos mediante la técnica de resistencia en placa (Cárdenas *et al.*, 2010). El alícuota de 1 mL, tomada de cultivos líquidos, fue sembrada en cada caja Petri.

2.5.2.1.4. Crecimiento del cultivo de hongos.

Se incubó las cajas Petri sembradas durante 15 días a 80% de humedad y una temperatura de 30°C. Se observó el crecimiento del hongo en medio AEM en los diferentes tratamientos comparándolos con los controles en un tiempo de incubación de 96 h bajo las condiciones establecidas. Para asegurar el crecimiento de los hongos, se observó su morfología con ayuda de un microscopio compuesto (Díaz *et al.*, 2002).

2.5.2.1.5. Cuantificación de biomasa celular.

La determinación de biomasa fúngica se estimó por peso seco (Figura 1), usando papel filtro Whatman No.1. La biomasa se retiró del cultivo en AEM y se filtró al vacío (Cuahutémoc, 2010). La biomasa fúngica en el filtro se dejó evaporar al ambiente por 24 h para posteriormente secarlos a 80°C por 2 h en una estufa. A continuación se colocaron en desecador durante 1 h para

estabilizar su temperatura y pesarlos. La biomasa se cuantificó por la diferencia de peso entre el papel filtro sin y con biomasa (Díaz *et al.*, 2002).

Los datos obtenidos por diferencia de peso de cada tratamiento se utilizaron para realizar el diseño estadístico, evaluando la tolerancia de los hongos en función de la cantidad de biomasa producida.

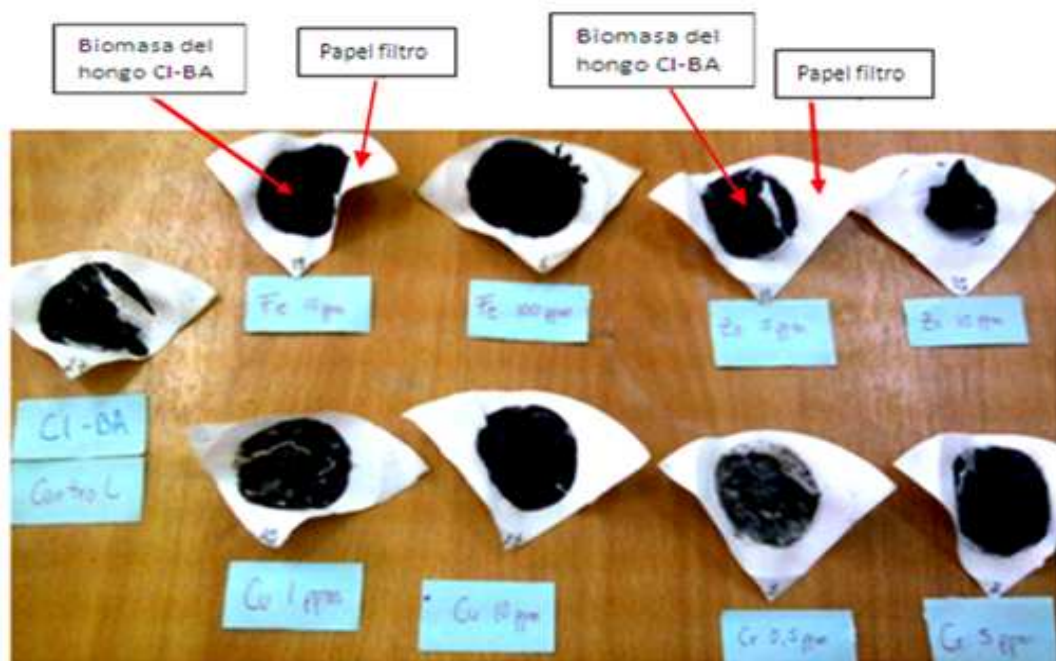


Figura 1. Biomasa seca obtenida del Hongo C1-BA.

2.5.2.2. Tolerancia de Hongos seleccionados a detergentes.

2.5.2.2.1. Siembra de los hongos en agar extracto de malta (AEM).

Se colocó una alícuota del detergente en el centro de la base de una caja Petri vacía estéril, sobre la que se dispensó el medio sólido AEM y se

homogenizó. Se sembraron los hongos (alícuota de 1mL) mediante la técnica de resistencia en placa en cada caja Petri (Cárdenas *et al.*, 2010).

2.5.2.2.2. Crecimiento del cultivo de hongos.

Se incubó las cajas Petri sembradas durante 15 días a 80% de humedad y una temperatura de 30°C. Se observó el crecimiento del hongo en medio AEM a las 96 h de incubación bajo las condiciones establecidas (Díaz *et al.*, 2002).

2.5.2.2.3. Cuantificación de biomasa celular.

La determinación de biomasa fúngica se estimó por peso seco, usando papel filtro Whatman No.1. La biomasa se retiró del cultivo en AEM y se filtró al vacío (Cuahutémoc, 2010). La biomasa fúngica se dejó evaporar al ambiente por 24 h y posteriormente se secó a 80°C por 2 h en una estufa. Se estabilizó la temperatura del filtro con la biomasa en un desecador durante 1 h y se pesó. La biomasa se cuantificó por la diferencia de peso entre el papel filtro sin y con biomasa (Díaz *et al.*, 2002).

Los datos obtenidos de diferencia de peso de cada tratamiento se utilizaron para realizar el diseño estadístico, evaluando la tolerancia de los hongos en función de la cantidad de biomasa producida.

2.5.2.3. Hongos eficientes en la remoción de detergentes.

2.5.2.3.1. Siembra de hongos en medio mineral estandarizado con detergentes.

Los cultivos de hongos seleccionados a nivel de laboratorio fueron activados en un medio de cultivo PDB (Hatvani & Mees, 2002). Los cultivos se desarrollaron a una temperatura de 35°C y a 150 rpm para el consorcio aerobio (Jiménez&Benítez, 2005).

2.5.2.3.2. Estandarización del método.

La estandarización del método para la detección de la concentración de surfactantes aniónicos en el medio de cultivo se determinó por el método “Detección de Surfactantes aniónicos como SAAM (sustancias activas para azul de metileno)”. Este método utiliza varias soluciones específicas mencionadas en la Tabla 6.

El proceso se basa en la transferencia del azul de metileno a un líquido orgánico inmiscible, hasta el equilibrio, lo que ocurre a través de la formación de un par iónico entre el anión SAAM y el catión azul de metileno (Standard Methods, 2005).

Tabla 6. Soluciones del Método de Sustancias Activas al Azul de Metileno (SAAM) (Standard Methods, 2005).

| Preparación de Soluciones | |
|--|--|
| Solución Lauril Sulfato de Sodio (LAS) de reserva | Pesar 1g de LAS, disolver en agua destilada y diluir hasta 1000 mL. Mantener en refrigeración. |
| Reactivo azul de metileno | Disolver 100 mg de azul de metileno en 100 mL de agua destilada. Transferir 30 mL a un balón de 1000 mL y adicionar 500 mL de agua destilada, 50 g de Dihidrógeno fosfato de sodio monohidratado (NaH_2PO_4) y 41 mL de Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) 6N. Agitar hasta completar la dilución y diluir hasta 1000 mL. |
| Solución de lavado | Adicionar 41 mL de Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) 6N a 500 mL de agua destilada en un balón de 1000 mL. Adicionar 50 g de Dihidrógeno fosfato de sodio monohidratado (NaH_2PO_4), agitar hasta completar la disolución y diluir a 1000 mL. |

2.5.2.3.3. Elaboración de la curva de calibración.

Para determinar la degradación de detergentes se elaboraron curvas de medición de surfactantes a partir de espectrofotometría. A partir de la curva de referencia para la medición de tensoactivo se realizó la cuantificación de las concentraciones del mismo a partir del diseño experimental establecido (Standard Methods, 2005).

2.5.2.3.4. Cuantificación de la degradación de detergentes.

Para detectar la cantidad de detergente que ha sido degradado se utilizó el método SAAM estandarizado y posteriormente se analizó la muestra extraída por espectrofotometría a una longitud de onda de 652 nm (Standard Methods, 2005).

2.5.2.3.5. Filtración al vacío.

Se filtraron al vacío usando papel filtro Whatman No.1 los medios de cultivo PDB con los hongos después de los 15 días de incubación.

2.5.2.3.6. Método de SAAM (Standard Methods, 2005).

Del sobrenadante obtenido se tomó una alícuota de 1mL y se diluyó en 100 mL con agua destilada. Se colocó en embudos de separación donde se adicionaron 10 mL de cloroformo y 25 mL de solución de azul de metilo; se agitó lentamente (para evitar la formación de una emulsión) durante 1 minuto y se lo dejó reposar hasta que las dos fases se separaron (Figura 2).

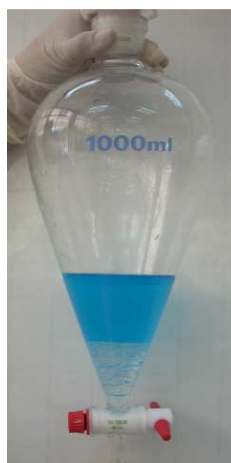


Figura 2. Diferencia entre fase acuosa y fase orgánica.

2.5.2.3.6.1. *Protocolo de limpieza.*

Para eliminar cualquier tipo de interferencia que pueda ocasionar errores en la investigación, todo el material de vidrio utilizado se sometió a un protocolo de limpieza que consistió en:

- *Limpiar el material de vidrio con una solución sulfocrómica.*
- *Enjuagar el material con agua corriente.*
- *Finalmente enjuagar el material dos veces con agua destilada y secar (Standard Methods, 2005).*

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1. Tolerancia de Hongos seleccionados a metales pesados.

3.1.1. Cultivo y crecimiento de hongos en medio sólido AEM.

Los hongos presentaron tolerancia a metales como: cobre, hierro, zinc y cromo, a las dos concentraciones a las que fueron sometidos (Tabla 9), como se puede ver en las Figuras 4-8.

El crecimiento del hongo C7-AL (Figura 4) no fue uniforme formando una especie de tela encima del medio de cultivo y presentó diferentes colores.

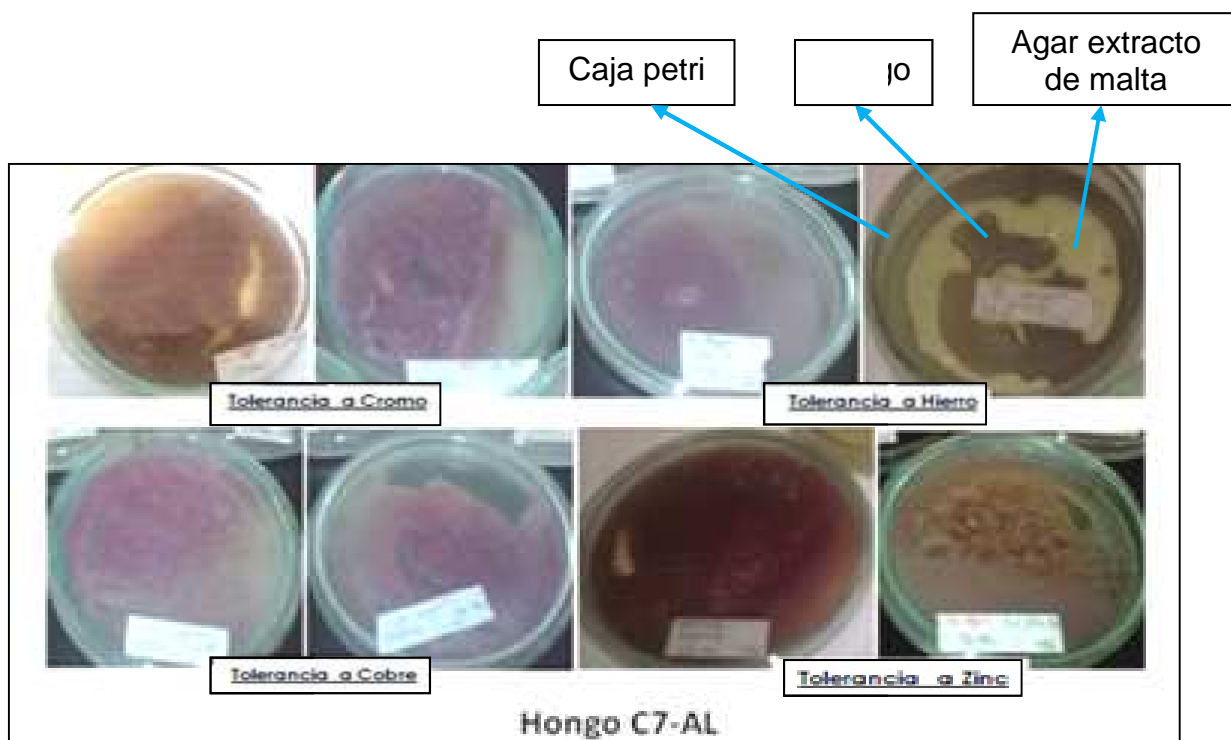


Figura 4. Tolerancia a metales del hongo C7-AL.

El crecimiento del hongo C2-BL (Figura 5) no fue uniforme. En todos los tratamientos se formó una porción algodonosa de diferentes colores y en ciertas partes de la caja se pudieron observar acumulaciones de estas.

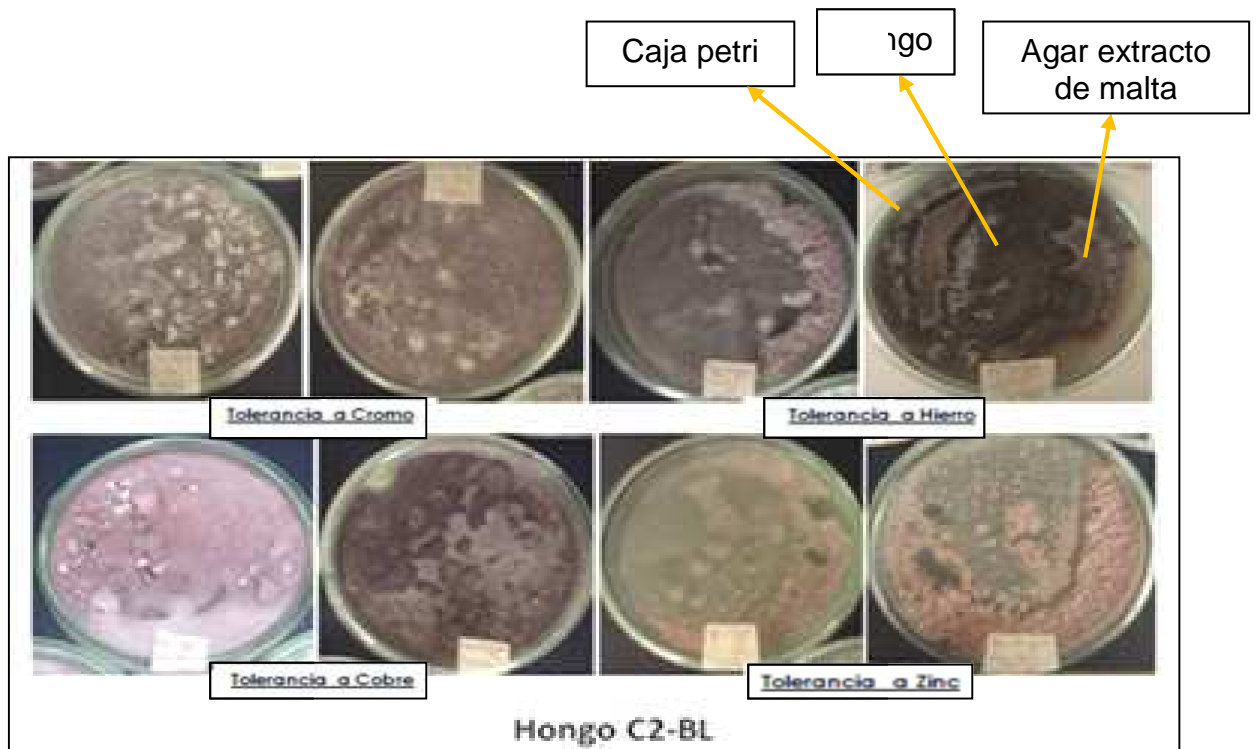


Figura 5. Tolerancia a metales del hongo C2-BL.

El crecimiento del hongo C1-BA (Figura 6) fue uniforme, todas las cajas presentaron crecimiento masivo de hongo de diferentes colores, sin embargo en todos los tratamientos se observaron acumulaciones algodonosas blancas.

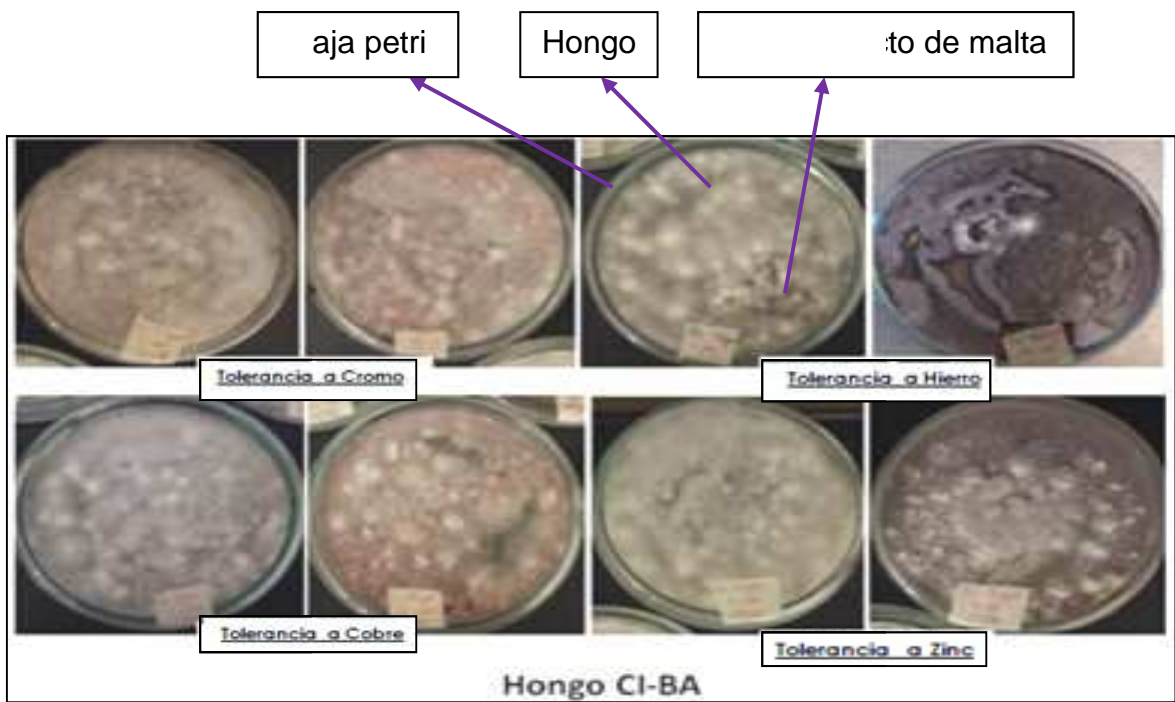


Figura 6. Tolerancia a metales del hongo C1-BA.

El crecimiento del hongo C18-BL (Figura 7) no fue uniforme, la característica de este hongo fue su crecimiento en forma de algodón sobre el medio manteniendo constantemente el color blanco en todos los tratamientos.

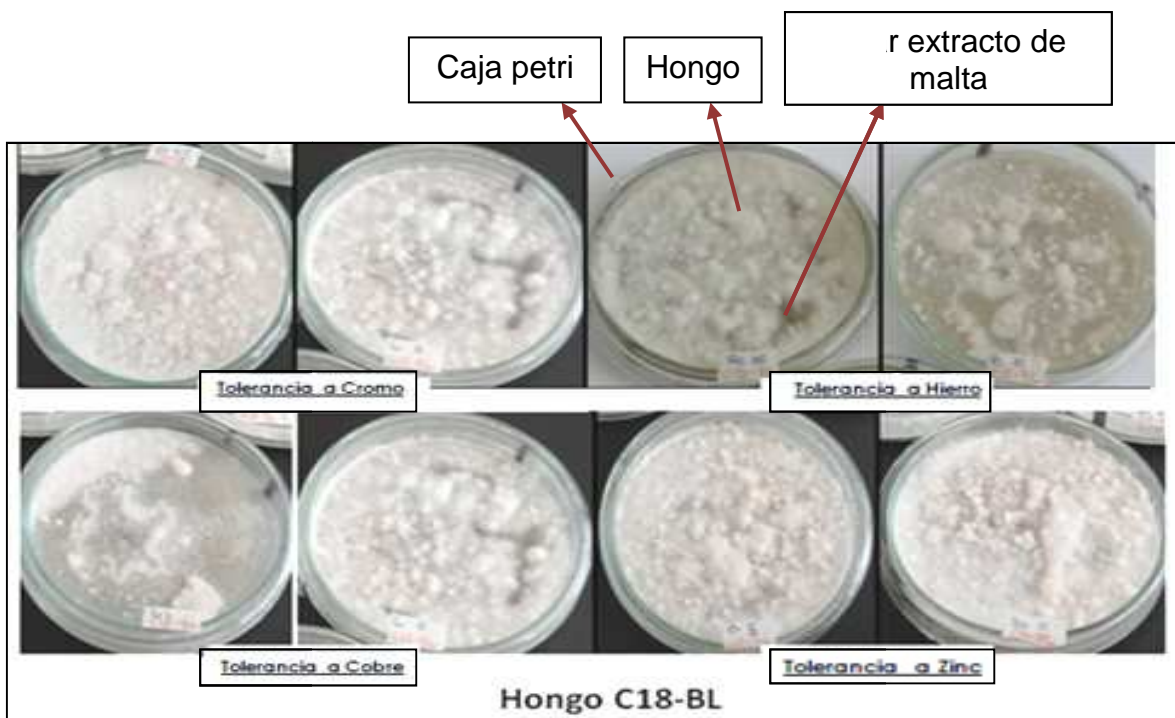


Figura 7. Tolerancia a metales del hongo C18-BL.

El crecimiento del hongo C20-AL (Figura 8) no fue uniforme, todas las cajas presentaron crecimiento de diferentes colores, en la mayoría se observó acumulaciones algodonosa de colores distintos al del hongo en el resto de la caja.

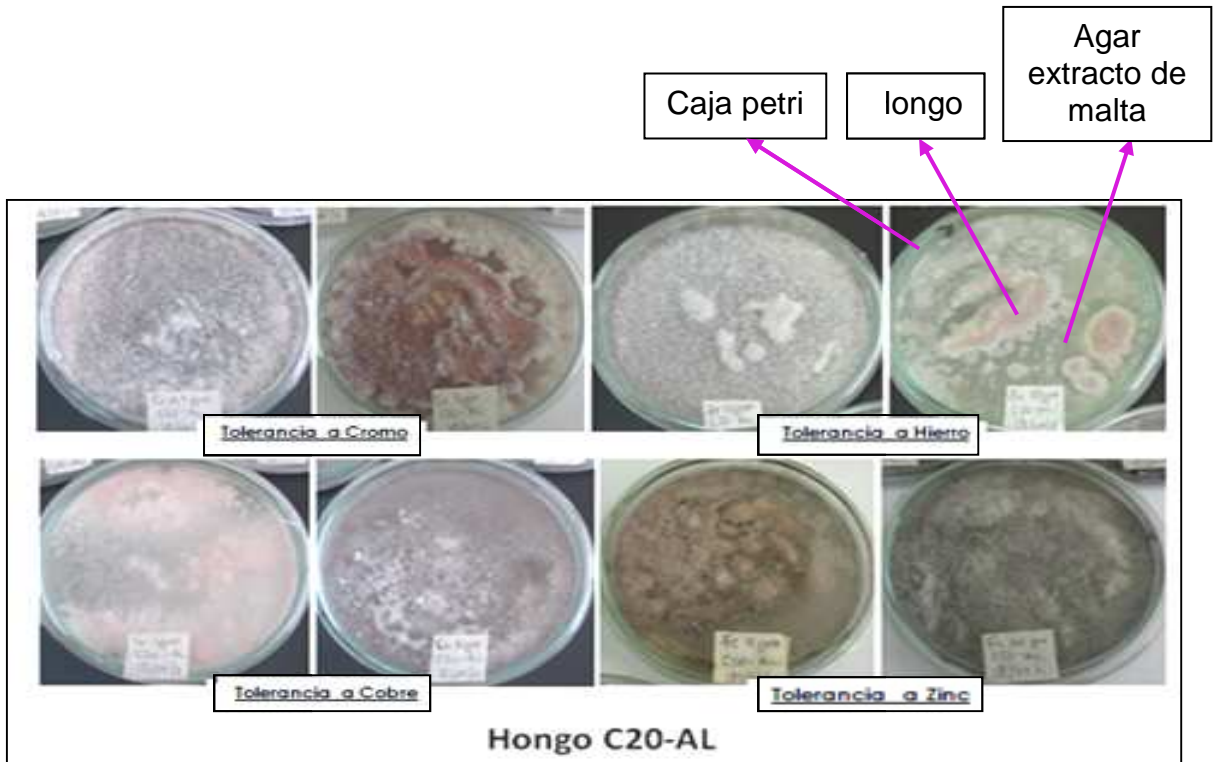


Figura 8. Tolerancia a metales del hongo C20-AL.

3.1.2. Evaluación de la tolerancia a metales con hongos.

En el programa SPSS15 se realizó el análisis estadístico para los diferentes tratamientos.

A partir de los datos obtenidos en los ensayos realizados, se calculó el ANOVA. Dentro de las tablas de ANOVA se tuvieron en cuenta las interacciones entre los tres factores en estudio: hongos, metales y concentraciones.

3.1.2.1. Diseño Completamente al Azar utilizando como variable dependiente el peso seco de hongos según la tolerancia a metales - cromo (Cr).

Para los datos agrupados en la interacción hongo por concentración de cromo, se obtuvo un valor de significancia menor a 0,05, que significa que al menos un tratamiento de los aplicados fue diferente, como se observa en la Tabla 7.

Tabla 7. ANOVA para el experimento tolerancia de metales cromo con Hongos.

| Fuente | Suma de cuadrados tipo III | GI | Media cuadrática | F | Sig. |
|---------------------|----------------------------|----|------------------|---------|--------------|
| Modelo corregido | 0,013 | 9 | 0,001 | 5,361 | 0,001 |
| Intersección | 0,116 | 1 | 0,116 | 432,770 | 0,000 |
| Hongo | 0,001 | 4 | 0,000 | 1,084 | 0,391 |
| [Cr] | 0,002 | 1 | 0,002 | 8,001 | 0,010 |
| Hongo * [Cr] | 0,010 | 4 | 0,002 | 8,979 | 0,000 |
| Error | 0,005 | 20 | 0,000 | | |
| Total | 0,135 | 30 | | | |
| Total corregida | 0,018 | 29 | | | |

En la prueba de Duncan al 5% de confianza, para el factor hongo según las concentraciones de cromo en la Tabla 8, el subconjunto 1 muestra la media de 0,10267 para el mejor tratamiento del hongo C7-AL a una concentración de 5 mg.L⁻¹ de cromo.

Tabla 8. Prueba de Duncan para similitud de medias del factor Hongo según la concentración de cromo.

| | Tratamiento | N | Subconjunto para alfa = 0,05 | | | |
|------------------|-------------|---|------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| | | | 2 | 3 | 1 | |
| Duncan(a) | C7-AL C1 | 3 | 0,01500 | | | |
| | C1-BA C2 | 3 | | 0,05200 | | |
| | C1-BA C1 | 3 | | 0,05333 | | |
| | C20-AL C2 | 3 | | 0,05833 | | |
| | C2-BL C1 | 3 | | 0,06300 | | |
| | C2-BL C2 | 3 | | 0,06600 | | |
| | C18-BL C1 | 3 | | 0,06800 | | |
| | C20-AL C1 | 3 | | 0,06967 | | |
| | C18-BL C2 | 3 | | 0,07467 | | |
| | C7-AL C2 | 3 | | | 0,10267 | |
| | Sig. | | | 1,0000 | 0,1550 | 1,0000 |

Los resultados obtenidos se pueden observar gráficamente en la Figura 9.

3.1.2.2. Diseño completamente al Azar utilizando como variable dependiente el peso seco de hongos según la tolerancia a metales - cobre (Cu).

Los datos para la interacción hongo por concentración de cobre muestran de igual forma que el anterior metal, una significancia menor a 0,05, indicando que al menos un tratamiento es diferente (Tabla 9).

Tabla 9. ANOVA para el experimento tolerancia de metales cobre con Hongos.

| Fuente | Suma de cuadrados tipo III | GI | Media cuadrática | F | Sig. |
|---------------------|----------------------------|----|------------------|---------|--------------|
| Modelo corregido | 0,005 | 9 | 0,001 | 2,735 | 0,029 |
| Intersección | 0,105 | 1 | 0,105 | 550,778 | 0,000 |
| Hongo | 0,001 | 4 | 0,000 | 1,020 | 0,421 |
| [Cu] | 7,05E-005 | 1 | 7,05E-005 | 0,371 | 0,549 |
| Hongo * [Cu] | 0,004 | 4 | 0,001 | 5,041 | 0,006 |
| Error | 0,004 | 20 | 0,000 | | |
| Total | 0,113 | 30 | | | |
| Total corregida | 0,008 | 29 | | | |

En la prueba de Duncan al 5% de confianza, el subconjunto 1 de la Tabla 10, muestra como el mejor tratamiento al consorcio C20-AL a una concentración de 1 mg.L⁻¹ con una media de 0,07400 y propone una similitud estadística en la producción de biomasa para los cultivos C18-BL y C7-AL a una concentración de 10 mg.L⁻¹. Los resultados obtenidos se pueden observar gráficamente en la Figura 9.

Tabla 10. Prueba de Duncan para similitud de medias del factor Hongo según la concentración de cobre.

| | Tratamiento | N | Subconjunto para alfa = 0,05 | | | |
|------------------|-------------|---|------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| | | | 2 | 3 | 1 | |
| Duncan(a) | C20-AL C2 | 3 | 0,03633 | | | |
| | C7-AL C1 | 3 | 0,04100 | 0,04100 | | |
| | C1-BA C1 | 3 | 0,04867 | 0,04867 | 0,04867 | |
| | C1-BA C2 | 3 | 0,05900 | 0,05900 | 0,05900 | |
| | C2-BL C1 | 3 | 0,06033 | 0,06033 | 0,06033 | |
| | C2-BL C2 | 3 | | 0,06333 | 0,06333 | |
| | C18-BL C1 | 3 | | 0,06367 | 0,06367 | |
| | C18-BL C2 | 3 | | | 0,07167 | |
| | C7-AL C2 | 3 | | | 0,07267 | |
| | C20-AL C1 | 3 | | | 0,07400 | |
| | Sig. | | | 0,06800 | 0,08800 | 0,06300 |

3.1.2.3. Diseño completamente al Azar utilizando como variable dependiente el peso seco de hongos según la tolerancia a metales - zinc (Zn).

Para los datos agrupados en la interacción hongo por concentración de zinc muestran un valor de significancia $0,688 > 0,05$ sugiriendo que, independientemente del hongo y las concentraciones del metal, todos los tratamientos presentan igual crecimiento de biomasa (Tabla 11).

Tabla 11. ANOVA para el experimento tolerancia de metales zinc con Hongos.

| Fuente | Suma de cuadrados tipo III | Gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|---------------------|----------------------------|----|------------------|---------|--------------|
| Modelo corregido | 0,005 | 9 | 0,001 | 1,113 | 0,398 |
| Intersección | 0,153 | 1 | 0,153 | 292,190 | 0,000 |
| Hongo | 0,004 | 4 | 0,001 | 1,932 | 0,144 |
| [Zn] | 2,70E-006 | 1 | 2,70E-006 | 0,005 | 0,943 |
| Hongo * [Zn] | 0,001 | 4 | 0,000 | 0,570 | 0,688 |
| Error | 0,010 | 20 | 0,001 | | |
| Total | 0,168 | 30 | | | |
| Total corregida | 0,016 | 29 | | | |

En la prueba de Duncan al 5% de confianza, el subconjunto 1 en la Tabla 12 muestra el hongo C7-AL como el mejor tratamiento a una concentración de 5 mg.L^{-1} con una media de 0,10067 y a el cultivo C2-BL a una concentración de 10 mg.L^{-1} en el subconjunto 2 con una media de 0,08300. Los resultados obtenidos se observan gráficamente en la Figura 9.

Tabla 12. Prueba de Duncan para similitud de medias del factor Hongo según la concentración de zinc.

| | Tratamiento | N | Subconjunto para alfa = 0,05 | | |
|------------------|-------------|---|------------------------------|----------------|----------------|
| | | 1 | 2 | 1 | |
| Duncan(a) | C1-BA C1 | 3 | 0,05533 | | |
| | C1-BA C2 | 3 | 0,05533 | | |
| | C20-AL C1 | 3 | 0,05900 | 0,05900 | |
| | C20-AL C2 | 3 | 0,06667 | 0,06667 | |
| | C2-BL C1 | 3 | 0,06933 | 0,06933 | |
| | C18-BL C1 | 3 | 0,07100 | 0,07100 | |
| | C18-BL C2 | 3 | 0,07567 | 0,07567 | |
| | C7-AL C2 | 3 | 0,07767 | 0,07767 | |
| | C2-BL C2 | 3 | 0,08300 | 0,08300 | |
| | C7-AL C1 | 3 | | 0,10067 | |
| | Sig. | | | 0,21200 | 0,06500 |

3.1.2.4. Diseño completamente al Azar utilizando como variable dependiente el peso seco de hongos según la tolerancia a metales - hierro (Fe).

Para los datos agrupados en la interacción hongo por concentración de hierro, se obtuvo un resultado similar que en el anterior metal, con un valor de significancia $0,789 > 0,05$ por lo tanto todos los tratamientos presentan igual crecimiento de biomasa (Tabla 13).

Tabla 13. ANOVA para el experimento tolerancia de metales hierro con Hongos.

| Fuente | Suma de cuadrados tipo III | GI | Media cuadrática | F | Sig. |
|---------------------|----------------------------|----|------------------|---------|--------------|
| Modelo corregido | 0,013 | 9 | 0,001 | 4,218 | 0,004 |
| Intersección | 0,154 | 1 | 0,154 | 449,738 | 0,000 |
| Hongo | 0,003 | 4 | 0,001 | 2,157 | 0,111 |
| [Fe] | 0,009 | 1 | 0,009 | 27,639 | 0,000 |
| Hongo * [Fe] | 0,001 | 4 | 0,000 | 0,425 | 0,789 |
| Error | 0,007 | 20 | 0,000 | | |
| Total | 0,173 | 30 | | | |
| Total corregida | 0,020 | 29 | | | |

En la prueba de Duncan al 5% de confianza, el subconjunto 1 en la Tabla 14 muestra el mejor tratamiento para el consorcio C20-AL a una concentración de 100 mg.L⁻¹ con una media de 0,10533.

Tabla 14. Prueba de Duncan para similitud de medias del factor Hongo según la concentración de hierro.

| | Tratamiento | N | Subconjunto para alfa = 0,05 | | | | |
|------------------|-------------|---|------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | | | 2 | 3 | 4 | 1 | |
| Duncan(a) | C18-BL C1 | 3 | 0,04200 | | | | |
| | C7-AL C1 | 3 | 0,04567 | | | | |
| | C20-AL C1 | 3 | 0,05333 | 0,05333 | | | |
| | C1-BA C1 | 3 | 0,05767 | 0,05767 | 0,05767 | | |
| | C2-BL C1 | 3 | 0,07033 | 0,07033 | 0,07033 | 0,07033 | |
| | C18-BL C2 | 3 | 0,07200 | 0,07200 | 0,07200 | 0,07200 | |
| | C7-AL C2 | 3 | | 0,08133 | 0,08133 | 0,08133 | |
| | C1-BA C2 | 3 | | | 0,09067 | 0,09067 | |
| | C2-BL C2 | 3 | | | | 0,09700 | |
| | C20-AL C2 | 3 | | | | 0,10533 | |
| | Sig. | | | 0,0920 | 0,1100 | 0,0620 | 0,0510 |

Los resultados obtenidos se observan gráficamente en la Figura 9.

Los gráficos de medias marginales a continuación muestran los mejores tratamientos en cada interacción hongo-metal con un círculo de color rojo, Figura a: hongo C7-AL, Figura b: hongo C20-AL, Figura c: hongo C7-AL, Figura d: hongo C20-AL.

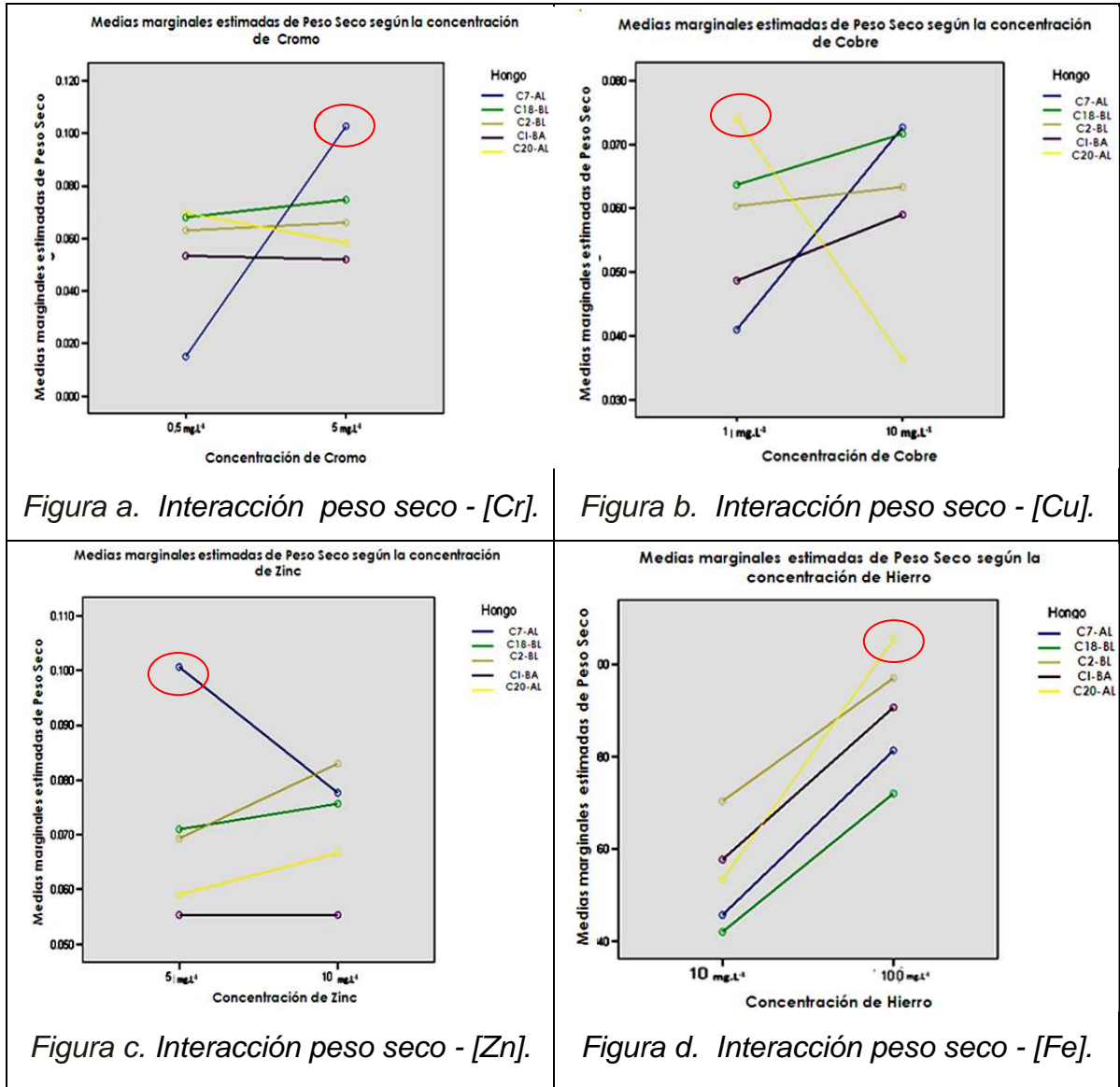


Figura 9. Medias Marginales para las Interacciones hongo-metal.

3.2. Tolerancia de los hongos a detergentes.

3.2.1. Cultivo y crecimiento de hongos en medio sólido AEM.

Los hongos presentaron tolerancia a detergentes en concentraciones de 0,5 y 5 mg.L⁻¹ (Figura 10 – 14).

El crecimiento del hongo C18-BL (Figura 10) fue uniforme en cada tratamiento en forma de algodón sobre el medio manteniendo constantemente el color blanco.

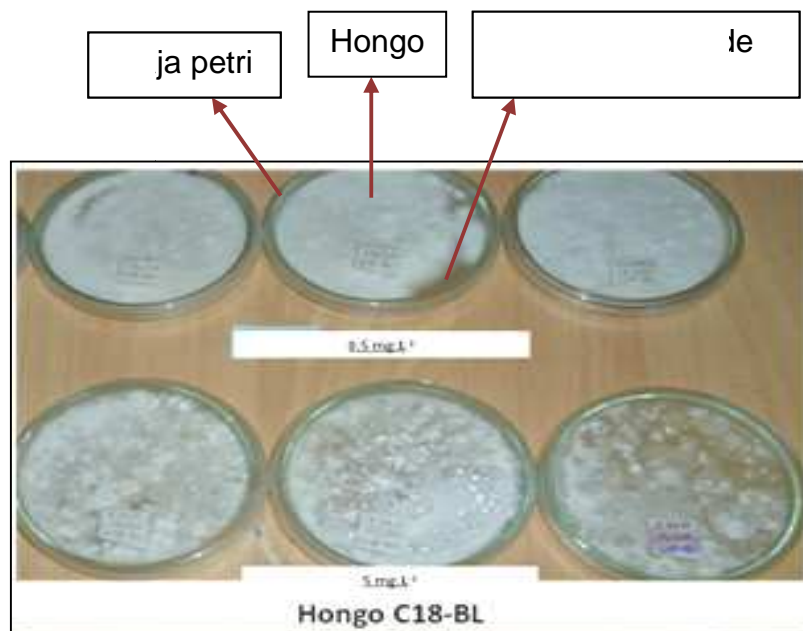


Figura 10. Crecimiento del hongo C18-BL tolerante a detergentes.

El crecimiento del hongo C1-BA (Figura 11) fue uniforme en todas las cajas, el hongo formó acumulaciones de algodón sobre el medio de color blanco.

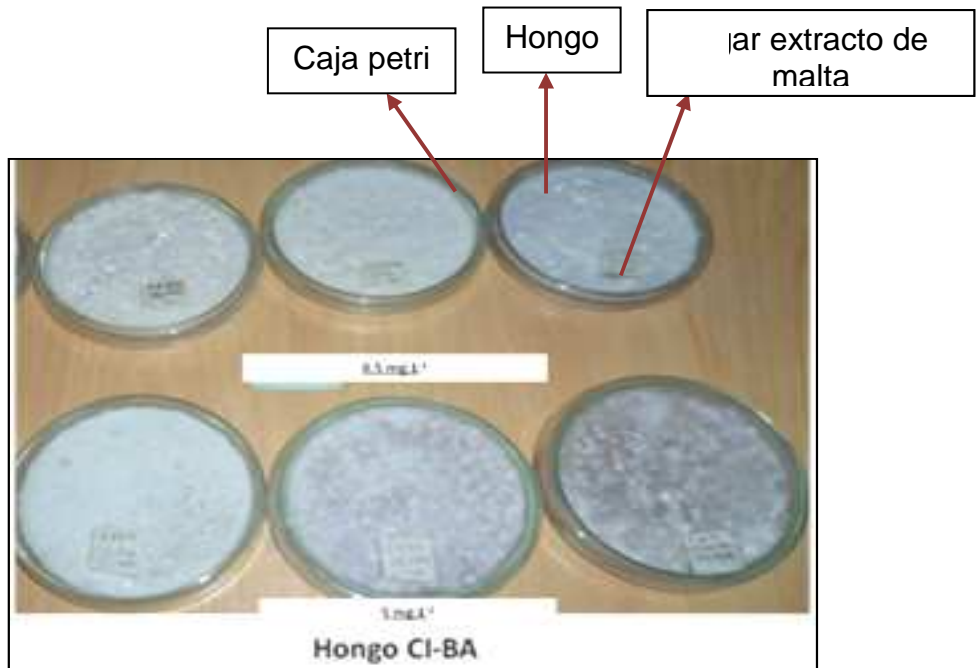


Figura 11. Crecimiento del hongo C1-BA tolerante a detergentes.

El crecimiento del hongo C2-BL (Figura 12) no fue uniforme, en el tratamiento de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ todas las cajas presentaron acumulaciones de algodón de color morado, mientras que en el tratamiento de 5 mg.L^{-1} formó una tela transparente y de color morado sobre el medio.

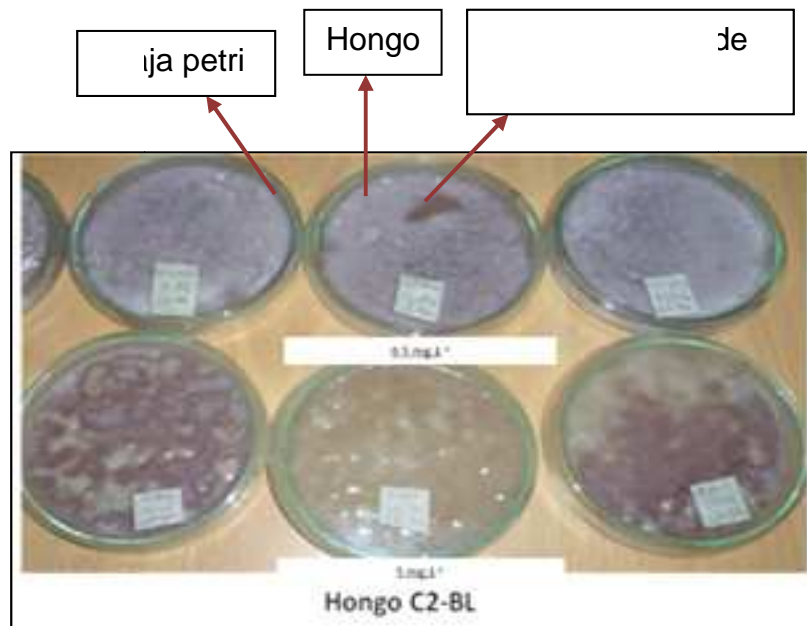


Figura 12. Crecimiento del hongo C2-BL tolerante a detergentes.

El crecimiento del hongo C7-AL (Figura 13) no fue uniforme, en el tratamiento de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ todas las cajas presentaron una tela de color morado oscuro sobre el medio, mientras que en el tratamiento de 5 mg.L^{-1} formó una tela transparente y de color rojizo oscuro.

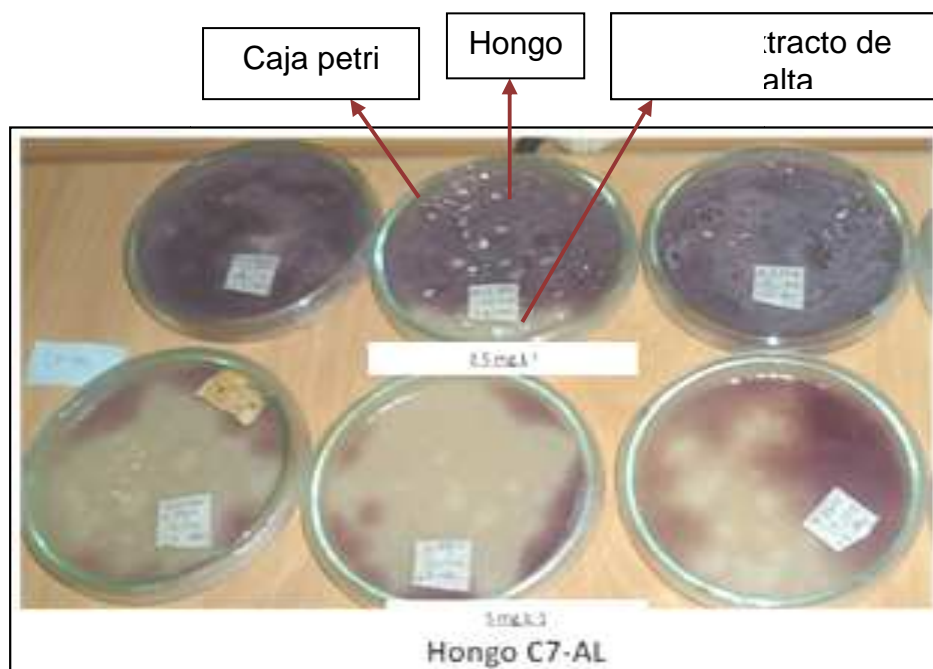


Figura 13. Crecimiento del hongo C7-AL, tolerante a detergentes.

El crecimiento del hongo C20-AL (Figura 14) fue uniforme, todas las cajas presentaron crecimiento masivo de hongo de color morado claro con acumulaciones algodonosas de color blanco sobre el medio.

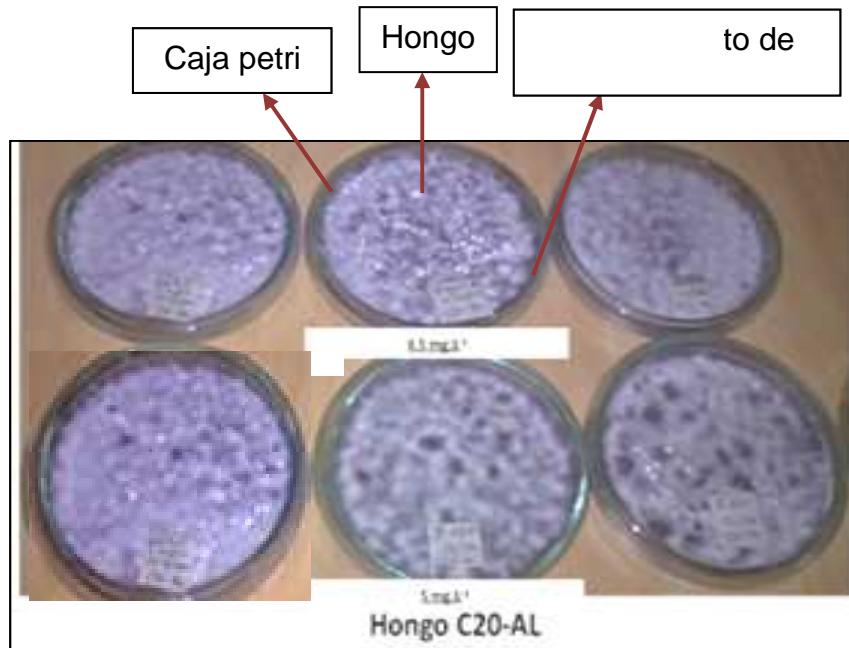


Figura 14. Crecimiento del hongo C20-AL tolerante a detergentes.

3.2.2. Evaluación de la tolerancia a detergentes con hongos.

En el programa SPSS15 se realizó el análisis estadístico para los diferentes tratamientos, se calculó el ANOVA para las interacciones entre los tres factores en estudio: hongos, detergentes y concentraciones.

3.2.2.1. Diseño Completamente al Azar utilizando como variable dependiente el crecimiento promedio de hongos según la tolerancia a detergentes.

Para los datos agrupados en la interacción hongo por concentración de detergente, el valor de significancia es de $0,548 > 0,05$ lo que muestra que, independientemente del hongo y las concentraciones de detergente, todos los tratamientos presentan igual crecimiento promedio de hongos (Tabla 15).

Tabla 15. ANOVA para el experimento tolerancia de detergentes con Hongos.

| Fuente | Suma de cuadrados tipo III | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|------------------------------|----------------------------|----|------------------|---------|--------------|
| Modelo corregido | 0,016(a) | 9 | 0,002 | 3,898 | 0,005 |
| Intersección | 0,393 | 1 | 0,393 | 864,792 | 0,000 |
| [Detergentes] | 0,001 | 1 | 0,001 | 2,245 | 0,150 |
| Hongo | 0,014 | 4 | 0,003 | 7,424 | 0,001 |
| [Detergentes] * Hongo | 0,001 | 4 | 0,000 | 0,786 | 0,548 |
| Total | 0,418 | 30 | | | |
| Total corregida | 0,025 | 29 | | | |

En la prueba de Duncan al 5% de confianza, el subconjunto 1 en la Tabla 16 muestra al cultivo C18-BL como el mejor tratamiento con una media de 0,15033.

Tabla 16. Prueba de Duncan para similitud de medias del factor Hongo según la concentración de detergentes.

| | Tratamiento | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | | |
|------------------|-------------|---|------------------------------|--------------|--------------|
| | | | 2 | 3 | 1 |
| Duncan(a) | C7AL | 6 | 0,08650 | | |
| | C2BL | 6 | 0,10533 | 0,10533 | |
| | C20AL | 6 | 0,10817 | 0,10817 | |
| | C1BA | 6 | | 0,12217 | |
| | C18BL | 6 | | | 0,15033 |
| | Sig. | | | 0,110 | 0,210 |

De acuerdo al gráfico de perfil (Figura 15) y la prueba de Duncan se obtuvo mayor cantidad de biomasa para el cultivo C18-BL en las dos concentraciones evaluadas, el resto de cultivos presenta una media marginal de biomasa estadísticamente mayor en la concentración de 5 mg.L⁻¹.

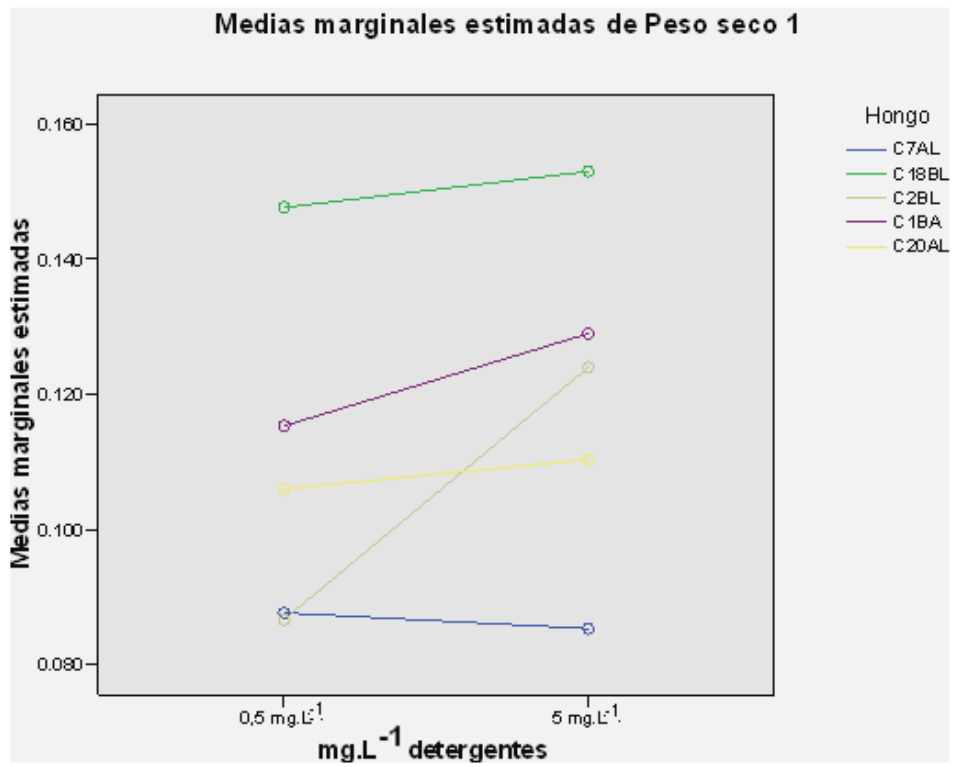
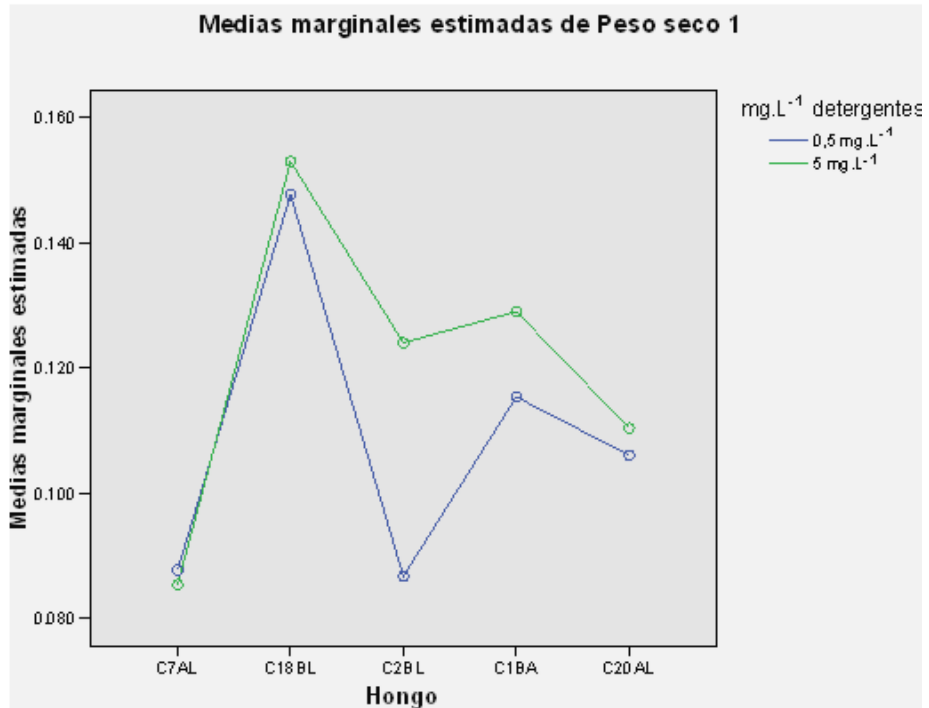


Figura 15. Interacción peso seco según las concentraciones de detergentes.

3.2.3. Remoción de detergentes por hongos seleccionados.

3.2.3.1. Estandarización de método SAAM para determinación de tensioactivos aniónicos.

Para la estandarización del método se realizaron curvas de calibración de las cuales se escogió las curvas que presentaban un R^2 mayor a 0.995, se obtuvo un R^2 promedio de 0.996 y una ecuación de la recta de $y = -0,116x^2 + 1,190x - 0,012$ para determinar la concentración de tensioactivo degradado por los cultivos de hongos. En la Figura 16 se indica la curva promedio de calibración obtenida.

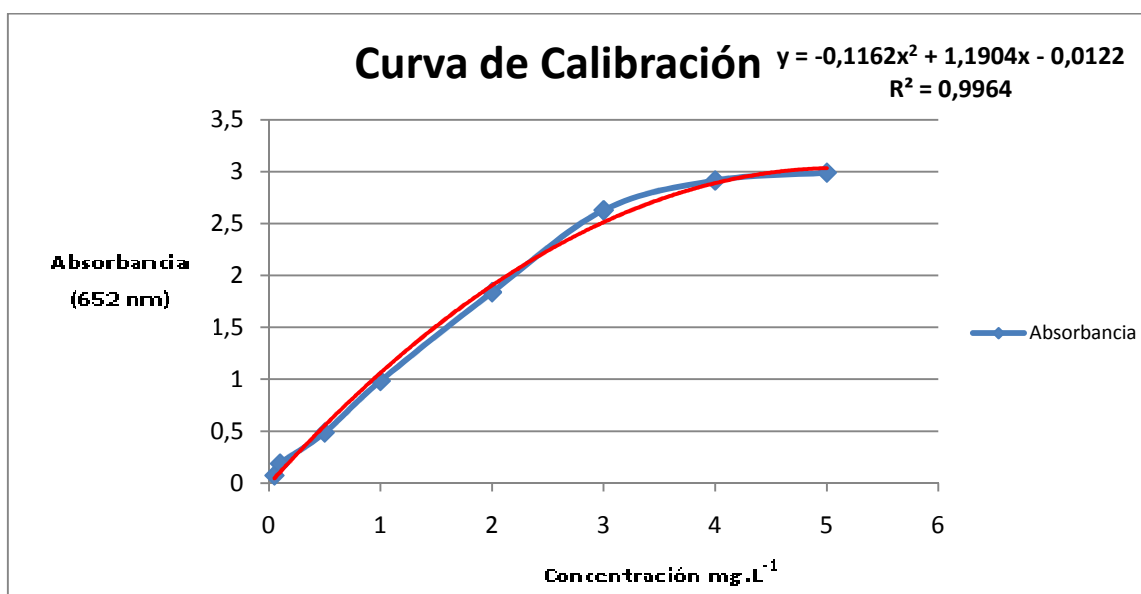


Figura 16. Curva promedio de calibración para la determinación de la concentración de tensioactivo degradada por los hongos seleccionados.

3.2.3.2. Remoción del detergente (tensioactivo aniónico).

Los hongos removieron las concentraciones de detergentes: 0,5 y 5 mg.L⁻¹ a las que fueron sometidos durante 15 días de incubación como se puede ver en la Figura 17.



Figura 17. Ensayo de remoción de detergentes con cinco cultivos de hongos.

3.2.3.3. Evaluación de la remoción de detergentes con hongos.

En el programa SPSS15 se realizó el análisis estadístico para los diferentes tratamientos. A partir de los datos obtenidos en los ensayos realizados, se calculó el ANOVA.

3.2.3.3.1. Análisis de varianza para los datos obtenidos en la evaluación de remoción de detergentes a partir de una concentración de 0,5 mg.L⁻¹.

Para los datos agrupados en la variante hongo se muestra un valor de significancia menor a 0,05, que significa que la remoción de detergentes es heterogéneo, como se observa en la Tabla 17.

Tabla 17. ANOVA para el experimento remoción de detergentes con Hongos a partir de 0,5 mg.L⁻¹.

| Fuente | Suma de cuadrados tipo III | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|------------------|-----------------------------------|-----------|-------------------------|----------|--------------|
| Modelo corregido | 0,020(a) | 4 | 0,005 | 10,664 | 0,001 |
| Intersección | 0,270 | 1 | 0,270 | 563,798 | 0,000 |
| Hongo | 0,020 | 4 | 0,005 | 10,664 | 0,001 |
| Error | 0,005 | 10 | 0,000 | | |
| Total | 0,295 | 15 | | | |
| Total corregida | 0,025 | 14 | | | |

En la prueba de Duncan al 5% de confianza, en relación a la similitud de medias para el factor hongo según la remoción de detergente, se obtuvieron tres subconjuntos diferentes (Tabla 18). El subconjunto 2 muestra el mejor tratamiento.

Tabla 18. Prueba de Duncan para similitud de medias del factor Hongo según la remoción de detergentes.

| | Hongo | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | | |
|------------------|-------------|---|------------------------------|--------------|--------------|
| | | | 2 | 3 | 1 |
| Duncan(a) | C18-BL | 3 | 0,07200 | | |
| | C20-AL | 3 | | 0,11400 | |
| | C7-AL | 3 | | 0,15267 | 0,15267 |
| | C1-BA | 3 | | | 0,15633 |
| | C2-BL | 3 | | | 0,17533 |
| | Sig. | | 1,000 | 0,056 | 0,253 |

En los gráficos de perfil (Figura 18) se indica la remoción de detergentes según las absorbancias obtenidas, se obtuvo una mayor remoción de detergente con el hongo C18-BL, que presenta una absorbancia de 0,072.

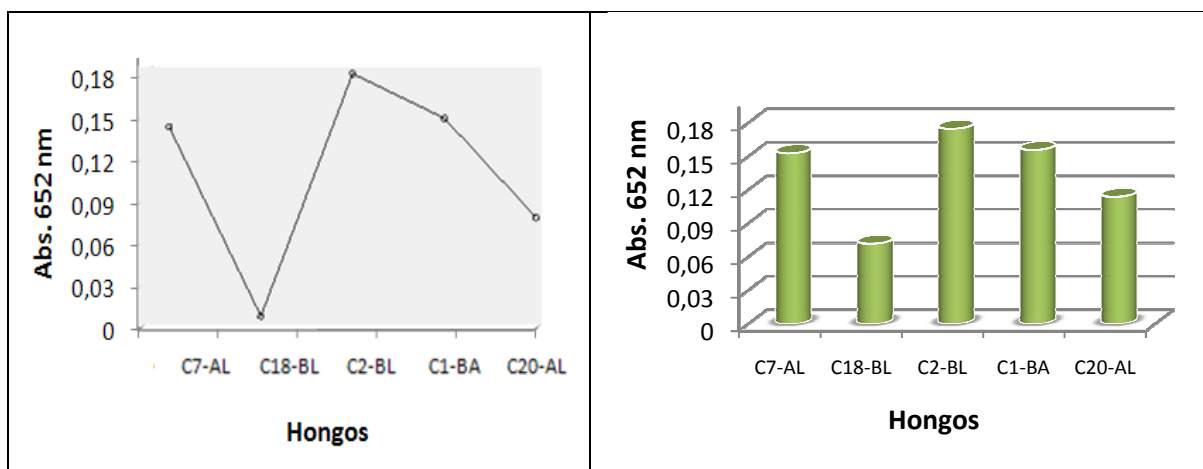


Figura 18. Remoción de detergentes con Hongos a 0,5 mg.L⁻¹.

3.2.3.3.2. Análisis de varianza para los datos obtenidos en la evaluación de remoción de detergentes a partir de una concentración de 5 mg.L⁻¹.

Para los datos agrupados en la variante hongo se muestra un valor de significancia menor a 0,05, que significa que la remoción de detergentes es heterogéneo en al menos uno de los tratamientos aplicados como se observa en la Tabla 19.

Tabla 19. ANOVA para el experimento remoción de detergentes con Hongos a partir de 5 mg.L⁻¹.

| Fuente | Suma de cuadrados tipo III | GI | Media cuadrática | F | Sig. |
|------------------|-----------------------------------|-----------|-------------------------|----------|--------------|
| Modelo corregido | 0,095 | 4 | 0,024 | 16,715 | 0,000 |
| Intersección | 2,771 | 1 | 2,771 | 1956,773 | 0,000 |
| Hongo | 0,095 | 4 | 0,024 | 16,715 | 0,000 |
| Error | 0,014 | 10 | 0,001 | | |
| Total | 2,880 | 15 | | | |
| Total corregida | 0,109 | 14 | | | |

En la prueba de Duncan al 5% de confianza, en relación a la similitud de medias para el factor hongo según la remoción de detergente, se obtuvieron tres subconjuntos diferentes (Tabla 20). Los tres mejores tratamientos se encuentran agrupados en el subconjunto 2.

Tabla 20. Prueba de Duncan para similitud de medias del factor Hongo según la remoción de detergentes.

| | Hongo | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | | |
|------------------|-------------|---|------------------------------|--------------|--------------|
| | | | 2 | 3 | 1 |
| Duncan(a) | C20-AL | 3 | 0,34567 | | |
| | C18-BL | 3 | 0,37267 | | |
| | C7-AL | 3 | 0,40533 | 0,40533 | |
| | C1-VA | 3 | | 0,45400 | |
| | C2-BL | 3 | | | 0,57133 |
| | Sig. | | | 0,093 | 0,144 |

En los gráficos de perfil (Figura 19) se indica la remoción de detergentes según las absorbancias obtenidas, se obtuvo una mayor remoción de detergente con los hongos C20-AL, C18-BL y C7-AL.

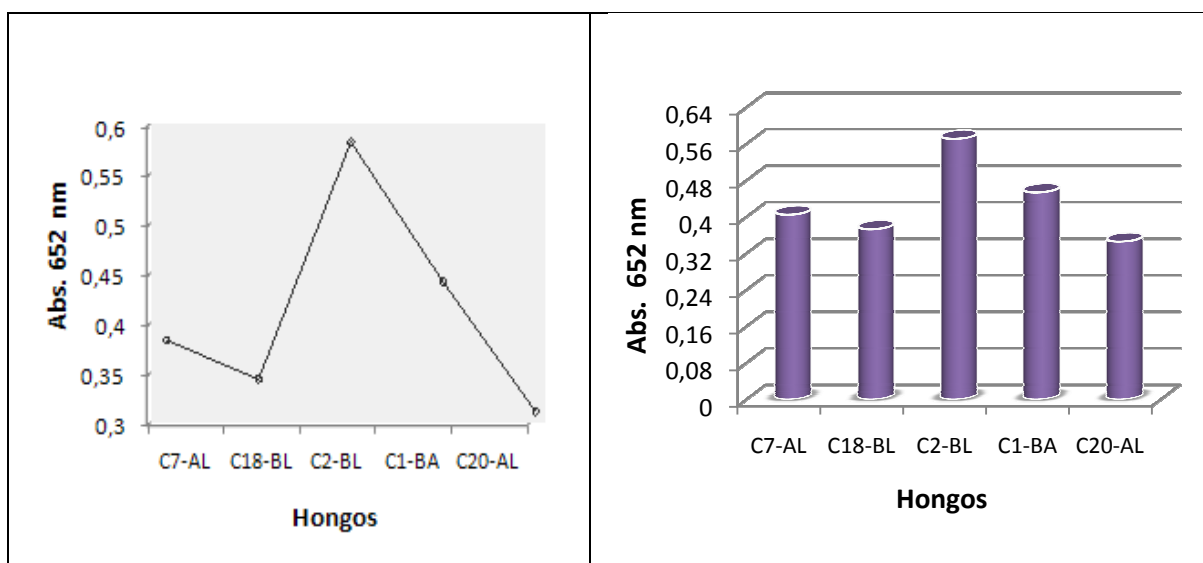


Figura 19. Remoción de detergentes con Hongos a 5 mg.L⁻¹.

Los resultados obtenidos anteriormente se pueden observar cualitativamente según el método de SAAM, en la Figura 20 y 21. En cada figura se especifica con los literales: a) el medio de cultivo de cada hongo (sobrenadante de la filtración al vacío) y b) la remoción del detergente con

hongos de acuerdo a la coloración azul obtenida (fase orgánica con la formación del par iónico entre el azul de metileno y el detergente).

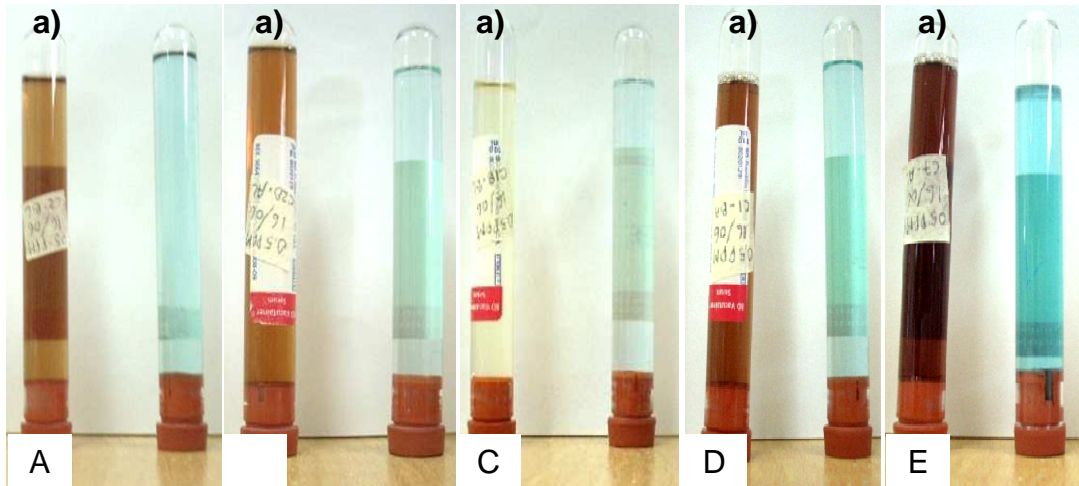


Figura 20. Medición de la concentración de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de tensioactivo aniónico después de su remoción por los cultivos de hongos: (A) C2-BL, (B) C20-AL, (C) C18-BL, (D) C1-BA, (E) C7-AL.

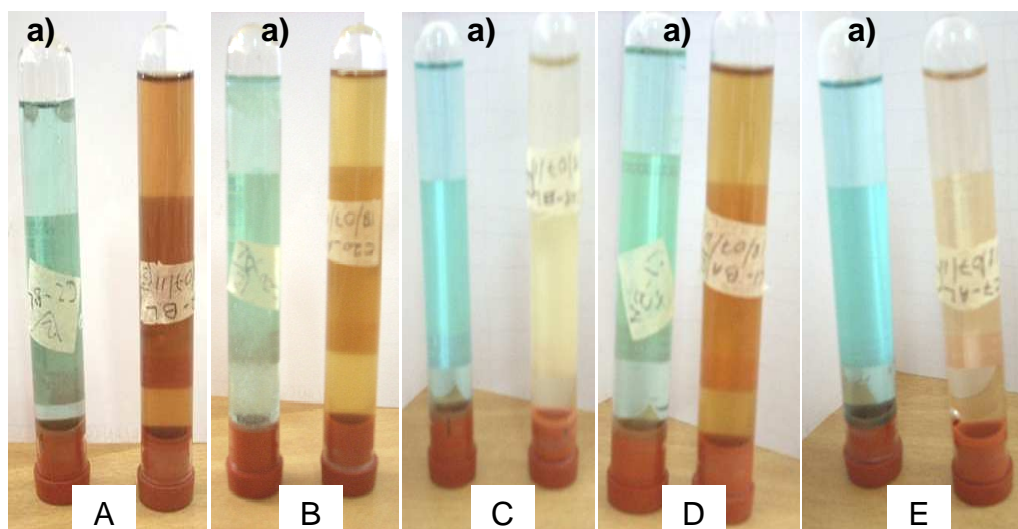


Figura 21. Medición de la concentración de 5 mg.L^{-1} de tensioactivo aniónico después de su remoción por los cultivos de hongos: (A) C2-BL, (B) C20-AL, (C) C18-BL, (D) C1-BA, (E) C7-AL.

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

4.1. Concentraciones de metales pesados y detergentes elegidas para el estudio.

Las industrias textiles del Ecuador generan millones de litros de aguas residuales al año (Rodríguez *et al.*, 1999), que contienen productos químicos tóxicos en concentraciones elevadas o dentro de los rangos permitidos por las leyes del país como podemos ver en el Anexo C, donde se muestra el análisis de aguas residuales que genera normalmente en su producción una empresa textil.

Con el objetivo de reducir estas concentraciones de productos tóxicos lo máximo posible, los ensayos de esta tesis se realizaron tomando los valores máximos permitidos por las leyes del país (Anexo A y B) para descarga de aguas residuales a cuerpos de agua como una de las concentraciones a evaluarse y se calculó el 10% de incremento de concentración de la misma como otro punto de referencia.

Se consideró este incremento del 10% ya que en los resultados confidenciales de los análisis de laboratorio de las aguas residuales proporcionados por la empresa textil (Anexo C), las concentraciones no sobrepasan los rangos permitidos y el incremento del 10% en la concentración a evaluarse cubre estos rangos. Tomando en cuenta que el objetivo posterior al finalizar ésta investigación es que este sistema de tratamiento de aguas se aplique en una planta piloto en una empresa textil se realizó este estudio en base a los datos reales de una empresa.

4.2. Tolerancia de los hongos a metales pesados.

La capacidad de “tolerancia” está relacionada con ciertas propiedades bioquímicas y estructurales propias de los organismos como la permeabilidad de su pared celular, producción de polisacáridos extracelulares y excreción de metabolitos (Cuahutémoc, 2010). En este trabajo se definió la tolerancia de los hongos en base producción de biomasa en medios de cultivo con metales pesados y detergentes.

Tomando en cuenta la definición anterior podemos decir que los cinco cultivos de hongos presentaron tolerancia a las diferentes concentraciones de metales pesados (hierro, cobre, cromo, zinc) a los que fueron sometidos.

Hay que resaltar que dentro de las propiedades de tolerancia de los hongos se pueden tomar en cuenta mecanismos intra y extracelulares que nos darían una definición de cómo los hongos en presencia de metales tuvieron una producción de biomasa significativa (Cuahutémoc, 2010).

Estos mecanismos solo se los sugerirá como una posible referencia bibliográfica pues en esta investigación se evaluó la tolerancia de los hongos en base a la cantidad de biomasa producida, como lo hace en la literatura, Díaz *et al.*, 2002 en su estudio de remoción de metales pesados en función de la cantidad de biomasa obtenida. En este estudio Díaz sugiere que los mecanismos de tolerancia se deben a cambios no conocidos en los componentes de la pared celular de los hongos, y que inclusive dentro de la misma especie de hongos estos mecanismos pueden cambiar. Sin embargo no se puede asegurar que existan diferencias genéticas entre los hongos, esto se debería identificar con otro estudio posterior.

Siendo así, podemos decir que estadísticamente el hongo C7-AL y el consorcio de hongos C20-AL, fueron los mejores tratamientos (mayor producción de biomasa) a pesar de que todos los cultivos se mantuvieron a las mismas condiciones de incubación. Este resultado también concuerda con el estudio realizado por Navarro *et al.*, remoción de cromo con obtención de biomasa celular, donde la biomasa producida varía de acuerdo a la concentración a la que se encuentra el metal.

Dentro de los mecanismos intracelulares tenemos la presencia de metalotioneína (MT), en el interior de la célula, que presentan un alto contenido de grupos sulfhidrilo, que pueden unirse a iones metálicos formando complejos. Las MT transportan los metales a compartimentos en el interior de la célula o hacia el exterior. Así lo menciona Brambile & González, 1999; y plantea este mecanismo con algunos metales como zinc y cobre.

Otro mecanismo es la presencia de glutatión (GSH), actúa en respuesta a diversas situaciones de estrés por el hongo, quelando y secuestrando los iones metálicos que penetran en el citoplasma, reduciendo los efectos dañinos tóxicos producidos (Hansberg, 2002).

Dentro de los mecanismos extracelulares tenemos la capacidad de los hongos para producir ácidos orgánicos en respuesta al contacto de sus hifas con metales pesados. Ácidos como el cítrico y láctico, son excretados y actúan como quelantes de iones metálicos (Cuahutémoc, 2010). También Tobin *et al.*, 1994 en su estudio sugiere que la pared celular de las hifas está compuesta por quitina, glucanos, polímeros y proteínas que actúan como sitios potenciales de unión para los iones metálicos.

4.3. Producción de Biomasa.

La producción de biomasa de los cinco cultivos de hongos no fue afectado por la presencia de los metales pesados ni detergentes en los medios sólidos, de forma contraria promovió una mayor producción de crecimiento. Estos resultados se los puede comparar con los estudios realizados por Taboski *et al.*, 2005 donde el género *Fusarium* presenta un incremento en la producción de biomasa en presencia de diversos metales pesados a altas concentraciones.

4.4. Tolerancia y remoción de tensoactivos.

En los ensayos realizados, los cinco cultivos de hongos presentaron tolerancia y removieron tensoactivos.

Para entender el mecanismo de remoción de los tensoactivos por parte de los hongos en estudio y, por ende, su previa tolerancia a los mismos, es importante conocer que los microorganismos pueden oxidar o modificar la molécula del tensoactivo. De esta manera el componente pierde las propiedades tensioactivas o de lo contrario destruyen las moléculas de un compuesto químico, obteniendo como resultado dióxido de carbono (CO₂), sales inorgánicas y otros productos asociados al metabolismo normal de los microorganismos como lo menciona en la literatura Lechuga, 2005 y AISE, 2000.

Es decir los detergentes sufren ciertos procesos de biodegradabilidad conocidas como primaria y final o total según AISE, 2000.

Los datos obtenidos en los diferentes ensayos evaluados durante 15 días, para tolerancia y remoción de detergentes concuerdan con Lechuga, 2005 pues los cinco cultivos de hongos presentaron un incremento en su crecimiento en este tiempo. De esta manera podemos suponer que dentro del metabolismo de los hongos, estos utilizaron el lauril sulfato de sodio como fuente de carbono.

Los resultados demuestran que el porcentaje de remoción promedio fue más del 50%, es decir que la concentración inicial a la que se sometió el hongo en el medio de cultivo se redujo a la mitad o a una concentración menor. Las concentraciones obtenidas se compararon con la curva de calibración (Figura 13), obteniendo que el cultivo C18-BL y el consorcio C20-AL removieron una concentración mayor de detergente.

Jiménez, 1991, demuestra que para la biodegradación de tensioactivos aniónicos es más eficiente trabajar con consorcios o microorganismos, pues permite catabolizar por completo el tensioactivo aniónico LAS, lo que se demuestra con los resultados obtenidos donde el consorcio C20-AL fue uno de los mejores tratamientos.

El tiempo de incubación de los hongos se estableció como parámetro constante en todos los ensayos realizados en la tesis, tolerancia a metales, detergentes y remoción de los mismos. Este parámetro de 15 días se tomó de la literatura Velasco, 2004 donde menciona las característica óptima de incubación de hongos, además de que los resultados obtenidos cumplen con los objetivos planteados.

Sin embargo para lograr el 100% de la biodegradación es necesario aumentar el tiempo de seguimiento del ensayo, con el propósito que los microorganismos puedan seguir con su metabolismo y alcanzar la

biodegradación completa del tensoactivo, y los elementos obtenidos en toda la biodegradación todavía le sirven como fuente de carbono (Paladines, 2011).

4.5. Método de SAAM.

Algunas investigaciones se han realizado aplicando este método como lo hace Lechuga 2005, para el seguimiento de la biodegradación primaria del tensoactivo aniónico. De igual manera lo aplica Soberón, 1988, en la “Determinación de detergentes mediante el método SAAM en la región noreste del estado de Tamaulipas, México”.

Según la bibliografía en Standard Methods, 2005, la coloración azul de la muestra en estudio refleja la presencia de tensoactivo y la concentración en la que se encuentra, al comparar los resultados en una curva de calibración elaborada inicialmente como punto de referencia.

En los resultados obtenidos como se puede ver en las Figuras 20 y 21, la remoción del detergente es notable de acuerdo a la coloración azul analizada espectrofotométricamente y concuerdan con la bibliografía mencionada y de estudios realizados por Aguilar, 2001.

Los resultados mencionados alcanzaron los porcentajes de remoción de detergentes necesarios para obtener la concentración máxima permitida por TULAS y el Distrito Metropolitano de Quito (Anexos A y B), siendo así que las aguas residuales tratadas previamente con hongos podrán ser liberadas a los cuerpos de aguas cumpliendo con las normas y parámetros permitidos por las leyes del Ecuador.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.

- Los cinco hongos estadísticamente son tolerantes a los metales pesados en sus diferentes concentraciones: Cobre: 1 y 10 mg.L⁻¹, Hierro: 10 y 100 mg.L⁻¹, Zinc: 5 y 50 mg.L⁻¹, Cromo: 0.5 y 5 mg.L⁻¹.
- Estadísticamente el hongo C7-AL y el consorcio de hongos C20-AL, presentaron mayor cantidad de biomasa en presencia de metales.
- Los cinco cultivos de hongos estadísticamente son tolerantes a detergentes a las concentraciones de 0.5 y 5 mg.L⁻¹.
- Estadísticamente el hongo C1-BA y el consorcio de hongos C20-AL, presentaron mayor cantidad de biomasa en presencia de detergentes.
- Estadísticamente el hongo C18-BL y el consorcio C20-AL removieron un porcentaje mayor de detergentes.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES.

- Probar estos hongos para la reducción de concentración de metales pesados ya que presentan tolerancia a ellos.
- Con el fin de seguir con el presente proyecto y reafirmar los resultados obtenidos, se sugieren realizar posteriores investigaciones en un planta piloto para tratamientos de aguas residuales.
- Evaluar diversos usos para la biomasa sobrante de los hongos.
- Determinar el uso de los cinco cultivos de hongos en otras industrias y áreas de impacto ambiental en nuestro país.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA.

1. Acosta, E. "Sustitución de materias primas para la industria textil" En línea: (http://www.corporacionambientalempresarial.org.co/documentos/Acar_sustitucion_materias_primas.pdf).
2. Aguilar, 2001. Determinación de sustancias activas al azul de metileno (SAAM) en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas. En línea:(<http://www.semarnat.gob.mx/leyesy normas/Normas%20Mexicanas%20vigentes/NMX-AA-039-SCFI-2001.pdf>).
3. AISE, 2000. En línea: (<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:52002DC0287:ES:HTML>) y (<http://www.ingenieroambiental.com>).
4. AITE, 2011. Asociación de Industriales Textiles del Ecuador. En línea: (<http://www.aite.com.ec/>).
5. Altmajer D, 2004. Formulaciones Detergentes Biodegradables: Ensayos de Lavado. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, España.
6. Alteraciones del agua, 2008. En línea: (<http://www1.celt.es/asignaturas/ecologia/Hipertexto/11CAgu/100CoAcu.htm>).
7. Ángulo, M., 2005. "Análisis del Cluster Textil". Oficina general del Sistema de Bibliotecas y Biblioteca Central de la UNMSM, Perú. En línea: (http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/tesis/ingenie/angulo_lm/cap2.PDF).
8. Araujo, I.; Gómez, A.; Barrera, M.; Angulo, N.; Morillo, G.; Cárdenas, C.; Herrera, L.; 2008. "Surfactantes biológicos en la biorremediación de

- aguas contaminadas.”, Caracas, Bolivia. En línea:
(http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0378-18442008000400004&script=sci_arttext).
9. Argumedo-Delira, R.; Alarcón, A.; Ferrera-Cerrato, R.; Peña-Cabriales, J.; 2009. “El Género Fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos”. En línea:
(<http://scielo.unam.mx/pdf/rica/v25n4/v25n4a6.pdf>).
10. Arnoux y Caruelle. “Detergentes y jabones.” En línea:
(<http://www.cienciaspuras.com/pdfs/quimica%20detergentes%20y%20jabones%20%20bachiller.pdf>).
11. AISE, 2009. Association Internationale de la Savonnerie, de la Détergence et des Produits d'Entretien International Association for Soaps, Detergents and Maintenance Products.
12. Baeko Cho,, 2005. Manual el cultivador de Hongos. MushWorld. En línea: (http://www.girgolas.unlugar.com/chapter01-01_p.1.pdf).
13. Ballester, A., 2000. La extracción de los metales: Generalidades y Evolución Histórica, Vol I. Ed. Síntesis, S.A. p. 507.
14. Ballesteros, J., 1995. Sociedad y Medio Ambiente, s. ed. Madrid, Editorial Tecnos.
15. Bellion, M.; Courbout, M.; Jacob, C.; Blaudez, D. y Chalot, M., 2006. Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Letters*. 254: 173-181.

16. Bial–Aristegui, 2002. El reino de los hongos. Rev Iberoam Micol. En línea: (<http://hongos-alergenicicos.reviberoammicol.com/files/001.PDF>).
17. Brambila C. E. y Lozano, Z. P., 1999. Metalotioneinas bioquímica y funciones propuestas. Boletín de Educación Bioquímica 18: 21-23.
18. Calderone, R.; Braun, P., 1991. Adherence and Receptor Relationships of *Candida albicans*. Microbiol Rev. 55: 1-20.
19. Cárdenas, J.; Moctezuma-Zarate, M.; Acosta-Rodríguez, I.; 2010. “Aislamiento de hongos resistentes a metales pesados a partir de agua de diferentes Ríos de la Huasteca Potosina”. Revista Académica de Investigación. En línea: (http://www.eumed.net/rev/tlatemoani/01/pdf/19-24_iar.pdf).
20. Castro M. & Chunga C., 1985. El Problema de los Detergentes en el Reuso de Aguas Residuales Tratadas en Lagunas de Estabilización. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú.
21. CGPL, 2008. “Guía de Buenas Prácticas Ambientales para el Sector Textil en Guatemala”. Centro Guatemalteco de Producción más Limpia, Guatemala. En línea: (http://www.caftadr-environment.org/outreach/publications/13_Cleaner_Production_Guia_de_Buenas_Practicas_Ambientales_para_el_Sector_Textil_en_Guatemala.pdf).
22. Ciencia Nicolaita. En línea: ([http://expertos.conabio.gob.mx/adjuntos/DBS1 .pdf](http://expertos.conabio.gob.mx/adjuntos/DBS1.pdf)).
23. Codina Escobar y Pérez García, 1993. "Los metales pesados como polucionantes tóxicos". Universidad en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Málaga, España.

24. Cortés, J, 2008. Evaluación del efecto de extractos etanólicos de própolis sobre el control de *Alternaria solani* en cultivo ecológico de tomate, (*Solanum lycopersicum.*), Barcelona, España. En línea: (<http://upcommons.upc.edu/pfc/bitstream/2099.1/10194/1/Memoria.pdf>).
25. Cuahutémoc Rojas Loria, 2010. Universidad Autónoma Metropolitana, MÉXICO, D.F. En línea: (<http://148.206.53.231/UAMI14704.pdf>).
26. Da Ros., G.; 1995. La Contaminación de Aguas en el Ecuador: Una aproximación económica. Quito: Abya Yala.
27. Diana L. Vullo, 2003. “Microorganismo y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente”, Buenos Aires, Argentina. En línea: (<http://redalyc.uaemex.mx/pdf/863/86320303.pdf>).
28. Díaz, M.; Moctezuma, M.; Acosta, I.; 2002. “Aislamiento de hongos resistentes a metales pesados a partir de desechos mineros y su capacidad de remoción de metales pesados y flúor en solución”. En línea: (<http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/mexico13/071.pdf>).
29. Echarri Prim, 2009. Ciencias de la Tierra y el Medio Ambiente. En Línea: ([http://www.tecnun.es/asignaturas/ecologia/hipertexto/12EcosPel/120Div Biol.htm](http://www.tecnun.es/asignaturas/ecologia/hipertexto/12EcosPel/120DivBiol.htm)).
30. Fergusson, J.F., 1990. Impacto en el Medio Ambiente: Efectos Tóxicos, Vol I. New York, MCGarry. p. (pp. 103 - 106).
31. Goyzueta, F. “Los tensoactivos y su aplicación el la Industria Textil” En línea: (<http://www.artisam.org/descargas/pdf/TENSOACTIVOS.pdf>).

32. Hansberg Torres, 2002. Mensaje Bioquímico, Vol XXVI. Universidad Nacional Autónoma de México, DF. En línea: ([http://laguna.fmedic.unam.mx/mensaje bioquimico](http://laguna.fmedic.unam.mx/mensaje_bioquimico)).
33. Hatvani N. y Mécs I., 2002. Effects of the nutrient composition on dye decoloration, and extracellular enzyme production by *Lentinula edodes* on solid medium. *Enzymes and microbial technology* 30. pp. 381 – 386.
34. Herbas, R.; Rivero, F.; Gonzales, A.; 2006. “Indicadores biológicos de calidad del agua”. Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba. En línea: ([http://www.fcyt.umss.edu.bo/docentes/29/documentos/indicadores BiologicosCalidadAgua.pdf](http://www.fcyt.umss.edu.bo/docentes/29/documentos/indicadores_BiologicosCalidadAgua.pdf)).
35. Aranberri, B.P. Binks, J.H. Clint, P.D.I. Fletcher; 2006. “Elaboración y caracterización de emulsiones estabilizadas por polímeros y agentes tensoactivos” *Revista Iberoamericana de Polímeros*. Vol, 7. En línea: (<http://www.ehu.es/reviberpol/pdf/AGO06/aranberri.pdf>).
36. InsuAgro, 2008. Calidad en Agroquímicos. En línea: ([http://www.insuagro.com. ar/pdf/PROSTICK%20MSDS.pdf](http://www.insuagro.com.ar/pdf/PROSTICK%20MSDS.pdf)).
37. Issa Katime, José R. Quintana y Manuel Villacampa, 2003. “Micelas” *Revista Iberoamericana de Polímeros*. Vol, 4. En línea: ([http://www.ehu.es/ reviberpol/pdf/ABR03/Quintana2003.pdf](http://www.ehu.es/reviberpol/pdf/ABR03/Quintana2003.pdf)).
38. Jimenez L., Breen A., Thomas N., Federle T.W. and Saylor G.S., 1991. Mineralization of linear alkylbenzene sulfonate by a Four-member Aerobic bacterial Consortium. Ohio. USA.
39. Junta de Andalucía, 1998. En línea: ([http://edafologia.ugr.es/gestionsuelos/ grupoa/tema11.pdf](http://edafologia.ugr.es/gestionsuelos/grupoa/tema11.pdf)).

40. Jiménez, H.; Benítez, E.; 2005. Influencia del azufre y del tipo de sustrato sobre el crecimiento de los hongos ruminales *Neocallimastix Frontalis* y *Orpinomyces Intercalaris*". Revista Corpoica, Vol 6. En línea: (<http://www.corpoica.org.co/sitioweb/ofertas/articulo.asp?id=1310>).
41. Lara, R., 2002. Contaminación de las Aguas por Metales, 4ª ed. México, Editorial Limusa. p. 98, p. 103.
42. Manzanaro, R., 2006. Toxicidad y Efectos de Metales Pesados, Vol I. España, Editorial McGraw Hill. p. (pp. 38 - 47).
43. Meléndez R, 2008. "Detergentes Biodegradables". En línea: (<http://www.lajornadamorelos.com/opinion/articulos/67934?task=view>).
44. Nápoles, J.; Ábalos, A; 2005. "Biorremediación de ecosistemas contaminados con xenobióticos". Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba. En línea: (<http://monografias.uo.edu.cu/index.php/monografias/article/viewFile/4/6>).
45. Navarro, B.; Moctezuma, M.; Acosta, I.; 2002. "Remoción de cromo por la biomasa celular de la levadura capsulada".
46. Normas de Calidad Ambiental y Descarga de efluentes, 2011. En línea: (<http://www.Norma+de+Calidad+Ambiental+y+de+Descarga+de+efluentes+aplicada+al+recurso+agua>) y En línea: (<http://www.scribd.com/doc/tulas>).
47. Ortiz, M.J, Lara, R., 2004. Estudio y Evaluación de la estabilización de los Metales Pesados, s.ed. México, Editorial Continental. p. 123, p. 145.

48. Principales orígenes antropogénicos de los metales pesados, 2007. En línea: (http://www.tesisexarxa.net/TESIS_UPC/AVAILABLE/TDX/INTRODUCCION.pdf).
49. Realpe, 2009. “Estudio de contaminación del agua por productos fabricados a base de PVC usando espectroscopia de absorción atómica y quimiometría.” En línea: (<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/236/1/236T0023.pdf>).
50. Rodríguez, E, Pickard, M. A y Vazquez-Duhalt, R., 1999. Industrial dye decolorization by lacases from ligninolytic fungi. *CurrMicrobiol.* 38, pp. 27 – 32.
51. Sánchez; Rodríguez, 1999. Fundamentos y Aspectos microbiológicos. “Biorremediación”. En línea: (http://ingenierosdeminas.org/docu/documentos/fundamentos_%20biorremediacion.pdf).
52. Sibila, A.; 2008. “Evaluación de la Biodegradabilidad y Ecotoxicidad de Tensoactivos en el Medio Acuático Marino”. Universidad de Cádiz, España. En línea: (http://minerva.uca.es/publicaciones/asp/tesis/sibila_lores.pdf).
53. Silva, 1995. Salamanca-Villavlcencio. Edición: Hora Cubillos Quintero. En línea: (http://cadenahortofruticola.org/admin/bibli/252micorriza_alternativa_manejo_sostenible.pdf).
54. Standard Methods for the examination of Water and Wastewater, 2005. Edition 21th.

55. Swisher, 1963. Biodegradation of ABS in relation to chemical structure. Water Pollut.
56. Taboski, M. A. S.; Rand, T. G. y Piorkó A., 2005. Lead and cadmium uptake in the marine fungi *Corollospora lacera* and *Monodictys pelagica*. FEMS Microbiology Ecology, 53: 445–453.
57. Tenorio, G., 2006. “Caracterización de la biosorción de cromo con hueso de aceituna”. Universidad de Granada Facultas de Ciencias. En línea: (<http://digibug.ugr.es/bitstream/10481/1350/1/16476736.pdf>).
58. Tobin, J.M.; White C. y Gadd, G. M., 1994. Metal accumulation by fungi: applications in environmental biotechnology. Journal of Industrial Microbiology, 13: 126-130.
59. Velasco, J.; 2004. “Cultivo del hongo seta”. En línea: (http://grupos.emagister.com/documento/cultivo_del_hongo_seta_fungicultura_/1043-38650).
60. Vullo, D.; 2003. “Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente”. Revista Química Viva, Vol. 2. En línea: (<http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/Actualizaciones/metales/metales.htm>).
61. Wakeman, R.J. and Tarleton, 1999. Filtration: Equipment Selection, modeling and process Simulation, Elsevier Sci., Oxford, 81-82. En línea tomado del manual de filtración: (<http://es.scribd.com/doc/8634301/Manual-de-Filtracion>).

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, **Carol Andrea Yépez Guerrero**

Declaro que:

La tesis de grado titulada “**REMOCIÓN DE DETERGENTES DE AGUAS RESIDUALES TEXTILES EMPLEANDO HONGOS SELECCIONADOS OBTENIDOS A PARTIR DE EFLUENTES DE INDUSTRIA TEXTIL Y EVALUACIÓN DE SU TOLERANCIA A METALES PESADOS A NIVEL DE LABORATORIO.**”, ha sido desarrollada con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, 15 de Diciembre del 2011.

Carol Andrea Yépez Guerrero

CERTIFICACIÓN

Lic. Biol. Alma Koch, MC.

Dra. Blanca Naranjo

Certifican:

Que el trabajo titulado “**REMOCIÓN DE DETERGENTES DE AGUAS RESIDUALES TEXTILES EMPLEANDO HONGOS SELECCIONADOS OBTENIDOS A PARTIR DE EFLUENTES DE INDUSTRIA TEXTIL Y EVALUACIÓN DE SU TOLERANCIA A METALES PESADOS A NIVEL DE LABORATORIO**”, realizado por la Srta. **CAROL ANDREA YÉPEZ GUERRERO**, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple con las normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto, en el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a al Srta. Carol Andrea Yépez Guerrero que lo entregue al Ing. Rafael Vargas, en su calidad de Coordinador de la Carrera.

Sangolquí, 15 de Diciembre del 2011.

Lic. Biol. Alma Koch, MC.

DIRECTORA

Dra. Blanca Naranjo

COORDIRECTORA

AUTORIZACIÓN

Yo, Carol Andrea Yépez Guerrero

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución de la tesis de grado titulada: "REMOCIÓN DE DETERGENTES DE AGUAS RESIDUALES TEXTILES EMPLEANDO HONGOS SELECCIONADOS OBTENIDOS A PARTIR DE EFLUENTES DE INDUSTRIA TEXTIL Y EVALUACIÓN DE SU TOLERANCIA A METALES PESADOS A NIVEL DE LABORATORIO", cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 15 de Diciembre del 2011.

Carol Andrea Yépez Guerrero