



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

MAESTRÍA EN INGENIERÍA AMBIENTAL Y TECNOLOGÍAS SUSTENTABLES



HONGOS EXTREMÓFILOS: ALTERNATIVA PARA LA
BIORREMEDIACIÓN DE AGUAS RESIDUALES DE RASTROS
MUNICIPALES EN MORELOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN INGENIERÍA AMBIENTAL Y TECNOLOGÍAS
SUSTENTABLES**

PRESENTA

Verónica Ramírez Lona

ASESOR: DR. RAMÓN ALBERTO BATISTA GARCÍA



Facultad de Ciencias
Químicas e Ingeniería

CUERNAVACA, MORELOS

Este proyecto se realizó en la Universidad Autónoma del Estado de Morelos en el Laboratorio de Organismos Extremófilos del Centro de Investigación en Dinámica Celular, en el Laboratorio de Biología Molecular de Hongos del Centro de Investigación en Biotecnología y en el Laboratorio de Química Industrial de la Facultad de Química e Ingeniería, todos ubicados en Cuernavaca Mor. La tesis fue dirigida por el Dr. Ramón Alberto Batista García, y se contó con el apoyo financiero del Programa de Becas Nacionales de Posgrado otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Beca No. 888898.

COMITÉ REVISOR

DR. RAMÓN ALBERTO BATISTA GARCÍA

DRA. CONSTANZA RAMÍREZ MACHÍN

DRA. ELISABET ARANDA BALLESTEROS

DRA. MARÍA DEL RAYO SÁNCHEZ CARBENTE

DR. JORGE LUIS FOLCH MALLOL



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS e INGENIERÍA
Programas educativos de calidad reconocidos por CIEES y CACEI
Certificada en la norma ISO 9000:2008

Maestría en Ingeniería Ambiental y Tecnologías Sustentables.

Cuernavaca, Morelos, a 24 de octubre del 2019.

NOMBRAMIENTO DE COMISIÓN REVISORA Y DICTAMEN DE REVISIÓN (T-2)

- Dr. Ramón Alberto Batista García.
- Dra. Constanza Machín Ramírez.
- Dra. María del Rayo Sánchez Carbente.
- Dra. Elisabet Aranda Ballesteros.
- Dr. Maikel Gilberto Fernández López.

PRESENTE.

Por este conducto, me permito informarle que ha sido asignado como integrante de la Comisión Revisora de la tesis que presenta la **IBQM. Verónica Ramírez Lona** titulada: **“Hongos extremófilos: alternativa para la biorremediación de aguas residuales de rastros municipales en Morelos”** realizada bajo la dirección del **Dr. Ramón Alberto Batista García** en el Programa Educativo de Maestría en Ingeniería Ambiental y Tecnologías Sustentables. Agradezco su valiosa participación en esta Comisión y quedo a sus órdenes para cualquier aclaración o duda al respecto.

ATENTAMENTE
“Por una humanidad culta”

Constanza Machín Ramírez
Dra. Constanza Machín Ramírez.
Coordinadora de la MIATS.

Dra. Constanza Machín Ramírez.
Coordinadora de la MIATS.

PRESENTE.

En respuesta a su amable solicitud para formar parte de la Comisión Revisora de la tesis mencionada, en esta vez realizada la revisión correspondiente, me permito informarle que mi VOTO es:

DICTAMEN

NOMBRE	VOTO	FIRMA
Dr. Ramón Alberto Batista García.	Aprobatorio	<i>R. Batista</i>
Dra. Constanza Machín Ramírez.	Aprobatorio	<i>Constanza</i>
Dra. María del Rayo Sánchez Carbente.	Aprobatorio	<i>M. del Rayo</i>
Dra. Elisabet Aranda Ballesteros.	Aprobatorio	<i>E. Aranda</i>
Dr. Maikel Gilberto Fernández López.	Aprobatorio	<i>M. Gilberto</i>

FCQel - UAEM

MIATS



MAESTRIA EN INGENIERIA AMBIENTAL Y TECNOLOGIAS SUSTENTABLES

c.c.d. Archivo

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209,
Tel. (777) 329 70 00, Ext. 3297. e-mail: miats.fcqei@uaem.mx



DEDICATORIA

En primer lugar, dedico este trabajo a Dios, a mis padres Silvia Lona Hernández y Rogelio Ramírez Ángel a mis sobrinos Karen Violeta Ramírez Rodríguez y Fco. Daniel Ramírez Rodríguez, que son mi motor y mi más grande amor por siempre estar conmigo dándome fortaleza, por sus palabras y por siempre escucharme en los momentos de flaqueza que tuve en esta etapa de mi carrera.

A mi familia y amigos que en todo momento están presentes en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos mis profesores y compañeros que me guiaron y apoyaron durante este trabajo de investigación, cada uno formo parte fundamental en mi desarrollo y formación profesional y personal que tuve a lo largo de estos dos años.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	5
1.1 Antecedentes	5
1.1.1 Contaminación de agua en México	5
1.1.2 Agua residual de Rastros Municipales	6
1.1.3 Alternativas de tratamiento	7
1.1.4 Biorremediación con microorganismos extremófilos	9
1.2 Marco teórico	10
1.2.1 Problemática ambiental del agua	10
1.2.2 Clasificación de aguas residuales	12
1.2.3 Problemática ambiental generada por los rastros municipales en México	13
1.2.4 Problemática ambiental por aguas residuales de rastros municipales en Morelos	20
1.2.4 Biorremediación	22
1.2.5 Microorganismos halófilos	27
CAPÍTULO 2. PLANTEAMIENTO GENERAL DE LA INVESTIGACIÓN	30
2.1 Planteamiento del problema	30
2.2 Justificación	31
2.3 Hipótesis	31
2.4 Objetivo	32
2.4.1 Objetivo general	32
2.4.2 Objetivos específicos	32
CAPÍTULO 3. DISEÑO Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	32
3.1 Diseño experimental	32
3.1.1 Diseño bidimensional de varianza (ANOVA)	33
3.1.2 Diseño de Heatmapper (Mapa de calor)	33
3.1.3 Diseño factorial 2^k	33
3.2 Estrategia experimental	34
3.3 Materiales y métodos	35
3.3.1 Microorganismos y obtención de biomasa	35

3.3.2 Caracterización Morfológica.	36
3.3.3 Identificación Molecular de los Hongos.	36
3.3.4 Caracterización halófila.	38
3.3.5 Ensayo Xerófilo condición de $a_w = 0.85$	38
3.3.6 Crecimiento en sangre bobina.	39
3.3.7 Crecimiento en celulosa.	40
3.3.8 Crecimiento en presencia de HPAs; Benzo [α] pireno y Fenantreno.	40
3.3.9 Crecimiento en presencia de diésel y gasolina.	41
3.3.10 Crecimiento en agua residual artificial.	41
3.3.11 Preparación de preinóculo.	42
3.3.12 Cuantificación de enzimas extracelulares en el tratamiento fúngico del agua residual (prototipo).	42
3.3.12.1 Cuantificación de proteasas.	42
3.3.12.2 Cuantificación de la actividad esterasa.	43
3.3.12.3 Cuantificación de la actividad lacasa.	43
3.3.12.4. Cuantificación de la actividad peroxidasa.	44
3.3.12.5 Cuantificación de la actividad lignina peroxidasa.	44
3.3.12.6 Cuantificación de la actividad amilasa, celulasa y xilanasas.	45
3.3.13 Determinación de DQO en el tratamiento del agua residual (prototipo).	45
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	46
4.1 Características microscópicas y macroscópicas de los 10 hongos.	46
4.1.2 Identificación molecular de los aislados fúngicos.	51
4.1.3 Caracterización halófila.	53
4.1.4 Crecimiento xerófilo ($a_w = 0.85$).	55
4.2 Crecimiento en sangre bobina.	58
4.2.1 Crecimiento en MM Vogel's con celulosa, HPAs, gasolina y diésel.	60
4.3 Tratamiento fúngico en agua residual de rastros (prototipo)	66
4.3.1 Determinación de actividad enzimática extracelulares	68
CAPITULO 5. CONCLUSIONES	69
BIBLIOGRAFIA.....	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Promedio de agua requerida por animal sacrificado	14
Tabla 2: Estadísticas de cabezas sacrificadas y generación de aguas residuales por año en México	14
Tabla 3: Fuentes de contaminantes en el agua residual	17
Tabla 4: Concentraciones promedio de contaminantes en el agua residual de rastros.	18
Tabla 5: Composición de la sangre, plasma líquido y paquete celular bovino (g/100 mL)	21
Tabla 6: Diseño 2 ^k para tratamiento fúngico en agua residual prototipo	34
Tabla 7: Composición de MEA a diferentes Molaridades de NaCl	38
Tabla 8: Composición de Medio Mínimo Vogel's para 500 mL	39
Tabla 9: MM Vogel's adicionado con HPAs a diferentes ppm	40
Tabla 10: Composición del agua residual de rastro municipal artificial	41
Tabla 11: Resultado del Blast de las secuencias fúngicas	52
Tabla 12: Actividades enzimáticas extracelulares cuantificadas en el tratamiento de agua residual de rastro municipal prototipo	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución del riesgo sanitario y ambiental por estado.	7
Figura 2. Diagrama del uso del agua y generación de aguas residuales en las diferentes etapas del proceso en un rastro	15
Figura 3. Cuenca del río Apatlaco	20
Figura 4. Bioremediation techniques	23
Figura 5. Esquema de acción de la enzima Mn-peroxidasa	26
Figura 6. Esquema de acción de la enzima lignina peroxidasa	26
Figura 7. Esquema de la acción de la enzima lacasa	27
Figura 8. Estrategias de haloadaptación en organismos halófilos	29
Figura 9. Representación gráfica de algunas de las proteínas transportadoras de membrana	30
Figura 10. Diagrama de estrategia experimental	35
Figura 11. Foto macroscópica y microscópicas de la cepa HX1	46
Figura 12. Foto macroscópica y microscópicas de la cepa HX2	47
Figura 13. Foto macroscópica y microscópicas de la cepa HX3	47
Figura 14. Foto macroscópica y microscópicas de la cepa HX4	48
Figura 15. Foto macroscópica y microscópicas de la cepa HX5	48
Figura 16. Foto macroscópica y microscópicas de la cepa HX6	49
Figura 17. Foto macroscópica y microscópicas de la cepa HX7	59
Figura 18. Foto macroscópica y microscópicas de la cepa HX8	50
Figura 19. Foto macroscópica y microscópicas de la cepa HX9	50
Figura 20. Foto macroscópica y microscópicas de la cepa HX10	51
Figura 21. Gel de agarosa Extracción de ADN genómica a los aislados fúngicos	51
Figura 22. Gel de agarosa de PCR (ADN amplificado)	52
Figura 23: Crecimiento en MEA adicionado con NaCl a diferentes molaridades	54
Figura 24: Grafico de characterization halófila	55
Figura 25: Crecimiento en MEA con una $a_w = 0.85$, usando glicerol, sorbitol y $MgCl_2$	56
Figura 26: Grafico de crecimiento xerófilo	57
Figura 27: Crecimiento en medio mínimo Vogel's suplementado con sangre bovina.	59
Figura 28: Grafico de crecimiento suplementado con sangre bovina al 8% y 12%.	60
Figura 29: Crecimiento en medio mínimo Vogel's suplementado algodón, CMC, paja de trigo y olote (2%)	62
Figura 30: Crecimiento en MM Vogel's con benzo [α] pireno / fenantreno (50, 100, 200 y 300 ppm).	63
Figura 31: Crecimiento en MM Vogel's suplementado con diésel y gasolina (1% y 2%).	64
Figura 32: Crecimiento en MM Vogel's con compuestos celulósicos, HPAs, diésel y gasolina.	65
Figura 33: Determinación de DQO en tiempo cero y tiempo 21 días.	67
Figura 34: Grafico de actividad enzimática en agua residual de rastros municipales (prototipo).	69

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABTS: 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
- CBR: Contactor Biológico Rotatorio
- CMC: Carboximetilcelulosa
- CO₂: Dióxido de Carbono
- COFEPRIS: Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
- CONAPO: Consejo Nacional de Población
- DBO: Demanda bioquímica de oxígeno
- DQO: Demanda química de oxígeno
- EPA: Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos
- FA: Filtro Anaerobio
- FAO; Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
- HPA: Hidrocarburos policíclicos aromáticos
- INEGI: Instituto Nacional de Estadística y Geografía
- KCl: Cloruro de Potasio
- Lac: Lacasa
- LiP: Lignina peroxidasa
- MM Vogel's: Medio Mínimo de Vogel's
- MEA: Medio Extracto de Malta
- MnP: Manganeso Peroxidasa
- NaCl: Cloruro de Sodio
- N: Nitrógeno
- NOM: Norma Oficial Mexicana
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- ONU: Organización de las Naciones Unidas
- P: Fósforo
- PCBs: Biofenilos Policlorinados
- PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
- PBR: Barrera Reactiva Permeable
- PhC: Productor Farmacéuticos
- SBR: Reactor Aerobio por Lotes
- SEMARNAT: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
- SST: Sólidos Suspendidos Totales
- TIF: Tipo Inspección Federal
- TRH: Tiempo de Retención Hidráulico
- UASB: Reactor Anaerobio de Flujo Ascendente
- VP: Versátil Peroxidasa

RESUMEN

Actualmente la contaminación creciente de los cuerpos de agua, es un problema que demandan atención urgente desde varias disciplinas del conocimiento. La mayoría de los establecimientos que brindan el servicio de sacrificio y faenado animal en el estado de Morelos no disponen de un sistema adecuado de tratamiento para los desechos líquidos y sólidos generados. La sangre es considerada y tratada como un residuo industrial, aumentando el costo de tratamiento y operación del sistema de depuración de estos residuos líquidos. La caracterización particular de estas aguas residuales posee alta carga orgánica (200,000 mg/L de DBO₅) debido a la presencia de sangre, principal contaminante, excremento, contenido estomacal, altos niveles de grasa, fluctuaciones en el pH, debido a la presencia de agentes de limpieza como detergentes, altos niveles de nitrógeno, fósforo y NaCl, entre otros compuestos. La biorremediación es una alternativa ecológicamente amigable y sustentable para la remoción de xenobióticos. El desarrollo de estrategias biológicas combinadas con métodos físicos y químicos resulta atractivo para el tratamiento de aguas residuales, como las provenientes de los rastros municipales en Morelos. Los microorganismos tienen la capacidad de producir enzimas hemolíticas que degradan la sangre (lisan los hematíes o eritrocitos), la mayoría de los hongos existen en el medio ambiente como saprófitos (organismo que obtiene su energía de materia orgánica muerta), sus enzimas presentan baja especificidad lo que les permite degradar una gran variedad de compuestos xenobióticos. En particular, los hongos extremófilos poseen amplias capacidades metabólicas que les permiten crecer en ambientes muy hostiles con propiedades fisicoquímicas muy particulares que limitan normalmente el crecimiento de otros sistemas vivos. Es por ello que el uso de hongos halófilos o halotolerantes puede resultar una alternativa en el tratamiento de aguas contaminadas con sangre provenientes de los rastros municipales. En este trabajo se estudió el potencial biotecnológico para la biorremediación de aguas residuales de rastros municipales de aislados fúngicos de ambientes hipersalinos de Baja California Sur. Las cepas fueron capaces de crecer en presencia de sangre, HPAs, residuos celulósicos, diésel y gasolina usando estos compuestos como única fuente de carbono, cuatro cepas presentaron una remoción de 75% en DQO de agua residual de rastros

municipales (artificial). Se determinó la actividad enzimática después del tratamiento fúngico donde se observó actividad de las enzimas amilasas, celulasas, xilanasas y proteasa.

ABSTRACT

Currently, the increasing pollution of bodies of water, are problems that demand urgent attention from various disciplines of knowledge. Most of the establishments that provide the service of animal sacrifice in the state of Morelos does not have an adequate system of treatment for waste liquids and solids generated. The blood is regarded and treated as an industrial waste, increasing the cost of treatment and operation of the system of purification of these waste liquids. The characterization, particularly of this wastewater has high organic load (200,000 mg/L of BOD5) due to the presence of blood as the main contaminant, feces, and stomach contents, high levels of fat, fluctuations in pH due to the presence of cleaning agents such as detergents, high levels of nitrogen, phosphorus and NaCl, among other compounds. Bioremediation is an alternative ecologically friendly and sustainable for the removal of xenobiotics. The development of biological strategies combined with physical and chemical methods is attractive for the treatment of wastewater, such as from municipal slaughterhouses in Morelos. Microorganisms have the ability to produce enzymes, hemolytic, which degrade the blood (lyse the red blood cells or erythrocytes), most of the fungi exist in the environment as saprophytes (an organism heterotrophic that gets its energy from dead organic matter), their enzymes have a low specificity which allows. Principio del formulation. In this work, we studied the potential of bioremediation of wastewater of traces municipal of isolated fungal environments hypersaline of Baja California Sur. The strains were able to grow in the presence of blood, Pah, waste cellulosic, diesel, and gasoline using these compounds as a sole source of carbon, four strains showed a removal of 75% in COD of waste water of traces municipal (artificial). We measured the enzyme activity after treatment fungal where we observed activity of the enzymes amylases, cellulases, xylanases, and protease.

INTRODUCCIÓN.

El agua es imprescindible para la conservación de la vida en el planeta. Actualmente la contaminación creciente de los cuerpos de agua, así como en las fuentes de agua potable, es un problema que demandan atención urgente desde varias disciplinas del conocimiento. La aplicación de la biotecnología permite el uso sostenible y sustentable de organismos o sus bioproductos para la restauración de ecosistemas y constituye por tanto una alternativa para atender la contaminación de acuíferos naturales. Desafortunadamente, la mayoría de los establecimientos que brindan el servicio de sacrificio y faenado animal en el estado de Morelos no disponen de un sistema adecuado de tratamiento para los desechos líquidos y sólidos generados, los cuales están enriquecidos en sangre animal. La sangre es considerada y tratada como un residuo industrial, aumentando el costo de tratamiento y operación del sistema de depuración de estos residuos líquidos. Morelos no cuenta con un registro certificado sobre el cumplimiento de tratamientos adecuados para las aguas residuales de los rastros, por lo que varios de estos establecimientos han sido multados y/o clausurados por la inadecuada disposición de sus residuos que han contaminado los cuerpos hídricos, siendo el más afectado la cuenca del río Apatlaco. La restauración de aguas residuales contaminadas permitiría su reutilización para diferentes sectores que consumen grandes volúmenes de agua, tales como usos domésticos, industriales y agrícolas, siempre y cuando cumplan con la Norma Oficial Mexicana NOM-003-SEMARNAT-1997, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicios al público. La biorremediación es una alternativa ecológicamente amigable y sustentable para la remoción de xenobióticos en aguas residuales. El desarrollo de estrategias biológicas combinadas con métodos físicos y químicos resulta atractivo para el tratamiento de aguas residuales, como las provenientes de los rastros municipales en Morelos. Los microorganismos tienen la capacidad de producir enzimas hemolíticas que degradan la sangre (lisan los hematíes o eritrocitos), la mayoría de los hongos existen en el medio ambiente como saprófitos (organismo que obtiene su energía de materia orgánica muerta), también sus enzimas presentan baja especificidad lo que les permite degradar una gran variedad de compuestos xenobióticos. En las últimas décadas diversos estudios han reportado actividad hemolítica no solo en bacterias sino también en especies de hongos de los géneros

Aspergillus, *Blastomyces*, *Penicillium*, *Coccidioides*, *Stachybotrys*, *Volvariella*, *Termitomyces*, *Rhodophlytus*, *Rhizopus*, etc. En este sentido se han caracterizado algunas hemolisinas fúngicas como Nigerlysin, Terrellysin, Chrysolysin, Stachylysin, Aegerolysin, Phallolysin, etc [1]. Sin embargo, se conoce poco acerca de las hemolisinas fúngicas, debido a ello el interés científico para su estudio en diferentes aplicaciones biomédicas, industriales y ambientales es muy alto. En particular, los hongos extremófilos poseen amplias capacidades metabólicas que les permiten crecer en ambientes muy hostiles con propiedades fisicoquímicas muy particulares que limitan normalmente el crecimiento de otros sistemas vivos. Se ha documentado que los hongos extremófilos resultan sistemas útiles en la biotransformación (remoción, biodegradación, sorción y/o mineralización) de diversos contaminantes ambientales. La caracterización particular de las aguas residuales generadas en la industria cárnica como los establecimientos de sacrificio animal poseen alta carga orgánica (200,000 mg/L de DBO₅) debido a la presencia de sangre como principal contaminante, excremento y contenido estomacal, altos niveles de grasa, fluctuaciones en el pH debido a la presencia de agentes de limpieza como detergentes, altos niveles de nitrógeno, fósforo y NaCl, entre otros compuestos. Es por ello que el uso de hongos halófilos o halotolerantes puede resultar una alternativa para el tratamiento de aguas contaminadas con sangre provenientes de los rastros municipales. En este trabajo se estudió el potencial biotecnológico para la biorremediación de aguas residuales de 10 cepas de hongos halófilos aisladas de ambientes hipersalinos de Baja California Sur, las cuales se encuentran conservadas a 4 °C en el Laboratorio de Microorganismos Extremófilos del Centro de Investigación en Dinámica Celular de la UAEM. Este proyecto generó conocimiento con posible potencial de aplicación para atender el problema de contaminación hídrica generada en la cuenca del río Apatlaco, que es considerada patrimonio ambiental de las y los morelenses, debido a que constituye una de las principales fuentes de abastos de “agua potable” para la agricultura, economía y turismo del estado.

CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS.

1.1 Antecedentes.

1.1.1 Contaminación de agua en México.

La calidad del agua es un factor determinante de la salud pública y de los ecosistemas, que restringe la oferta de agua y su distribución potencial para los diferentes usos. El agua está asociada a la transmisión de enfermedades que afectan la salud humana, ya sea por ingestión directa o mediante la contaminación de los alimentos, por lo que su calidad está absolutamente relacionada con la calidad de vida de la población [2-3].

En México los problemas de calidad del agua son severos y tienen un fuerte atraso en su atención comparados con los relativos a la cantidad y a la provisión de servicios a la población. De la misma manera, la evaluación de la calidad del agua es indispensable para poder orientar esfuerzos que favorezcan su reutilización. Los recursos hídricos del país se enfrentan a graves problemas de contaminación, la calidad del agua está por debajo de los límites permisibles para la salud humana, tanto las aguas superficiales como las subterráneas, se utilizan como cuerpos receptores de cargas contaminantes [4]. Las descargas orgánicas provenientes de los rastros municipales generan altos niveles de contaminación en importantes fuentes de agua. Un rastro es donde se sacrifican animales que posteriormente serán consumidos por la población como alimento.

Esta situación es especialmente difícil en los municipios pequeños, donde las limitaciones técnicas y económicas no permiten poner en funcionamiento medidas de manejo ambiental complejas que solucionen el problema de forma definitiva [5]. El principal problema de los rastros se genera por el alto consumo de agua que utilizan para lavado de la carne, equipo y establecimiento, ya que deben cumplir con estrictas medidas higiénicas para proteger la salud humana en la operación de estos. Por otra parte, el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), a través de la Dirección General de Contabilidad Nacional

y Estadísticas Económicas registraron en total 932 rastros en el país sin contar la ciudad de México [6]. El consumo de agua en promedio diario de estos rastros es de 22´734,560 litros de agua y, considerando el consumo de 163 litros [7] por día por persona, se requerirían 139,476 individuos al día para generar este consumo de agua, lo que hace imprescindible considerar alternativas de optimización [6]. Dentro de los establecimientos dedicados al sacrificio de animales de abasto. Así como, consumen grandes volúmenes de agua también generan gran cantidad de aguas residuales.

1.1.2 Agua residual de Rastros Municipales.

La composición de las aguas residuales de un rastro o matadero depende, fundamentalmente, de la especie que se procesa. En general, contiene sangre, excremento, contenido estomacal (rumen), grasa, plumas y huesos. Cuando el agua residual contiene una cantidad alta de materia orgánica, es propicia para el desarrollo de microorganismos patógenos normalmente presentes en dicha materia (*Salmonella* spp., *Shigella* spp.), además de contener, entre otros elementos, huevos de parásitos y quistes de amibas, así como residuos de plaguicidas (presentes en el alimento de los animales), cloro (limpieza de instalaciones), salmuera, etc.; resultando ser un contaminante potencial del suelo y el agua, en el que proliferan los malos olores por la descomposición de la materia orgánica [5,6,8,9].

Este tipo de residuos, por su humedad y capacidad de descomposición rápida, desprenden gases como el metano, involucrado en el cambio climático global, así como malos olores; atraen a moscas, cucarachas, ratas y otras especies de fauna nociva transmisora de enfermedades; provocan la formación de lixiviados que arrastran contaminantes hacia los cuerpos de agua superficiales o se infiltran hacia los acuíferos, deteriorando las fuentes de abastecimiento de agua para consumo humano e irrigación de campos agrícolas, amenazando, además, los ecosistemas acuáticos.

Estas aguas residuales, vertidas directamente en mantos de agua, generan un impacto negativo sobre el entorno ambiental, con consecuencias directas e indirectas en la salud pública, debido a las características antes mencionadas se ha ponderado el riesgo por estado, asignando el riesgo sanitario y ambiental a cada rastro por su faena semanal, los estados de la república se agruparon en cuatro categorías; riesgo bajo, medio, alto y muy alto. En la Figura 1 se puede apreciar la distribución por riesgo sanitario y ambiental, siendo el estado de Morelos clasificado con alto riesgo sanitario y ambiental por los 24 rastros municipales que operan en el estado [6].

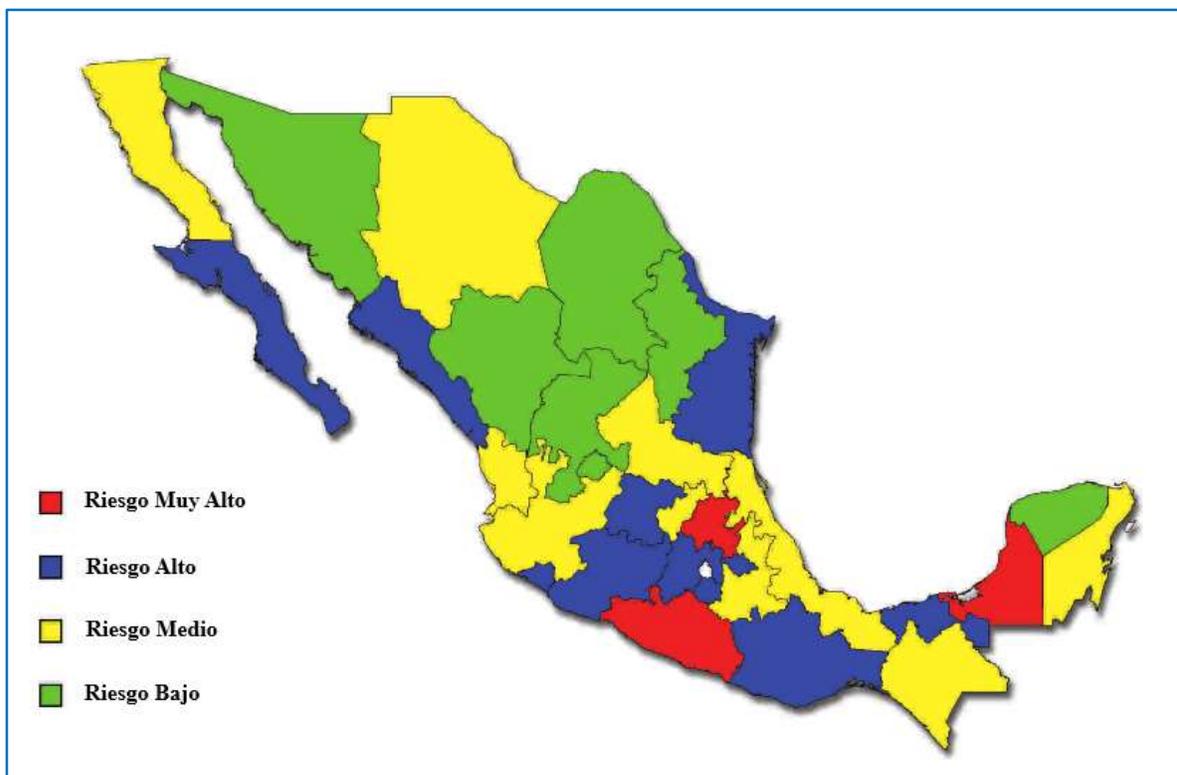


Figura 1. Distribución del riesgo sanitario y ambiental por estado [6].

1.1.3 Alternativas de tratamiento.

Debido al problema de salud y ambiental que generan los rastros municipales se han realizado varios estudios sobre tratamientos de aguas residuales derivadas de estos establecimientos. En México los procesos para el tratamiento de estas aguas residuales se basan principalmente

en la degradación anaerobia, dentro del proceso anaerobio se encuentran un sistema complejo que abarcan diversos tipos de microorganismos que trabajan de forma coordinada para convertir los compuestos orgánicos en metano y dióxido de carbono. Los grupos de microorganismos que se han identificado son las bacterias hidrolíticas, acidógenas, acetógenas y metanógenas [10,11,12].

Un estudio en Coahuila reporte una eficacia de remoción de DQO (Demanda Química de Oxígeno) superior al del 80%, mediante la implementación de un reactor tipo UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) con un filtro anaerobio interno alimentado con una carga orgánica de 5-6 g DQO/L/d y un tiempo de retención hidráulico (TRH) no menor a 2 días [13]. En Yucatán se evaluó el diseño y construcción de un reactor (escala piloto) tipo CBR (Contactador Biológico Rotatorio) presentando un 98.35% de remoción en DQO para una carga de 12.2 g DQO/m³/d, a 30 rpm en TRH de 31.6 hrs [14]. A. López-López¹, J. de la Barrera-Fraire, R. Vallejo-Rodríguez estudiaron un acoplamiento secuencial de un sistema anaerobio/aerobio a nivel laboratorio, conformado por Filtro Anaerobio (FA) y un Reactor Aerobio por Lotes (SBR por sus siglas en ingles) el cual opero con una carga orgánica de 11.0 kg DQO/m³/d y TRH de 24 h para FA, mientras que el SBR operó a TRH de 9 h, las eficiencias de remoción oscilaron en un intervalo de 50-81% [15].

Los estudios hasta ahora reportados especifican un 80-85% de remoción, tasa satisfactoria pero insuficiente para cumplir con los límites máximos permisibles que establece la norma mexicana de contaminantes para la descarga de aguas residuales en aguas y bienes nacionales NOM-CCA-022-ECOL/1993 [16], debido a que la carga orgánica en el influente (agua residual de rastro) es muy alta de 4000-12000 mg/L promedio por rastro [17, 18] y la norma mexicana 022 especifica una DQO 200-240 mg/L para poder verter el agua residual tratada en aguas nacionales [16]. El proceso anaerobio deja un residual relativamente alto de orgánicos no degradados en el efluente (agua tratada), es un tratamiento que con poca frecuencia obtiene una remoción de materia orgánica mayor al 90% [11]. Por lo que el proceso anaerobio constituye una parte del sistema de tratamiento y los contaminantes remanentes después del tratamiento anaerobio deben ser tratados con procesos biológicos aerobios o tecnologías de tratamiento fisicoquímica [19]. Implementar un sistema de

tratamiento aerobio al sistema de tratamiento anaerobio implica un aumento en el costo de operación y mantenimiento por el suministro de aire, de igual manera en la implementación de un sistema fisicoquímico, complicando el tratamiento adecuado de los residuos generados por la falta de recursos destinados al tratamiento de agua residuales en el país.

1.1.4 Biorremediación con microorganismos extremófilos.

La biorremediación es una tecnología que utiliza el potencial metabólico de los microorganismos (su capacidad de biodegradación) para depurar terrenos o aguas contaminadas [20]. Estos microorganismos utilizan su potencial enzimático para mineralizar los compuestos contaminantes o degradarlos hasta productos intermedios, en un ambiente aerobio o anaerobio. Existen factores limitantes [21] como son: nutrientes esenciales (nitrógeno y/o fósforo), aceptores adecuados de electrones, condiciones medioambientales apropiadas (pH, potencial redox, humedad), inexistencias de poblaciones microbianas con potencial enzimático.

El descubrimiento de los microorganismos extremófilos, capaces de vivir bajo condiciones extremas de temperatura, pH, presión, salinidad, radiación y sus combinaciones, ha proporcionado herramientas invaluable para su aplicación en una amplia gama de procesos biotecnológicos, permitiendo el manejo racional de los recursos naturales [22]. En los últimos años se ha tenido un gran avance biotecnológico dentro de la biorremediación utilizando hongos halófilos (crecimiento óptimo en ambientes hipersalinos, mayor a 0.5% de NaCl). H. Peidro Guzmán y RA. Batista García reportan la capacidad de *A. sydowii-like* para degradar HPAs (Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos), el hongo fue capaz de crecer en un ambiente donde solo tenía como única fuente de carbono benzo [α] pireno y fenantreno, se observó que después de 4 días de cultivo, fue capaz de degradar un 48 y un 58% de benzo [α] pireno y fenantreno, respectivamente. Resultados obtenidos bajo condiciones de salinidad (1M NaCl) revelaron que la biodegradación era predominante sobre la biosorción como estrategia de eliminación [23]. González-Abradelo D, Pérez-Llano Y, Peidro-Guzmán H y colaboradores registraron que los hongos halófilos *A. sydowii* y *A. destruens* eliminaron HPAs y PhC (Compuesto Farmacéuticos) en condiciones salinas. Ambos hongos utilizaron

Benzo [a] pireno y fenantreno como única fuente de carbono, *A. sydowii* degradó más del 90% de HPAs, mientras que *A. destruens* removió más del 90% de HPAs por bioadsorción. Estos hongos removieron el 100% de una mezcla de quince HPAs en aguas residuales salinas de una biorrefinería [24].

La industria agroalimentaria, petrolera y textil producen aguas residuales salinas con alto contenido de contaminantes orgánicos como sangre, aceites HPAs, fenoles, nitroaromáticos, y colorantes azoicos, de tal manera que los microorganismos halófilos tienen un interés creciente en el tratamiento de residuos industriales por su capacidad de degradar sustancias peligrosas de manera eficiente en condiciones de alta salinidad [25]. El objetivo del presente trabajo es evaluar el potencial de una colección de hongos halófilos/halotolerantes para el tratamiento (biorremediación) de aguas residuales procedentes de rastros municipales, las cuales contienen aproximadamente 90-95% [6,8] de sangre animal. La sangre constituye un serio problema para los rastros municipales debido a su poder contaminante y tóxico. La elevada carga orgánica de las aguas producidas como desecho en los rastros municipales (está relacionada con la cantidad de sangre aportada al agua residual), por lo que deben ser tratadas antes de verterla a un ambiente acuático natural. Las consecuencias de la gestión irresponsable de estas aguas residuales ocasionan eutrofización de los diferentes ecosistemas y disminuyen las cantidades de oxígeno disuelto en los ecosistemas acuáticos, ocasionando la muerte de muchos organismos [6,8-9].

1.2 Marco teórico.

1.2.1 Problemática ambiental del agua.

La disponibilidad de agua promedio anual en el mundo es de aproximadamente 1,386 billones de hectómetros cúbicos (hm³), de los cuales el 97.5% es agua salada y sólo el 2.5%, es decir, 35 billones de hm³ es agua dulce, de esta cantidad casi el 70% no está disponible para consumo humano porque se encuentra en glaciares o en forma de nieve. Del agua que técnicamente está disponible para consumo humano, sólo una pequeña porción se encuentra en lagos, ríos, hidratando las partículas de suelo y en depósitos subterráneos relativamente poco profundos, cuya renovación es producto de la infiltración. Mucha de esta agua

teóricamente utilizable se encuentra lejos de las zonas pobladas, lo cual dificulta o vuelve imposible su utilización efectiva. Se estima que solamente el 0.77% se encuentra como agua dulce accesible al ser humano [8,26].

El agua es necesaria para todas las formas de vida, es un elemento crucial para el funcionamiento de los ecosistemas y la provisión de servicios ambientales de los que dependemos para sobrevivir y, además, es un factor estratégico para el desarrollo de cualquier país. México tiene 471.5 mil millones de m³ de agua dulce renovable por año, alrededor del 0.1% de la disponible en el mundo y está considerado como un país con baja disponibilidad de agua. Un aspecto importante a considerar en la disponibilidad de agua es el incremento de la población y su concentración en zonas urbanas. Estimaciones de Consejo Nacional de Población CONAPO [27], entre 2012 y 2030 la población del país se incrementará en 20.4 millones de personas. Además, para 2030, aproximadamente 75% de la población estará en localidades urbanas. El incremento de la población ocasionará la disminución del agua renovable per cápita a nivel nacional [28].

En 2012, con una población de 117 millones de habitantes en México, la disponibilidad natural media por habitante se calculaba en 4,028 m³ por año. Se estima que para 2030, con el aumento de la población y el deterioro de los cuerpos de agua descenderá hasta 3,430 m³ por habitante por año. Otro aspecto significativo es el incremento del consumo de agua per cápita: en 1955, cada mexicano consumía alrededor de 40 litros al día; se calcula que en 2012 el consumo aumentó a 280 litros por persona al día [28,29]. Para enfrentar la disminución de la disponibilidad del agua por habitante en los próximos años será necesario: reducir la demanda mediante el incremento en la eficiencia de los sistemas de distribución de agua en las ciudades y de los sistemas de riego; reducir la contaminación mediante sistemas de saneamiento alternativo y la reducción en el uso de agroquímicos y pesticidas; e incrementar la oferta aumentando el volumen de agua pluvial recolectada y el reúso de agua residual tratada [29].

Los escenarios para 2020 y 2050 indican aumentos de temperatura de entre 1 a 3 °C y disminuciones en la precipitación media anual de 5 a 10%. Esto hará que la evapotranspiración se incremente y que la humedad en el suelo disminuya, lo que traerá como

consecuencia mayores requerimientos de agua y, por lo tanto, un incremento en la extracción de este recurso. En nuestro país el 70% de los cuerpos de agua están contaminados por los 13,850 hm³/año de aguas residuales generadas y apenas se reutilizan 5,060 hm³/año de las aguas residuales captadas en los centros urbanos. Esta panorámica exige implementar un modelo de gestión por cuencas hidrográficas que se adapte a los condicionantes físicos y sociales, propicie la preservación de los ecosistemas y busque el equilibrio entre los usos y funciones del agua con la participación de los actores interesados [27].

La contaminación de los cuerpos de agua representa uno de los principales retos para la gestión actual y futura del agua. La presencia de contaminantes xenobióticos y emergentes aumenta rápidamente por el crecimiento demográfico, la demanda de energía y alimentos, desarrollo económico y la urbanización. La contaminación de los cuerpos de agua produce de manera directa riesgos a la salud humana y al medio ambiente e indirectamente disminuye su disponibilidad para determinados usos en la agricultura, industria, recreativo y doméstico. Principalmente los cuerpos de agua son contaminados por las descargas residuales municipales e industriales. En México se generan 214.26 m³/s de agua residual procedentes de la actividad industrial y solo se tratan 70.5 m³/s, que corresponde al 33%. [9,30]. La panorámica anterior demanda soluciones para el tratamiento de aguas contaminadas, siendo el uso de biotecnologías una alternativa sostenible y amigable con el medio ambiente.

1.2.2 Clasificación de aguas residuales.

La contaminación del agua se deriva principalmente de todas las actividades realizadas por el hombre. Los compuestos contaminantes son todas aquellas sustancias que se vierten al agua sin tratamiento previo, tales como sustancias derivadas de los sanitarios (heces, orina, detergentes, etc.), sustancias industriales (grasa, aceites, compuestos químicos, farmacéuticos etc.) y, sustancias empleadas en la agricultura como (insecticidas, pesticidas, herbicidas, raticidas, etc.). Las aguas residuales son de composición variada provenientes de las descargas de usos municipales, industriales, comerciales, de servicios, agrícolas, pecuarios, domésticos, incluyendo fraccionamientos y en general de cualquier otro uso, así como la mezcla de ellas. Las aguas residuales se pueden clasificar por su cantidad y tipo de

sustancias químicas que portan; sus características de tipo bacteriológico; la relación entre agua, materia en suspensión y materia disuelta o por su procedencia (parámetro más utilizado) [31].

La clasificación por procedencia de las aguas residuales establecida en la NOM-CCA-003-SEMARNAT/1993 es: aguas residuales domésticas o municipales: proceden de las heces y orina humanas, del aseo personal, de la cocina y de la limpieza de la casa. Suelen contener gran cantidad de materia orgánica y microorganismos, así como restos de jabones, detergentes, lejía y grasas [31].

Aguas residuales industriales: proceden de los procesamientos realizados en fábricas y establecimientos industriales y contienen aceites, detergentes, antibióticos, ácidos, grasas y otros productos y subproductos de origen mineral, químico, vegetal o animal. Su composición es muy variable, dependiendo de las diferentes actividades industriales [31].

Aguas residuales agrícolas: procedentes de las labores agrícolas en las zonas rurales. Estas aguas suelen participar, en cuanto a su origen, de las aguas urbanas que se utilizan, en numerosos lugares, para riego agrícola con o sin un tratamiento previo [31].

Aguas pluviales o urbanas: pueden ser de procedencia atmosférica (lluvia, nieve o hielo) o del riego y limpieza de calles, parques y lugares públicos. En aquellos lugares en que las precipitaciones atmosféricas son muy abundantes [31].

1.2.3 Problemática ambiental generada por los rastros municipales en México.

Los rastros son establecimientos dedicados al sacrificio de animales para el consumo humano. Por la alta demanda de la población en México la actividad más importante en el sector pecuario es la producción de la carne bovina (res) y porcina (cerdo). Actualmente los rastros municipales del país suman 923. En el año 2018 se contabilizaron poco más de 6.5 millones de cabezas de ganado sacrificadas, de las cuales el 74.35% fueron de la especie porcina, 25.65% bovina [32]. El volumen de aguas residuales generadas está directamente relacionado con la cantidad de agua utilizada. En algunos estudios se estima que de un 80%

a un 95% del agua que se usa se desecha, sin embargo, otros estudios sugieren un rango de 97% al 100%, pues consideran como producto de desecho el agua contaminada que se evapora y la que se utiliza en la manufactura de subproductos [6,8]. Para esta evaluación, los volúmenes de agua consumidos por animal faenado a lo largo de todo el proceso se especifican en la tabla 1 considerando los valores integrales proporcionados por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) [33].

Tabla 1: Promedio de agua requerida por animal sacrificado.

Especie	Cantidad de agua (L)
Bovino	1000
Porcino	450

Fuente: [33].

En la tabla 2 se muestra el volumen de aguas residuales producidas en los últimos años en base a la especificación de la FAO [33] con relación a las cabezas sacrificadas reportadas por INEGI [34].

Tabla 2: Estadísticas de cabezas sacrificadas y generación de aguas residuales por año en México.

Año	Especie	Bovino	Porcino	Total
2015	# de Cabezas Sacrificadas	1,630,257	4,474,733	6,104,990
	Aguas residuales producidas (L)	1,630,257,000	2,013,629,850	3,643,886,850^a
2016	# de Cabezas Sacrificadas	1,576,560	4,776,393	6,352,953
	Aguas residuales producidas (L)	1,576,560,000	2,149,376,850	3,725,936,850^a
2017	# de Cabezas Sacrificadas	1,638,603	4,749,564	6,388,167
	Aguas residuales producidas (L)	1,638,603,000	2,137,303,800	3,775,906,800^a
2018	# de Cabezas Sacrificadas	1,748,251	4,812,933	6,561,184
	Aguas residuales producidas (L)	1,748,251,000	2,165,819,850	3,914,070,850^a

Fuente: a) valores calculados con el agua promedio requerida por animal sacrificado [32,33].

El principal problema de los rastros se genera por el alto consumo de agua que utilizan para lavado de la carne, equipo y establecimiento, ya que deben cumplir con estrictas medidas higiénicas para proteger la salud humana en la operación de los mismos. Esto hace que en los rastros generen un promedio de 10,314,932 L/año en el país [32,33]. Las descargas tienen alto contenido orgánico [9,34] por contener sangre, trozos de vísceras, grasas, contenidos digestivos, así como heces y orina residuos enriquecidos en microorganismos patógenos como *Salmonella* spp. y *Shigella* spp., huevos de parásitos, quistes de amebas, etc. En la Figura 2 se muestra un diagrama del uso del agua y generación de aguas residuales en las diferentes etapas del proceso en un rastro [6,8].

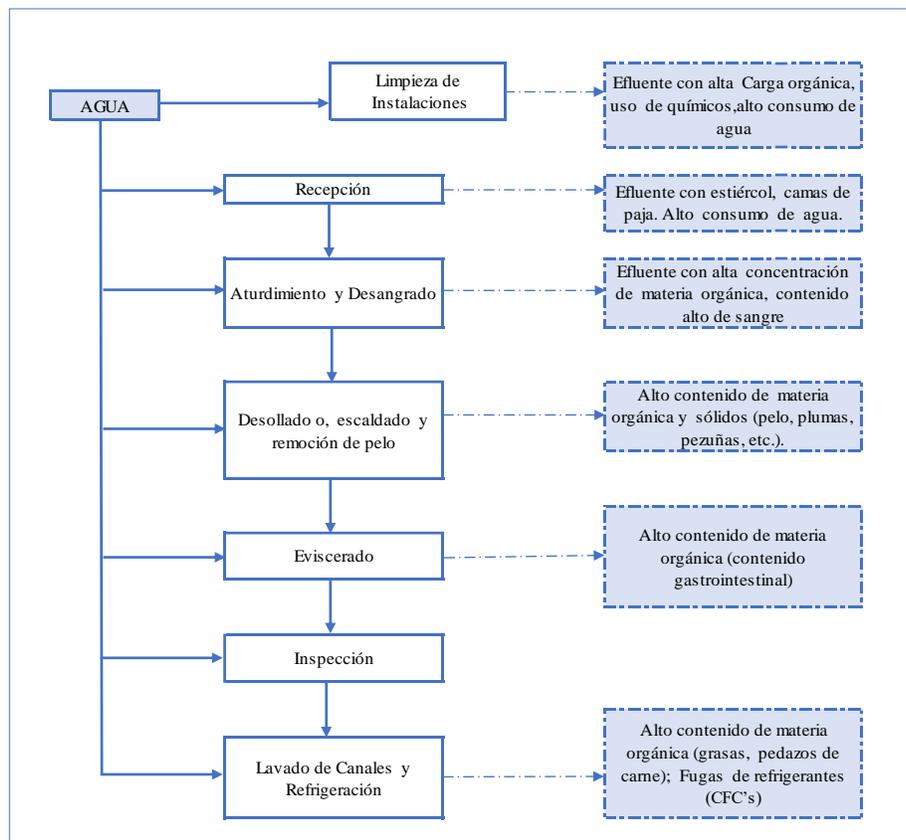


Figura 2. Diagrama del uso del agua y generación de aguas residuales en las diferentes etapas del proceso en un rastro [8].

En México existen cuatro tipos de establecimientos dedicados a la matanza de animales de abasto [35]: rastros municipales, rastros particulares; establecimientos Tipo Inspección Federal (TIF por sus siglas en inglés) y mataderos clandestinos. De acuerdo con el INEGI, los rastros municipales son establecimientos instalados por los gobiernos de los estados en

coordinación con los municipios, cuya infraestructura e inspección sanitaria es controlada por la Secretaría de Salud. La NOM-194-SSA1-2004 establece que la distinción entre rastros y mataderos se define en función del volumen de matanza de los establecimientos, considerándose como rastros aquellos que faenen semanalmente como mínimo 168 animales de ganado mayor (bovinos y equinos), 336 animales de ganado menor (cerdos, ovinos y caprinos), 5,000 aves o una combinación entre las diferentes especies. Estos datos concuerdan con las estimaciones de participación proporcional de cada uno de los sistemas de sacrificio de animales de abasto, los cuales indican que aproximadamente el 50.5% de la faena se realiza en rastros municipales, un 21.6% se efectúa en rastros TIF y aproximadamente el 27.9% de la matanza ocurre in situ [36]. Los rastros TIF (privado) tienen una excelente planeación de proceso que se traduce en altos estándares de higiene y calidad. Los mataderos clandestinos son establecimientos que no cuentan con un registro por la Secretaría de Salud, no hay control en el proceso y carecen de las condiciones que especifica la NOM-194-SSA1-2004 para su operación.

El agua residual de los rastros se clasifica como agua residual industrial, y se consideran como una de las más dañinas para el ambiente de acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) [37]. Particularmente la sangre, el contenido del tracto intestinal y las excreciones de los animales constituyen un gran problema para la depuración de estas aguas residuales [38], propician la proliferación de patógenos y fauna nociva trasmisora de enfermedades.

Por su alto contenido de contaminantes orgánicos, las descargas de aguas residuales de la industria de la carne causan un gran impacto en las aguas superficiales cuando se descargan sin tratamiento previo, ya que agotan el oxígeno disuelto en los cuerpos receptores debido a los problemas de eutrofización [38]. Si las aguas se descargan al alcantarillado municipal es necesario remover los sólidos suspendidos para evitar su acumulación en el alcantarillado. Debido a los impactos negativos que pueden provocar, las aguas residuales de los rastros no deben ser descargadas sin tratamiento a los cuerpos receptores, ni al alcantarillado.

Estas descargas se constituyen por una variedad de compuestos fácilmente biodegradables, como proteínas y grasas, presentes tanto en forma soluble como no soluble. También se caracterizan por sus altas concentraciones de nitrógeno, fósforo y sales [6,8,11,37,38]. En la Tabla 3 se muestran las fuentes de algunos contaminantes presentes en el agua residual, así como el porcentaje aproximado.

Tabla 3: Fuentes de Contaminantes en el agua residual.

Fuente	Contaminantes			
	DQO	Nitrógeno Total	Fósforo Total	Sodio
Agua potable	0%	1%	0%	10%
Corral de descanso	2%	6%	8%	6%
Sacrificio y evisceración	7%	19%	4%	8%
Proceso de chamuscado	7%	7%	7%	3%
Desollado	1%	7%	6%	9%
Tablajería	1%	3%	0%	2%
Manejo de excrementos y desechos sólidos rimunales	13%	12%	37%	22%
Rendimiento	63%	33%	26%	15%
Encurtido	5%	8%	2%	16%

Fuente: [8,17].

La materia orgánica que contiene el agua residual se origina en todos los procesos de la planta, ya que el agua está en contacto con las canales, excremento y sangre, entre otros elementos. La calidad del agua residual depende de la especie y cantidad de animal sacrificado, así como, de la cantidad de contaminantes que contenga. Cada una de las etapas del proceso de sacrificio y faena de animales de abasto genera, independientemente del volumen, aguas residuales con características particulares [8,17].

Otros compuestos que se pueden encontrar son algunos residuos de plaguicidas (presentes en el alimento de los animales), productos farmacéuticos veterinarios y hormonas [8;11,17], La gestión actual y las regulaciones sobre estos contaminantes en México aún no se establecen, sus posibles efectos sobre los recursos ambientales y salud pública son poco entendidos ya que se conoce que cientos de compuestos, cuya abundancia en ambientes acuáticos ha sido identificada como Disruptores endocrinos (sustancia química exógena que altera la estructura o función del sistema endocrino y causa efectos adversos a nivel del organismo, su proge- nie,

las poblaciones o subpoblaciones de los organismos) [39-40]. El empleo de hormonas dentro del sistema de producción de carne es una de las practicas zootécnicas con un mayor grado de adopción gracias a su alta relación costo-beneficio en todos los países cuyo uso está permitido. Estos implantes están constituidos a base de hormonas, algunas de las hormonas más usadas dentro de la ganadería son: compuestos estrogénicos, androgénicos, progestagénicos, tireostáticos, cortico esteroides y betaadrenérgicos. Que pueden ser aplicados solos o en mezcla. [41,]. Al realizar tal práctica, se sabe que el agua residual derivada del proceso de sacrificio de animales de abasto contiene contaminantes orgánicos como hormonas animales y productos farmacéuticos veterinarios, que presentan un riesgo potencial tanto para la recepción de ecosistemas como para los recursos de agua potable. Sin embargo, de manera general y clara se tienen los parámetros por norma para determinar los niveles de contaminación del agua residual por especie sacrificada representadas en la tabla 4.

Tabla 4: Concentraciones promedio de contaminantes en el agua residual de rastros.

Parámetro	Porcino	Bovino
pH	7.2	7.2
DBO (mg/L)	1,250	2,000
DQO (mg/L)	2,500	4,000
SST (mg/L)	700	1,600
G y A (mg/L)	150	270
N (mg/L)	150	180
P (mg/L)	25	27

Fuente: [8].

El mejor indicador de la calidad del agua residual es la concentración de materia orgánica que se expresa, como demanda química de oxígeno (DQO) o como Demanda Bioquímica de Oxígeno al día 5 (DBO₅). La DQO es la cantidad de oxígeno necesaria para oxidar químicamente toda la materia orgánica que se pueda encontrar presente en la muestra. La DBO₅ es una medida de la cantidad de oxígeno utilizada por los microorganismos en la estabilización de la materia orgánica biodegradable, bajo condiciones aerobias, en un periodo de 5 días a 20 °C.

En el proceso de sacrificio animal también se agregan cadenas largas de ácidos grasos y glicerol a los residuos, las cuales son biodegradables, pero con una gran cantidad de DBO₅. El valor es superior a los 2 gramos de DBO₅ por gramo de lípido. La contaminación generada por sangre puede estimarse en 375,000 mg/L de DQO y 200,000 mg/L de DBO₅ [8,42]. Diariamente se desechan aproximadamente 121,294 litros de sangre procedente del faenado de animales de abasto, lo que equivale a la contaminación generada por 80'782,037 litros de residuos cloacales [6,8]. El fósforo se deriva a partir del contenido estomacal no digerido., mientras que el sodio (sal) proviene principalmente del excremento, del alimento presente en los estómagos de los animales, así como del proceso de rendimiento y curtido cómo se especifica en la tabla 3 [8,17].

De acuerdo con los datos presentados por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios COFEPRIS 2008, en la mayoría de los rastros evaluados, las disposiciones de los efluentes del faenado animal regularmente tienen nulo o escaso tratamiento.

El agua, el saneamiento y la higiene tienen consecuencias importantes sobre la salud y la enfermedad, la Organización Mundial de la Salud (OMS), afirma que las enfermedades relacionadas con el agua incluyen aquellas causadas por microorganismos y sustancias químicas presentes en el agua potable [43]. En países en desarrollo, es común que se presenten enfermedades y muertes relacionadas con el uso y consumo de aguas contaminadas, tal es el caso de la diarrea, causada por agentes virales, bacterianos y parásitos, que es una causa principal de morbilidad y un factor importante de desnutrición en la niñez alrededor del mundo, la OMS, informa cada año la presencia de 2 000 millones de casos de diarrea. En México, genera el 20% de la demanda de consulta en los servicios de salud y el 10% de las hospitalizaciones pediátricas. Las enfermedades relacionadas con el agua son causadas por microorganismos patógenos como bacterias, protozoarios, helmintos, algas, hongos y aunque los virus no son considerados microorganismos, pueden habitar y reproducirse dentro de otros organismos, por lo que el agua resulta un medio de transmisión [43].

1.2.4 Problemática ambiental por aguas residuales de rastros municipales en Morelos.

En el estado de Morelos se tienen registrados 24 rastros, 20 municipales y 4 privados; de los municipales 7 rastros se dedican al sacrificio de las especies porcina y bovina, los 13 restantes solo sacrifican bovinos. La actividad de los rastros asciende a un total de cabezas sacrificadas al mes de 8,840 porcinas y 1,451 bovinas reportado por INEGI, 2016. La cuenca del río Apatlaco es considerada patrimonio ambiental de los morelenses y atraviesa los municipios de Cuernavaca, Jiutepec, Temixco, Xochitepec, Jojutla, Zacatepec, Tlaltizapán, Huitzilac, Emiliano Zapata y Puente de Ixtla [44]. La Figura 2 delimita el área del río Apatlaco dentro del municipio de Morelos, también se observan los municipios donde atraviesa.

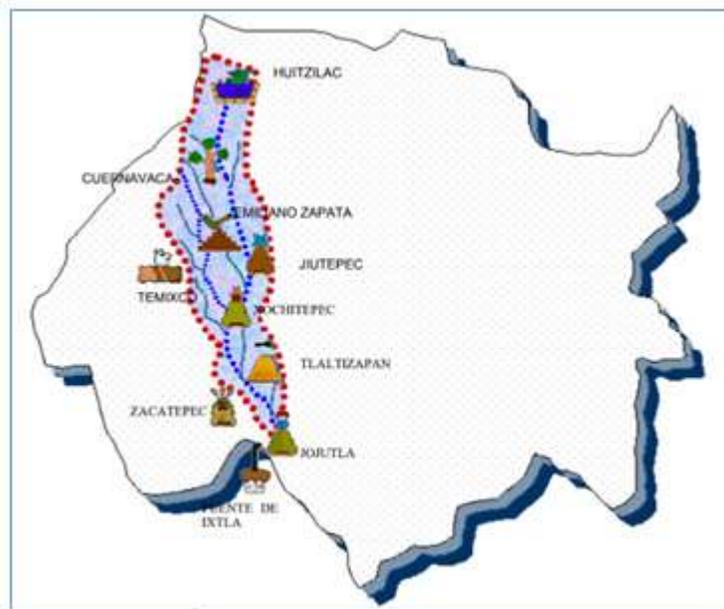


Figura 3. Cuenca del río Apatlaco. Fuente [44].

Sin embargo, la cuenca Apatlaco es la más afectada por las descargas líquidas de los rastros, que no cuentan con una disposición adecuada para su tratamiento. Por esta razón, los rastros de Morelos han sido multados en reiteradas ocasiones. Los municipios que cuentan con un rastro que sacrifican porcinos y bovinos son Cuernavaca, Jiutepec, Jojutla, Zacatepec, Tlaltizapán, Emiliano Zapata y Puente de Ixtla, mientras que Temixco cuenta con un rastro que sacrifica solo la especie bovina. Los municipios que no tienen rastro son Huitzilac y

Xochitepec. Dentro de los municipios donde pasa la cuenca del río Apatlaco se encuentran instalados 8 rastros municipales, 6 de ellos brindan el servicio de sacrificio para las dos especies y 2 solo para la especie bovina. En el estado se tiene un total de 10,291 cabezas sacrificadas por ambas especies [10].

La cuenca se encuentra bajo la amenaza de la descarga residual de 6,400 cabezas sacrificadas por mes correspondiente al 62.2% de la demanda total en el estado de cabezas sacrificadas, lo que agrava la situación de contaminación ya presenté en la cuenca del río [10,44]. La sangre es el principal contaminante de estas aguas residuales y la causa principal del problema de contaminación dentro del cuerpo receptor el río Apatlaco, su composición química cambia en función de factores como la raza del animal, su edad, estado fisiológico y alimentación, entre otros. Sin embargo, se puede hablar de una composición media: 80% agua, 18% de proteínas y 2% de hidratos de carbono, lípidos y sales minerales [45-46] La sangre bovina se divide en dos partes, el plasma y el paquete celular, este último constituido por los glóbulos rojos, los glóbulos blancos y las plaquetas. En el bovino, el plasma representa del 60 al 65% del total y el paquete globular del 35 al 40% [45]. En la Tabla 5 se presenta la composición de la sangre bovina.

Tabla 5: Composición de la sangre, plasma líquido y paquete celular bovino (g/100 mL).

Componente	Sangre	Plasma (60%)	Paquete celular (40%)
Agua	80-85	90-92	70-78
Proteína	15-18	06-ago	25-29
Lípidos	0.15	0.5-1	0.2
Hidratos de carbono	0.10	0.08-0.12	
Sales minerales	1.00	0.8-0.90	Trazas
Otras sustancias	0.55	0.20-0.30	
Materia seca	15-20	810	22-30

Fuente: [45].

Las Propiedades físicas de la sangre bovina son, el color, tanto la mioglobina como la hemoglobina son proteínas conjugadas y son las responsables del color rojo característico en la sangre, que con la exposición a la atmósfera se torna más oscuro.

1.2.4 Biorremediación.

La biorremediación se enfoca en la solución de problemas de contaminación ambiental mediante el uso de sistemas vivos y el aprovechamiento de su metabolismo para degradar total o parcialmente contaminantes, o movilizarlos en matrices sólidas, líquidas o gaseosas. Entre los sistemas biológicos más usados, los microorganismos han sido ampliamente estudiados con estos fines debido a su versatilidad y plasticidad metabólicas y fisiológicas. La biorremediación ha permitido la restauración de suelos y aguas impactados por actividades mineras, petroleras, entre otras actividades antropogénicas [47]

En las últimas dos décadas, ha habido avances recientes en las técnicas de biorremediación con el objetivo final de restaurar eficazmente los ambientes contaminados con un enfoque ecológico y a un costo muy bajo. Sin embargo, debido a la naturaleza y al tipo de contaminante, no existe una técnica estándar de biorremediación que sirva para restaurar los ambientes contaminados [48]. En la Figura 4 se muestran la clasificación de la variedad de técnicas establecidas para la biorremediación, teniendo en cuenta el lugar de aplicación, las técnicas de biorremediación pueden clasificarse como: *ex situ* o *in situ*. La naturaleza del contaminante, la profundidad y el grado de contaminación, el tipo de ambiente, la ubicación, el costo y las políticas ambientales son algunos de los criterios de selección que se consideran al elegir cualquier técnica de biorremediación [49,50]. Además de los criterios de selección, los criterios de rendimiento (concentraciones de oxígeno y nutrientes, temperatura, pH y otros factores abióticos) que determinan el éxito de los procesos de biorremediación también reciben importantes consideraciones antes de seleccionar la técnica de biorremediación [50].

Las técnicas *ex situ* implican transportar los sitios contaminados para su tratamiento, generalmente se consideran en función del costo, tratamiento, profundidad de la contaminación, el tipo de contaminante, el grado de contaminación, la ubicación geográfica y la geología del sitio contaminado. Las técnicas *in situ* implican el tratamiento de sustancias

contaminadas en el sitio de contaminación. No requiere ningún traslado; por lo tanto, se acompaña de poca o ninguna alteración en la estructura del ambiente contaminado [51].

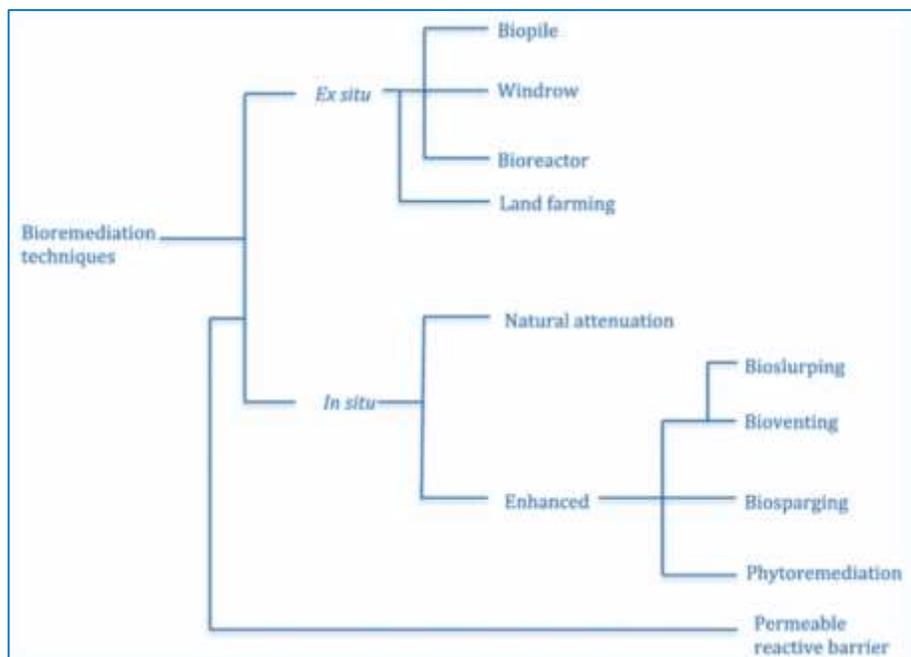


Figura 4. Bioremediation techniques. The divergence of each technique is hypothetical; therefore, the *left to right* order of internal nodes are not the order of evolution (technique development). Permeable reactive barrier (PBR) is not the arbitrary tree root. It is a physical remediation technique with some elements of bioremediation, hence the early hypothetical divergence [51].

Los microorganismos durante su crecimiento realizan diferentes estrategias metabólicas que permiten la degradación a moléculas más sencillas y menos tóxicas sustancias contaminantes altamente recalcitrantes [47].

Entre los grupos microbianos más empleados en estrategias de biorremediación se incluyen las bacterias, arqueas (microorganismos unicelulares), microalgas, protozoarios y hongos (tanto unicelulares como filamentosos). Estos grupos poseen la mayor diversidad genética y metabólica de los seres vivos [47,52] y son capaces de habitar prácticamente cualquier ecosistema con adaptaciones robustas a condiciones ambientales anómalas y dinámicas. Poseen ventajas para la aplicación en técnicas de restauración ecológica como su rápido crecimiento y algunas estrategias genéticas, como el intercambio de elementos genómicos

que les confiere resistencia a ciertos contaminantes como los metales pesados [52,53]. También, pueden degradar formas de materia orgánica muy complejas como los hidrocarburos de alto peso molecular y compuestos poliaromáticos condensados, y como consecuencia producir compuestos de alto valor agregado sin la generación de residuos tóxicos [52,53].

La prospección biotecnológica, se enfoca en la búsqueda de nuevos microorganismos productores de enzimas o metabolitos con potencial de aplicación en sistemas sostenibles. Se reporta que menos del 1% de los microorganismos presentes en la tierra, han sido estudiados o cultivados en el laboratorio [53], de manera que el aislamiento de cepas microbianas continúa siendo una estrategia prometedora para la identificación de nuevas especies candidatas en procesos de biorremediación.

La capacidad que poseen los hongos para degradar compuestos aromáticos complejos, como parte de su metabolismo natural, ha permitido que sean usados en la degradación de diversos compuestos xenobióticos, incluyendo los colorantes sintéticos usados en la industria. Muchos basidiomicetos y ascomicetos han sido usados en la remoción de xenobióticos. Esto puede deberse a que los filamentos fúngicos, son menos sensibles a variaciones en temperatura, pH, nutrientes y aireación [54], adicionalmente gracias a su alta tasa metabólica y a su rápida colonización de superficies que permite un crecimiento rápido sobre un soporte si se desea inmovilizar.

El sistema enzimático extracelular de estos organismos se basa fundamentalmente en la producción de radicales libres, permitiendo que las enzimas sean catalíticamente activas sobre diversos sustratos orgánicos. Las enzimas más significativas son las lacasas, lignino peroxidasas (LiP), manganeso peroxidasas (MnP), y veratril peroxidasas (VP), que tienen una potente capacidad oxidante [55,56,57,58]. Gracias a la gran cantidad de compuestos xenobióticos que pueden ser degradados por estos hongos, se les ha dado un muy importante lugar en procesos de biorremediación.

Estos hongos tienen la capacidad de degradar sustancias como dioxinas, biofenilos policlorinados (PCBs), hidrocarburos policíclicos aromáticos, plaguicidas clorados y organofosforados, entre otras [55]. La acción de estos hongos sobre los colorantes se basa en la baja especificidad del sistema enzimático para depolimerizar y mineralizar la lignina. *Pleurotus ostreatus* utiliza, por ejemplo, la enzima Mn-peroxidasa (MnP), y otros hongos utilizan la lacasa y una aril-alcohol oxidasa productora de peróxido de hidrógeno, entre otras [59].

El proceso de biodegradación de la lignina se especifica en tres pasos principales: 1) la acción de la Mn-peroxidasa (Figura 5), 2) la acción de la lignina-peroxidasa (Figura 6) y 3) acción de la enzima lacasa (Figura 7). En relación con el primer paso, además de las peroxidases que oxidan el polímero de lignina, hay que considerar las enzimas que reducen los radicales liberados durante la degradación (evitando su repolimerización) y los sistemas enzimáticos que generan peróxido de hidrógeno.

En segundo lugar, algunos metabolitos aromáticos sintetizados por los hongos (p.ej. el alcohol veratrílico) desempeñan un papel importante en la degradación, actuando como intermediarios y permitiendo el cierre del ciclo catalítico de las peroxidases ligninolíticas cuando éstas actúan sobre compuestos de elevado potencial redox. Finalmente, la eficaz degradación de la lignina por los hongos parece, en gran medida, el resultado de la acción coordinada de enzimas intracelulares y extracelulares, una parte de las cuales parecen encontrarse inmovilizadas en la vaina de polisacárido que rodea al micelio [60]. La utilización de sistemas mediador-lacasa es una alternativa promisoriosa para procesos biotecnológicos con aplicaciones ambientales. Entre ellos, los de blanqueo de la pulpa de papel, la decoloración de colorantes textiles y la oxidación de hidrocarburos polinucleoaromáticos [58].

extremófilos, y en particular los hongos extremófilos, se consideran una fuente de novedosas enzimas, con alta estabilidad bajo condiciones extremas. Las extremoenzimas, como se les conoce, pueden manifestar actividad catalítica justo en las condiciones donde las habituales dejan de hacerlo. Existen numerosos procesos industriales que requieren el uso de estos biocatalizadores extremófilos. Las industrias agroalimentaria, petrolera, textil y de cuero generan aguas residuales salinas con un alto contenido de contaminantes orgánicos como hidrocarburos aromáticos, fenoles, nitroaromáticos y colorantes azoicos. Los microorganismos halófilos tienen un interés creciente en el tratamiento de residuos industriales, debido a su capacidad para degradar sustancias peligrosas de manera eficiente en condiciones con presencia de NaCl [63]. El aislamiento e identificación de microorganismos halófilos y halotolerantes de sitios hipersalinos geográficamente no relacionados y geológicamente diversos respalda su aplicación en procesos de biorremediación.

Un hongo halófilo es un microorganismo capaz de crecer óptimamente en un medio con presencia de NaCl. Actualmente se consideran dos tipos de halófilos; el halófilo moderado (5 a 20% de NaCl) y el halófilo extremo (20 a 30% de NaCl). También suele utilizarse el término halófilo débil que considera a los microorganismos que viven en ambientes con una salinidad próxima a la del agua de mar (óptimo entre 2-5% de NaCl) [63]. Así como microorganismos denominados halotolerantes que tienen un crecimiento óptimo sin sal y admiten cierta resistencia en medios con concentraciones de sal. Los organismos halófilos son una clase interesante de organismos extremófilos que se han adaptado a condiciones hipersalinas, son capaces de competir exitosamente por el agua y resistir los efectos desnaturizantes de las sales, debido al desarrollo de mecanismos de adaptación.

La membrana citoplasmática constituye una barrera que separa el citoplasma del medio externo en el que pueden producirse cambios en la concentración de sales, por lo que debe jugar un papel importante en la respuesta de la célula a dichos cambios. Se ha demostrado que la adaptación de la composición lipídica de las membranas celulares frente a una nueva

situación de estrés osmótico incluye modificaciones en el tipo de Fosfolípidos existentes en las membranas, y en el tipo de ácidos grasos que forman parte de los lípidos [64].

La principal estrategia que desarrollan los microorganismos halófilos para adaptarse al estrés osmótico se basa en la acumulación masiva de compuestos en el citoplasma para compensar la presión osmótica del medio externo. Los compuestos acumulados pueden ser iónicos o no iónicos, según el tipo de microorganismo, lo que determina de forma general la existencia de dos mecanismos principales de acumulación.

El primero de ellos, denominado mecanismo “*salt-in*” (Figura 8) es típico de Arqueas y Haloanaerobiales (bacterias halófilas moderadas anaerobias estrictas), que acumulan en su citoplasma iones inorgánicos, principalmente K^+ y Cl^- . El aumento en la concentración de KCl en el citoplasma conlleva a una adaptación a las altas concentraciones salinas de todas las proteínas y otros componentes celulares como los ribosomas [64,65].

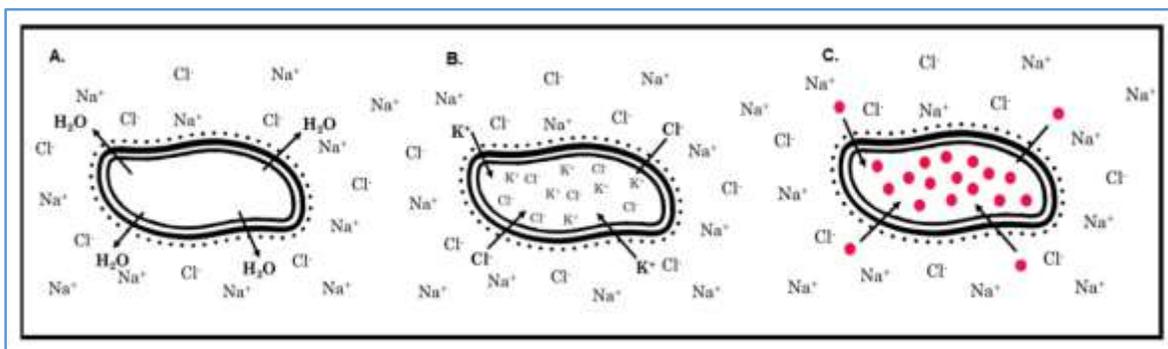


Figura 8. Estrategias de haloadaptación en organismos halófilos. A. En organismos no halófilos se genera pérdida de agua y se da plasmólisis, B. Los halófilos extremos mantienen acumulan iones para igualar la presión osmótica, C. Los halófilos moderados mantienen su turgor acumulando solutos compatibles [65].

El segundo mecanismo conocido como “*salt out*” (Figura 9), es el que utilizan las bacterias tanto halófilas como no halófilas, además de las arqueas metanógenas halófilas moderadas. Estos microorganismos, en respuesta al estrés osmótico, acumulan en su citoplasma compuestos orgánicos de bajo peso molecular que mantienen el equilibrio osmótico sin interferir con el metabolismo celular, por lo que se denominan solutos compatibles [65].

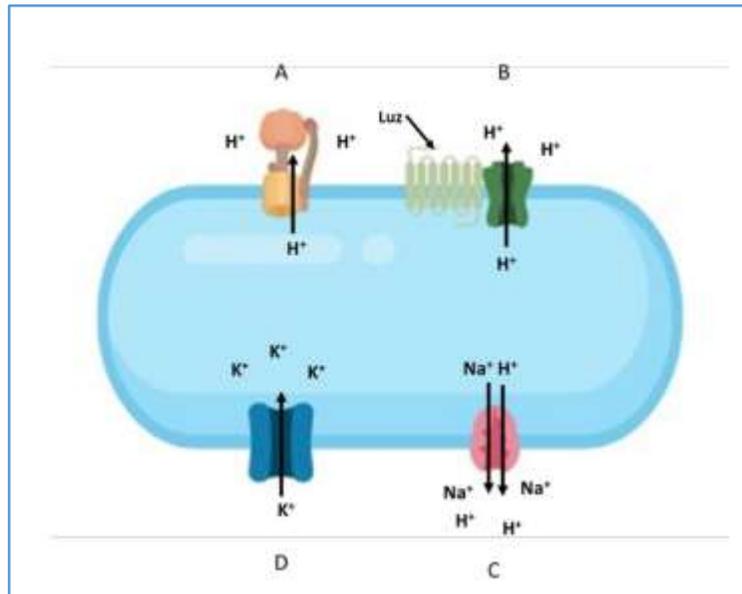


Figura 9. Representación gráfica de algunas de las proteínas transportadoras de membrana implicadas en la internalización de cationes potasio (K^+) en organismos halófilos. A) ATP sintasa, B) Bacteriorodopsina, C) Antiportador sodio/hidrógeno, D) Uniportador de potasio [65].

Los solutos compatibles se tratan de un sistema mucho más flexible, ya que permite la adaptación a las fluctuaciones en la presión osmótica del medio. Los solutos compatibles pueden acumularse tras su transporte al interior celular desde el medio externo, o bien mediante síntesis, como sucede, por ejemplo, cuando las bacterias se cultivan en un medio mínimo [66]. Los principales solutos compatibles descritos a la fecha son: aminoácidos, azúcares, glicina betaína, ectoína e hidroxiectoína [64,65,66].

CAPÍTULO 2. PLANTEAMIENTO GENERAL DE LA INVESTIGACIÓN.

2.1 Planteamiento del problema.

La cuenca del río Apatlaco es considerada patrimonio ambiental de los morelenses y atraviesa 10 municipios del estado [63]. Sin embargo, es la cuenca más afectada por las descargas líquidas de los rastros municipales, que no cuentan con una disposición adecuada para su tratamiento. El río se encuentra bajo la amenaza del vertido residual de 8 rastros lo que

equivale a un promedio de 6,400 cabezas sacrificadas por mes (62.2% de la producción total en el estado), lo que agrava la situación de contaminación ya presente en el río, de acuerdo al nivel de riesgo sanitario, estos residuos líquidos se consideran como residuales de muy alto riesgo. Debido a esta situación se plantea el estudio de un proceso de biorremediación mediante hongos halófilos, que permitan un mayor nivel de remoción de la alta carga orgánica, característica de las aguas residuales de los rastros en Morelos. Estos organismos son fundamentales en el desarrollo de tecnologías que requieran de sistemas biológicos y sus derivados. Los hongos extremófilos por su capacidad metabólica de degradar la pared celular y liberar el contenido del protoplasma, suelen ser los primeros en colonizar la materia orgánica, degradando la materia orgánica más resistente, reteniendo los nutrientes obtenidos bajo la forma de biomasa de hongos, liberando dióxido de carbono (CO₂), este material resistente es la lignocelulosa y las proteínas los cuales se degradan en varias etapas [64, 65].

2.2 Justificación.

La biorremediación se perfila como la opción ambiental más amigable del siglo XXI para fines de tratamientos de aguas residuales industriales. La estrategia de restauración ecológica, mediante el uso de microorganismos ofrece respuestas más efectivas a la remoción de xenobióticos que empleando tratamientos físicos y/o químicos. Los microorganismos extremófilos por su condición heterótrofa (obtiene su energía de materia orgánica muerta), su adaptabilidad ambiental, resistencia específica a ambientes extremos y capacidad de producir una amplia gama de extremoenzimas son un modelo para el estudio de su influencia en el proceso de remoción de aguas contaminadas por el proceso de sacrificio animal en los rastros municipales del estado de Morelos.

2.3 Hipótesis.

La caracterización y prospección biotecnológica de una colección de hongos extremófilos permitirá identificar cepas candidatas para el tratamiento de aguas residuales provenientes de rastros municipales.

2.4 Objetivo.

2.4.1 Objetivo general.

Caracterizar una colección de hongos extremófilos aislados de ambientes hipersalinos con miras a explorar sus potencialidades para el tratamiento de aguas residuales provenientes de rastros municipales.

2.4.2 Objetivos específicos.

- Identificar mediante taxonomía polifásica los aislados fúngicos extremófilos.
- Caracterizar la colección de hongos en términos de su comportamiento halófilo y xerófilo.
- Evaluar *in vitro* el potencial biotecnológico de los aislados fúngicos para la degradación de xenobióticos presentes habitualmente en aguas residuales provenientes de rastros municipales.
- Evaluar en condiciones de laboratorio el tratamiento de un agua residual prototipo.
- Cuantificar enzimas extracelulares potencialmente involucradas en el biotratamiento fúngico del agua prototipo.

CAPÍTULO 3. DISEÑO Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

3.1 Diseño experimental.

El diseño experimental es una técnica estadística que permite identificar y cuantificar las causas de un efecto dentro de un estudio experimental. En un diseño experimental se manipulan deliberadamente una o más variables vinculadas a las causas, para medir el efecto que tiene en otra variable de interés. Las variables pueden ser cualitativas o cuantitativas con valores o niveles. El efecto de una variable se define como el cambio en la respuesta que produce un cambio en el nivel de la variable [67].

3.1.1 Diseño bidimensional de varianza (ANOVA).

Para determinar las diferencias significativas del crecimiento fúngico entre los diferentes sustratos y los aislados fúngicos, se utilizó un diseño ANOVA bidireccional de varianza que permite estudiar simultáneamente los efectos de dos variables con sus niveles. El diseño bidireccional cubre todas las posibles combinaciones de esos niveles con las dos variables independientes.

El estudio realizado evalúa el crecimiento micelial en diferentes sustratos a varias concentraciones. Las variables independientes son cualitativas (Tipo de cepa fúngica) y cuantitativas (concentración de sustrato). La variable dependiente es cuantitativa y está determinada por el crecimiento micelial, el diseño bidireccional determinará si existe diferencia significativa en el crecimiento fúngico entre las especies de hongos y las concentraciones del sustrato, con un valor de significancia $\alpha = 0.05$.

3.1.2 Diseño de Heatmapper (Mapa de calor).

El Heatmapper permite visualizar de forma interactiva los datos en forma de mapas de calor a través de una interfaz gráfica fácil de usar, muestra datos de expresión no agrupados, de manera jerárquica. Donde el color más fuerte indica mayor crecimiento y el color más claro un crecimiento menor. El mapa de calor se usó para interpretar el crecimiento micelial en HPAs, gasolina, diésel, algodón, paja de trigo, carboximetilcelulosa (CMC) y olote. En el mapa se observa la jerarquía del crecimiento.

3.1.3 Diseño factorial 2^k .

En el diseño factorial 2^k se estudian los efectos de todas las combinaciones de k variables, tomando cada una de ellas en dos niveles distintos, donde $2^k=N$ indica el número de experiencias que deben hacerse para los distintos valores de las k variables. Si cada variable es continua, los dos niveles son el superior y el inferior. Si una variable es cualitativa, los dos niveles corresponden a los tipos usados o bien a la presencia o ausencia de una variable [67].

El efecto principal de una variable con dos niveles es la diferencia entre la respuesta media observada cuando tal variable estuvo en su nivel alto y la respuesta media observada cuando tal variable estuvo en su nivel bajo. Con este diseño estadístico se estudiará el experimento del agua prototipo. Donde se tienen dos variables y cada una tiene dos niveles; inóculo activo (+), inóculo inactivo (-) y el tiempo en día cero (0) y tiempo en día 16 (+). Siendo el valor de DQO la variable a estudiar bajo esas condiciones. En la tabla 7 se muestra el diseño 2^k ajustado al tratamiento fúngico en aguas residuales prototipo.

Tabla 6: Diseño 2^k para tratamiento fúngico en agua residual prototipo.

Tratamiento	Inóculo	Tiempo	Combinación de tratamiento
1	-	-	(1)
2	+	-	A
3	-	+	B
4	+	+	Ab

El crecimiento micelial de cada hongo se cuantificó utilizando el software JMP, es un conjunto de programas de computadora para análisis estadístico desarrollado por la unidad de negocios JMP de SAS Institute. El software JMP se centra en parte en el análisis y visualización de datos exploratorios, vincula datos estadísticos a gráficos que los representan.

3.2 Estrategia experimental.

La Figura 3 muestra el diagrama del proceso experimental, se divide en 3 etapas principales, la primera es la identificación de los hongos utilizando técnicas de Microscopia (observación taxonómica) y Biología Molecular (extracción de ADN y Reacción en Cadena de la Polimerasa; 'PCR' siglas en ingles). Así como su caracterización halófila (crecimiento en NaCl) y su crecimiento en condición xerófila de 0.85 actividad de agua (a_w).

La segunda etapa está enfocada a evaluar el crecimiento de los hongos en diferentes sustratos celulósicos y xenobióticos, en un medio donde no existe ninguna otra fuente de carbono que las cepas puedan usar para realizar sus funciones fisiológicas.

La tercera etapa del estudio consistió en medir la DQO de un agua residual prototipo inoculando 4 cepas fúngicas (Seleccionadas en la etapa 2), determinando el nivel de DQO en tiempo cero y a los 16 días posteriores a la inoculación. Así como la determinación de actividades enzimáticas extracelulares en el tratamiento fúngico del agua residual prototipo.

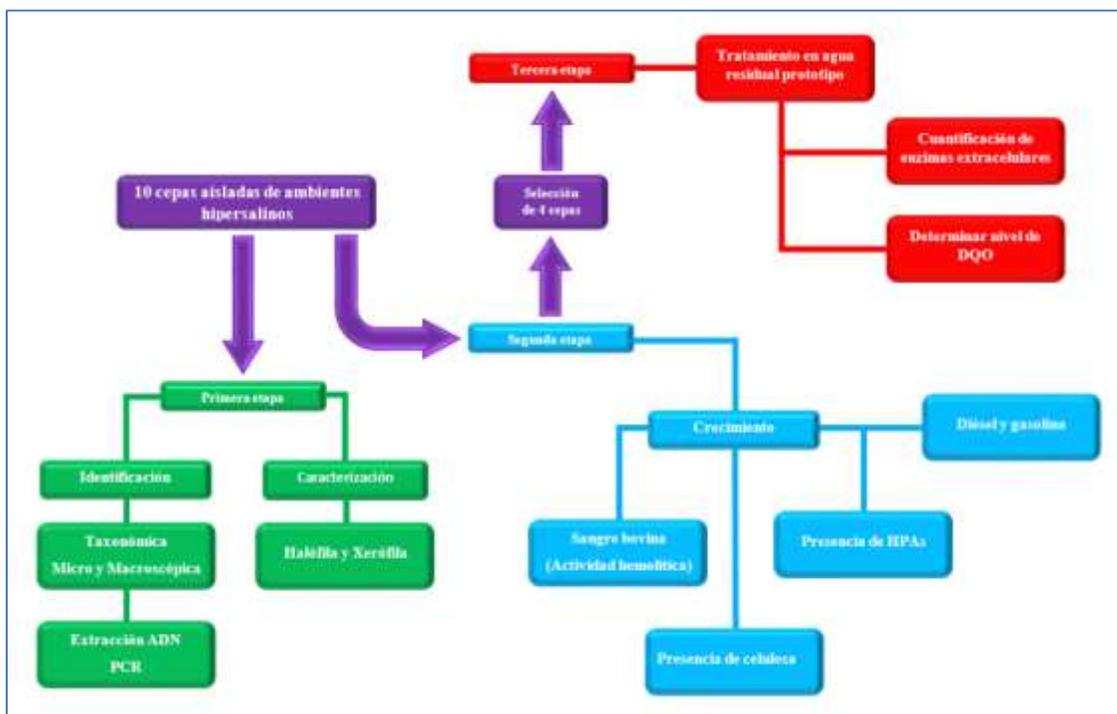


Figura 10. Diagrama de estrategia experimental.

3.3 Materiales y métodos.

3.3.1 Microorganismos y obtención de biomasa.

Los microorganismos en estudio se encontraban conservados en el Laboratorio de Microorganismos Extremófilos del Centro de Investigación en Dinámica Molecular de la UAEM. Para la obtención de micelio fresco se inocularon los hongos aislados de ambientes hipersalinos de Baja California a 28°C durante 7 días en Medio Agar Extracto de Malta

(MEA) con NaCl a 1M. Para 500 mL de medio a 1 M NaCl se pesó 29.22 g de NaCl, 16.8 de extracto de malta, 10 g de agar bacteriológico, 5 g de peptona de caseína y 10 g de dextrosa. Cada siembra se realizó por triplicado, para asegurar el crecimiento de los hongos.

3.3.2 Caracterización Morfológica.

Una vez que los hongos se inocularon por siete días se procedió a realizar su caracterización por microscopía. En un ambiente estéril, se adhirió una cinta adhesiva transparente (tipo diurex) sobre la colonia del hongo a observar para tomar una porción del micelio aéreo. Posteriormente, se colocó una gota de azul de lactofenol sobre un portaobjetos colocando la cinta sobre la gota y el portaobjetos, por último, se colocó un cubre objetos. El frotis así preparado, se examinó utilizando un microscopio óptico OLYMPUS modelo CHS con un aumento de 40X y se procedió a registrar las características que presentaba el micelio del hongo. Este proceso se realizó con cada uno de los hongos de estudio, por duplicado, para asegurar la consistencia de los resultados.

3.3.3 Identificación Molecular de los Hongos.

Se tomó micelio previamente sembrado en MEA a 1M NaCl por 7 días a 28 °C, y se extrajo el ADN de cada una de las cepas (protocolo Extracción de ADN Genómico de Hongos Filamentosos, Lab. Dr. Folch, 2014). La extracción se realizó congelando y macerando, el micelio con N₂ líquido se obtuvo un fino polvo, el polvo obtenido se transfirió a un tubo eppendorf (1.5 mL), donde se adicionó 500 µL de Buffer de extracción (100 mM Tris-HCl pH=8; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA y 0.5% SDS). Después de homogenizar se añadió 4µL de RNAsa, para incubar a 37°C por 3 min y posteriormente se centrifugó. Se extrajo el sobrenadante y se adicionó 300 µL de fenol/cloroformo/isoamilico (24:24:1) a cada muestra y se centrifugó. Se transfirió la fase acuosa a un tubo eppendorf y se añadió cloroformo en una proporción 1:1 con la fase acuosa, se mezcló y centrifugo. Nuevamente se extrajo la fase acuosa colocándola en otro tubo eppendorf y se adicionó 500 µL de isopropanol el cual se mezcló perfectamente por inversión y se incubo a -20 °C por 1 hora, después se centrifugó. Una vez precipitado se observó el pellet posteriormente se purifico el ADN; se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla 2 veces con 500 µL de Etanol/agua MilliQ (70:30). La

pastilla se secó en un Thermo Shaker a 40°C por 50 min. Finalmente, se agregó 30 µL de agua desionizada estéril. Las muestras después de ser purificadas fueron verificadas mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Una vez cargado el gel con las muestras se realizó la electroforesis a 110 V, 30 minutos. Después de la electroforesis el gel se dejó en Bromuro de etidio por 5 min. Posteriormente se observaron las bandas en el Fotodocumentador.

El ADN extraído fue amplificado por PCR, amplificando la región LSU (dominios hipervariables D1 y D2) subunidad grande 25-28S RNAr. Los cebadores empleados para identificación molecular de los hongos fueron LROR 5' ACCCGCTGAACTTAAGC 3' y LR5 5' TCCTGAGGGAACTTCG 3' los cuales amplificaron un fragmento del gen 28S RNAr. Para la amplificación se tomó 1 µL de ADN genómico (diluido 1:4) y se mezcló con 2 µL buffer taq., 2 µL dNTPs (10 mM), 1.6 µL MgCl₂ (25 mM), 2 µL de cebadores (10 mM), 0.4 µL Taq. Polimerasa (5U/ µL) y 11 µL de agua desionizada para un volumen final de 20 µL.

La reacción se realizó bajo las siguientes condiciones: 35 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 53 °C y 55 seg a 72 °C. Los productos de PCR se evidenciaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% posteriormente se realizó la electroforesis como se describe anteriormente. Los fragmentos de ADN se purificaron utilizando un kit de purificación de PCR (Thermo Scientific), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los fragmentos purificados se enviaron a secuenciar a MACROGEN Korea.

Las secuencias obtenidas se evaluaron en el sitio web Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI), Biblioteca Nacional de Medicina de EE. UU. y se compararon con la base de datos '28S secuencias de ARN ribosómico (fúngico)' empleando la herramienta BLAST para establecer la identificación de los hongos sometidos al estudio.

3.3.4 Caracterización halófila.

Se preparó medio agar extracto de malta a 0 M, 1 M, 1.5 M, 2 M y 2.5M de NaCl, se adicionó 500 mL de agua destilada a cada molaridad de NaCl, así como extracto de malta, peptona de caseína, dextrosa y agar. Como se muestra en la tabla 8 para cada una de las Molaridades.

Tabla 7: Composición de MEA a diferentes Molaridades de NaCl.

Compuesto en (g)	0 M	1 M	1.5 M	2 M	2.5 M
Ext, Malta	16.8	16.8	16.8	16.8	16.8
Peptona	5	5	5	5	5
Dextrosa	10	10	10	10	10
Agar	10	10	12.5	15	15
NaCl	0	29.66	43.8	58.44	73.05

El control consistió en la siembra de cada cepa en MEA sin NaCl. Cada cepa y su control se sembró por triplicado y fueron inoculadas a 28°C por 8 días. Se observaron diariamente hasta el día 8, se tomaron fotografías de cada caja Petri en condiciones estériles, cada una de las fotografías obtenidas se analizaron en el software IMAGEJ, programa de procesamiento de imagen digital, programado en Java desarrollado en el National Institutes of Health. IMAGEJ fue diseñado con una arquitectura abierta que proporciona extensibilidad vía plugins Java y macros (macroinstrucciones) grabables. Se pueden desarrollar plugins de escaneo personalizado, análisis y procesamiento usando el editor incluido en IMAGEJ y un compilador Java. Obteniendo el área de crecimiento del micelio en cm².

3.3.5 Ensayo Xerófilo condición de $a_w = 0.85$.

Se preparó MEA a 1 M NaCl suplementado con Glicerol, Sorbitol y MgCl₂. Para tener una actividad de agua teórica de 0.85; se adicionaron 407 g de sorbitol, 335 g de MgCl₂ y 204 mL de glicerol respectivamente a cada medio. En el caso del glicerol previamente se extrajo 204 mL de MEA, para tener un volumen final de 500 mL. Se vertió el medio en cajas Petri (15 mL por caja). Se realizó la siembra para cada cepa, el control de cada cepa consistió en MEA sin glicerol, sorbitol y MgCl₂ respectivamente. Inoculando por triplicado a 28 °C por

8 días. El crecimiento se observó diariamente, tomando fotografías en el día 8, cada una de las fotografías fueron analizadas en el software IMAGEJ, para obtener el área de crecimiento en cm².

3.3.6 Crecimiento en sangre bobina.

Debido a las características del agua residual que presentan los establecimientos destinados al sacrificio de animales de abasto se realizó un ensayo biotecnológico donde se evaluó el crecimiento del hongo en Medio Mínimo (MM) Vogel's suplementado con sangre bobina. La composición del MM Vogel's se especifica en la tabla 8.

Tabla 8: Composición de Medio Mínimo Vogel's para 500 mL.

Nombre	Formula	Cantidad
Sulfato de Cobre (II) pentahidratado	CuSO ₄ ·5H ₂ O	3.9 mg
Sulfato de Hierro (II) heptahidratado	FeSO ₄ ·7H ₂ O	9 mg
Sulfato de Magnesio heptahidratado	SO ₄ ·7H ₂ O	250 mg
Sulfato de Zinc	ZnSO ₄	5 mg
Cloruro de Potasio	KCl	25 mg
Fosfato dipotásico	K ₂ HPO ₄	500 mg
Nitrato de Amonio	NH ₄ NO ₃	1 g
Cloruro de Sodio	NaCl	29.66g
Agar	-	11.25g

Se preparó un volumen total de 500 mL de MM Vogel's a 8 y 12% de sangre bovina. El medio se dejó enfriar a 45-50°C, posteriormente se le retiró 40 mL de MM y se añadió 40 mL de sangre para tener 8% de sangre. Así mismo se retiró 60 mL MM y añadió de sangre 60 mL para tener 12 % de sangre, homogenizando bien cada uno de los medios se vació en las cajas Petri (15 mL en cada caja), se realizó una resiembra en las cajas Petri de cada cepa y un control que consistió en MM-sangre sin inoculación por triplicado. Se tomaron fotos a cada una de las cajas Petri en el día 8 y en el día 21, las fotos fueron tomadas a contra luz, para apreciar el halo alrededor del micelio y determinar el tipo de hemolisis que realiza el hongo. Cada una de las fotografías obtenidas se analizaron en el software IMAGEJ obteniendo el área de crecimiento del micelio en cm².

3.3.7 Crecimiento en celulosa.

El experimento consistió en suplementar el MM Vogel's con diferentes sustratos. Se pesaron 30 veces 300 mg de olote triturado el cual fue colocado sobre pequeños envoltorios de papel aluminio para ser esterilizado en autoclave. Este procedimiento se repitió con la paja de trigo. Para el caso de algodón este solo fue pesado y colocado en el papel de aluminio para realizar la esterilización. Con la Carboximetilcelulosa (CMC) se adicionaron 10 g en 500 mL de MM Vogel's para tener el 2% de CMC. Se colocaron en cada caja Petri 300 mg de sustrato y 15 mL de MM Vogel's para tener cada sustrato al 2%, para la CMC solo se vertieron 15 mL del medio en las cajas suplementado previamente con la CMC, el control consistió en la siembra de cada hongo por triplicado en cajas Petri que solo contenían MM Vogel's por triplicado. Se incubó a 28 °C por 8 días, en el octavo día se procedió a tomar la fotografía de cada placa para su posterior análisis en el software IMAGEJ, obteniendo el área de crecimiento de cada cepa en cm².

3.3.8 Crecimiento en presencia de HPAs; Benzo [a] pireno y Fenantreno.

Se preparó 500 mL MM Vogel's, cada uno de los medios se preparó a diferentes partes por millón (ppm) de HPAs, las concentraciones se formularon como se especifica en la tabla 10.

Tabla 9: MM Vogel's adicionado con HPAs a diferentes ppm.

Frasco	ppm	Benzo (a)Pireno	Fenantreno	MM Vogel's (mL)
1	50	250 µL	250 µL	499.5
2	100	500 µL	500 µL	499
3	200	1 mL	1 mL	498
4	300	1.5 mL	1.5 mL	497
5	500 mL MM Vogel's			

El control consistió en la siembra de cada hongo por triplicado en cajas Petri que solo contenían MM Vogel's. Se incubó a 28 °C por 8 días, en el octavo día se procedió a tomar la fotografía de cada placa para su posterior análisis en el software IMAGEJ, obteniendo el área de crecimiento de cada cepa en cm².

3.3.9 Crecimiento en presencia de diésel y gasolina.

Se prepararon 500 mL MM Vogel's, para tener el 1% de diésel se colocaron en cada caja Petri 150 μ L de diésel y 14.85 mL de medio mínimo. Al 2% se adicionaron 300 μ L de diésel y 14.7 mL de MM, por triplicado. Se realizó la siembra de las cepas e incubaron a 28°C por 8 días. Se realizó lo mismo en el caso de la gasolina. El control se sembró por triplicado en cajas Petri que contenían solo el MM sin diésel y gasolina respectivamente. Al octavo día se procedió a tomar la fotografía que se analizó en el programa IMAGEJ, obteniendo el área de crecimiento en cm^2 .

3.3.10 Crecimiento en agua residual artificial.

Se realizó una formulación de un prototipo de agua residual de rastros municipales con diferentes contaminantes orgánicos y xenobióticos, utilizando 500 mL de agua de grifo. La composición exacta del agua artificial se especifica en la tabla 10, se sembró en el agua 4 cepas previamente seleccionadas.

Tabla 10: Composición del agua residual de rastro municipal artificial.

Componentes		Concentración	Cantidad
Sangre	Bovino	10%	50 mL
Tripa		1%	5 gr
Hígado		1%	
Panza		1%	
Tejido Adiposo		1%	
Heces		0.50%	2.5 gr
Orina		0.50%	2.5 mL
Paja	Trigo	1%	5 gr
Fármaco	Sulfamida	100 mg/L	50 mg
Sal	NaCl	1 M	29.66 gr

Se adicionaron 13.5 mL del agua artificial en frascos de vidrio (gerber), se inocularon con preinóculo y preinóculo inactivado de cada una de las 4 cepas por triplicado, 3 frascos fueron para los blancos del experimento que contenían solo 15 mL del agua residual prototipo sin

inocular. El control del ensayo consistió en la inoculación de la biomasa inactivada para cada cepa. Se incubó a 28 °C, 250 revoluciones por minuto (rpm) por 21 días.

3.3.11 Preparación de preinóculo.

Para el tratamiento fúngico en el agua residual artificial se preparó a partir de una suspensión de biomasa obtenida del cultivo crecido en MEA a 1 M de NaCl de las cepas previamente seleccionadas. Se preparó 100 mL de medio líquido extracto de malta a 1 M de NaCl. La composición del medio consistió en; 3.36 g de extracto de malta, 1 g de peptona de caseína, 2 g de dextrosa, 2 g de Agar y 5.84 g de NaCl. Se adicionaron 5 plots por cepa. Ambos matraces se inocularon en una incubadora con agitación a 250 rpm, 28°C durante 8 días. Una vez obtenida la biomasa en los matraces, se procedió a licuar el contenido líquido y la biomasa, se tomó una alícuota de 1.5 mL de cada matraz que fue añadida al frasco de gerber con 13.5 mL de agua residual previamente formulada.

3.3.12 Cuantificación de enzimas extracelulares en el tratamiento fúngico del agua residual (prototipo).

Las actividades enzimáticas se determinaron a partir del sobrenadante extraído al día 21 de incubación, el sobrenadante colectado se centrifugó en tubos de 15 mL a una velocidad de 4000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se descartó cualquier resto de micelio que pudiese contener. Para la determinación de las actividades se emplearon microplacas de 96 pocillos (volumen de cada pocillo 300 µL), y se utilizó un espectrofotómetro automatizado modelo Epoch (BioTek).

3.3.12.1 Cuantificación de proteasas.

Para cuantificar proteasas se añade en cada frasco 2.5 mL de caseína y se incuba en baño mar a 40°C durante 5 min. Posteriormente se adiciona 250 µL de sobrenadante y se incuba por 10 min. en baño maría y 40°C. Se agregan después de la incubación 2.5 mL de TSA y 250 µL de muestra, para incubar 15 min. a 40 °C nuevamente a baño maría. Posteriormente se filtran 2 mL de muestra, se añade 5 mL de Na₂CO₃ (0.5M), 1 mL de reactivo de Folin. Incubar a baño maría a 40°C por 30 min.

Para el control se utilizó 2.5 mL de caseína, 2.5 mL de TSA, 500 µL de agua destilada, 5 mL de Na₂CO₃ (0.5M), 1 mL de reactivo de Folin de la solución stock. Cada muestra se aplicó por triplicado y se realizó la lectura con una longitud de onda de 660 nm

3.3.12.2 Cuantificación de la actividad esterasa.

Una vez que se añadió el sustrato para esterasa a la reacción se monitorearon las absorbancias por triplicado a una longitud de onda de 538nm durante 30 minutos y en intervalos de 1 minuto. El coeficiente de extinción molar utilizado fue de 23 598 M⁻¹cm⁻¹ [68].

Reacción

-200µl de sobrenadante

-100µl de sustrato para esterasa

El blanco utilizado incluyó 200µL de sustrato para esterasa y 100µL de buffer PBS 1X-Tritón (0.1 %). Las lecturas se iniciaron en el momento de adicionar el sustrato y se registraron cada 1minuto durante 30 minutos.

3.3.12.3 Cuantificación de la actividad lacasa.

La determinación de la actividad lacasa se monitoreó por la reacción del 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) en Buffer fosfato PBS 1X-Tritón 0.1%. En presencia de enzimas oxidativas como las lacasas, el ABTS se oxida dando una coloración verde. El coeficiente de extinción molar para el ABTS es de 36 000 M⁻¹ cm⁻¹. La absorbancia se determinó a 420nm.

Reacción:

-200µl de sobrenadante

-90µl de Buffer fosfato (PBS 1X) - Tritón 0.1%

-10 µl de ABTS a 30mM

El blanco utilizado incluyó 290µL de Buffer fosfato (PBS 1X) - Tritón 0.1% y 10µL de ABTS.

3.3.12.4. Cuantificación de la actividad peroxidasa.

Una vez que se añadió el ABTS a la reacción, se monitorearon las absorbancias por triplicado a una longitud de onda de 420nm durante 30 minutos y en intervalos de 1 minuto. El coeficiente de extinción molar del ABTS fue de 36, 000 M⁻¹ cm⁻¹.

Reacción:

- 200µl de sobrenadante
- 80µl de Buffer fosfato (PBS 1X) - Tritón 0.1%
- 10µl de peróxido de hidrógeno al 0.005%
- 10µl de ABTS a 30mM

El blanco utilizado incluyó 280µL de Buffer fosfato (PBS 1X) - Tritón 0.1%, 10µL de ABTS y 10 µL de peróxido de hidrógeno.

3.3.12.5 Cuantificación de la actividad lignina peroxidasa.

La reacción de la actividad de lignina peroxidasa se monitoreó por la reacción de oxidación del 1,2-bis(3,4-dimetoxyfenil) propano-1,3-diol a 3,4-dimetoxibenzaldehído y 1-(3,4-44 dimetoxifenil) etano-1,2-diol en presencia de peróxido de hidrógeno. La absorbancia se determinó a 310nm.

Reacción:

- 100µl de Buffer tartrato (pH=3)
- 30µl de sobrenadante
- 35µl de peróxido de hidrógeno
- 35µl de veranyl alcohol

El blanco contiene 100µL de Buffer tartrato, 35µL de peróxido de hidrógeno, 35µL de veranyl alcohol y 30µL de agua destilada. Las lecturas se iniciaron en el momento de adicionar el sustrato y se registraron cada 1 minuto durante 30 minutos.

3.3.12.6 Cuantificación de la actividad amilasa, celulasa y xilanasas.

Para la determinación de amilasa, celulasa y xilanasas se utilizó el método de azúcares reductores a partir de sustratos poliméricos como lo son almidón, Carboximetilcelulosa y xilano de avena respectivamente. Se utilizó además el ácido 3, 5- dinitrosalisílico, el cual permitió determinar la presencia de grupos carbonilos libres (C=O) y reaccionó con ellos para producir la oxidación de los azúcares. Se utilizaron almidón, Carboximetilcelulosa (CMC) y xilano diluido al 2% en 50 mM de Buffer citrato (pH 5) como sustratos para la medición de las actividades amilasas, celulasas y xilanasas respectivamente.

Reacción:

-50µl de fracción proteínica (muestra)

-100µl de Buffer citrato

-150 µl de almidón (amilasa), CMC (celulasa) y xilano (xilanasas)

Las mezclas fueron incubada a 50°C. Posteriormente, se tomó una alícuota de 25µl cada 5 minutos durante 30 minutos. A estas alícuotas se les adicionaron 25µl de una solución de DNS, se calentaron durante 5 minutos a 90°C y se añadieron 200µl de agua. Inmediatamente, se midió su absorbancia a 540 nm [68].

3.3.13 Determinación de DQO en el tratamiento del agua residual (prototipo).

La determinación de DQO se realizó mediante la NMX-AA-030-SCFI-2001 [69]. El método es a reflujo cerrado (método espectrofotómetro), se añadieron 1.5 mL de la disolución de digestión para alta concentración (10.216 g de dicromato de potasio, 33.6 g de sulfato de mercurio, 167 mL de ácido sulfúrico concentrado/ L agua destilada), se adicionó 2.5 mL de muestra (agua residual prototipo), posteriormente se agregó 3.5 mL de la disolución de

sulfato de plata en ácido sulfúrico (15g sulfato de plata/L ácido sulfúrico). Se realizó la digestión a 150°C por 2 horas. Se midió a una absorbancia de 600 nm. El control consistió en 1.5 mL de la digestión para alta concentración, 3.5 mL de sulfato de plata en ácido sulfúrico y 2.5 mL de agua destilada.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 Características microscópicas y macroscópicas de los 10 hongos.

Las características taxonómicas de la cepa identificada como HX1 se muestran en la Figura 11, tienen una colonia circular plana con textura aterciopelada y pulverulenta con un micelio de color verde oscuro, se observa hifas largas, en el extremo de las hifas está presente un cuerpo circular (vesícula) con paquetes oscuros dentro de las mismas consideradas fíales de donde salen los conidios, los cuales son pequeños y esféricos.

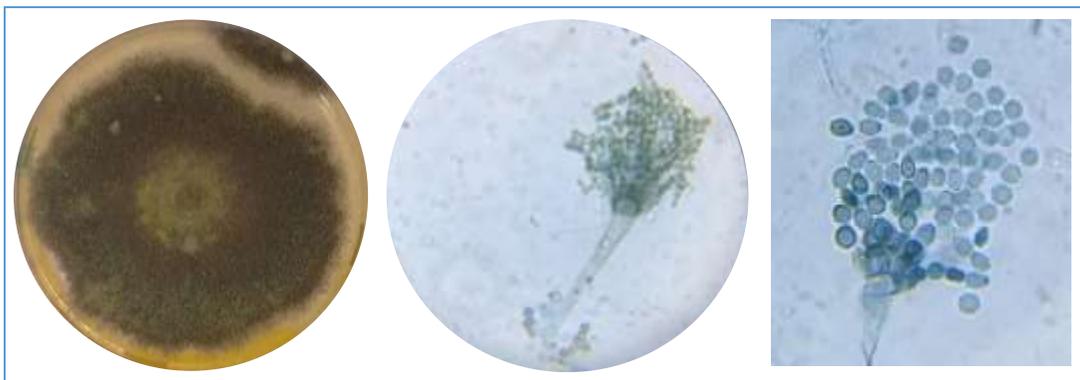


Figura 11. Foto macroscópica y microscópicas de la cepa HX1.

En la Figura 12 se muestran las características de la cepa HX2; el micelio presenta una forma irregular con bordes ondulados elevación convexa de color marrón-verde oscuro con una textura seca y opaca. Las características microscópicas del hongo HX2, se observan hifas finas septadas, estas hifas están ramificadas y presentan un color marrón, sus conidios presentan una estructura elipsoidal y cilíndrica.



Figura 12. Foto macroscópica y microscópicas de la cepa HX2.

La forma de la colonia en HX3 es circular filamentososa con elevación, textura algodonosa aspecto seco y coloración blanca, en esta cepa la periferia es más blanca que en la parte interna de la colonia. En las fotografías microscópicas (Figura 13) de la cepa se puede apreciar que las hifas son largas, delgadas, septadas y con ramificación, sus conidios esféricos son pequeños.

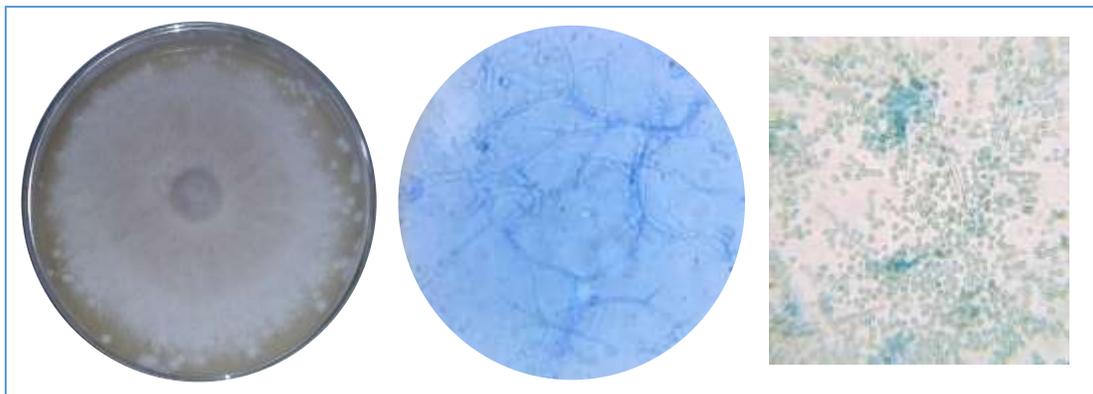


Figura 13. Foto macroscópica y microscópicas de la cepa HX3.

Con la cepa HX4 las características del micelio tienen forma irregular con bordes ondulatorios de color verde olivo oscuro y una delgada periferia de color verde-grisáceo. Microscópicamente muestra hifas largas y ramificadas, con fialides en forma de pincel con conidios redondos como cadenas no ramificadas como se muestra en la Figura 14.

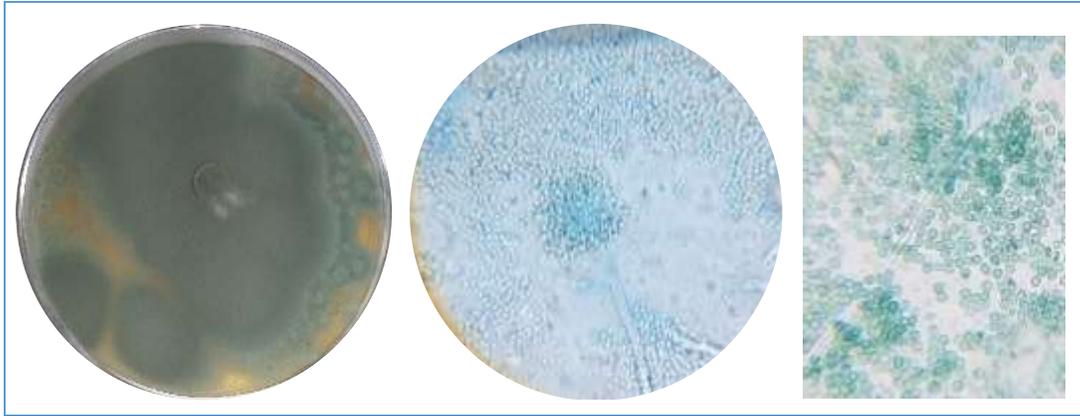


Figura 14. Foto macroscópica y microscópicas de la cepa HX4.

En el caso de la cepa HX5 (Figura 15) el micelio presenta una forma circular con textura afelpada con elevación y color blanco. Las características microscópicas de la cepa son hifas largas con una vesícula circular en el extremo observando paquetes oscuros (fialides) y conidios pequeños, redondos y sin pigmentación.

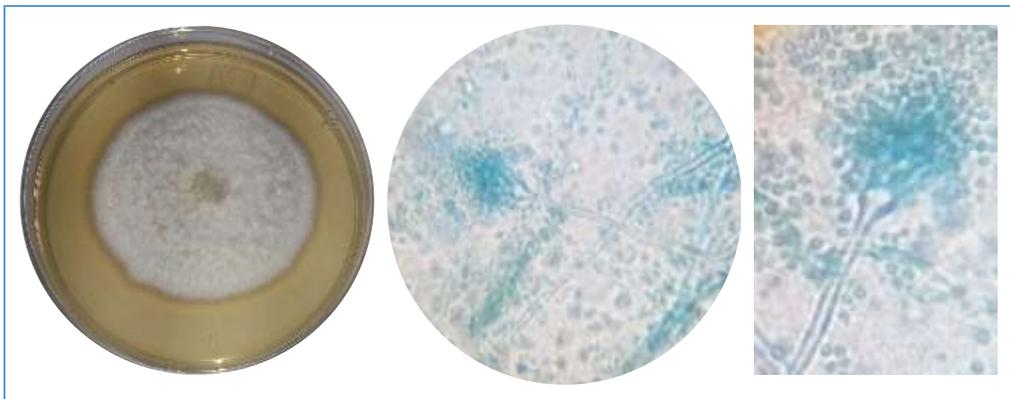


Figura 15. Foto macroscópica y microscópicas de la cepa HX5.

La cepa identificada como HX6 presenta un micelio de tonalidad verde olivo oscuro, con una colonia de forma circular plana con textura aterciopelada y pulverulenta. Sus características microscópicas presentan hifas alargadas y ramificadas con fialides en forma de pincel y conidios pequeños redondeados en forma de cadena no ramificada, como lo muestra la Figura 16.

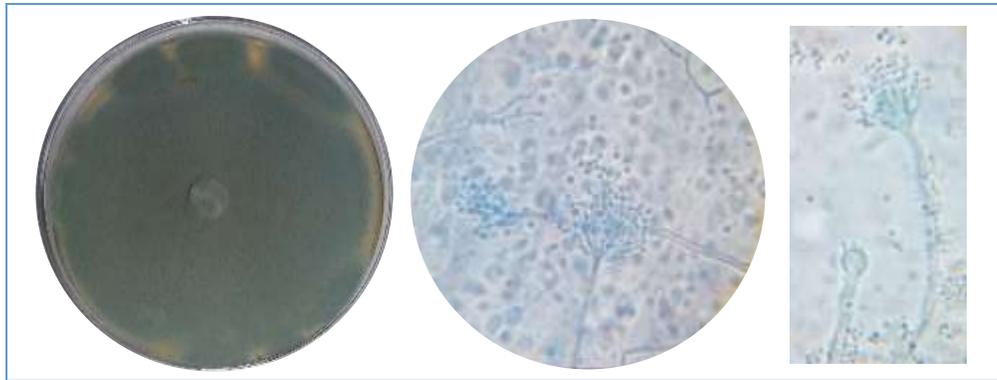


Figura 16. Foto macroscópica y microscópicas de la cepa HX6.

En la figura 17 se muestran las características taxonómicas de la cepa HX7, presenta un micelio color verde azulado en la periferia y con un halo blanco, colonia circular plana de textura aterciopelada y pulverulenta. Microscópicamente presenta hifas alargadas, cabeza conidial (vesícula y fialide), conidios esféricos, pequeños y en gran número.

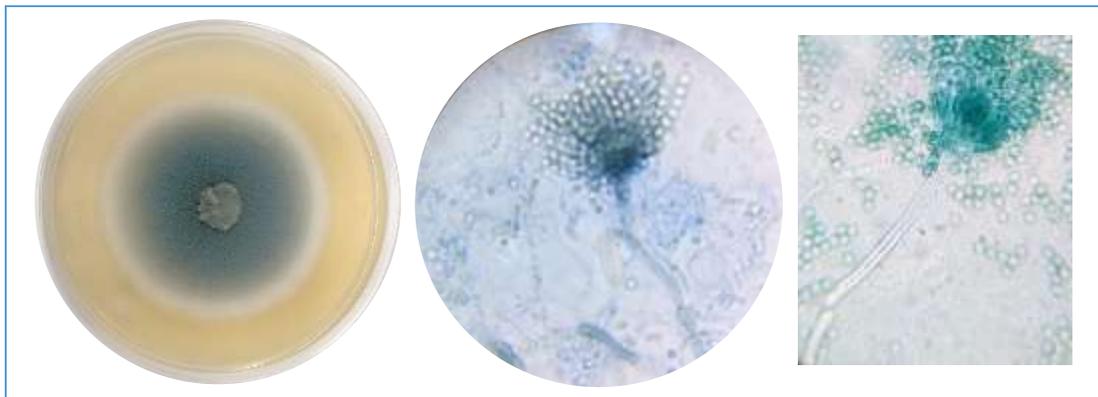


Figura 17. Foto macroscópica y microscópicas de la cepa HX7.

La cepa HX8 presenta una colonia circular plana con textura pulverulenta y aterciopelada y micelio de tonalidad verde olivo oscuro con una línea aproximadamente a la mitad del tamaño de la cepa y en su periferia de tono verde más oscuro como se observa en la Figura 18, con características microscópicas.

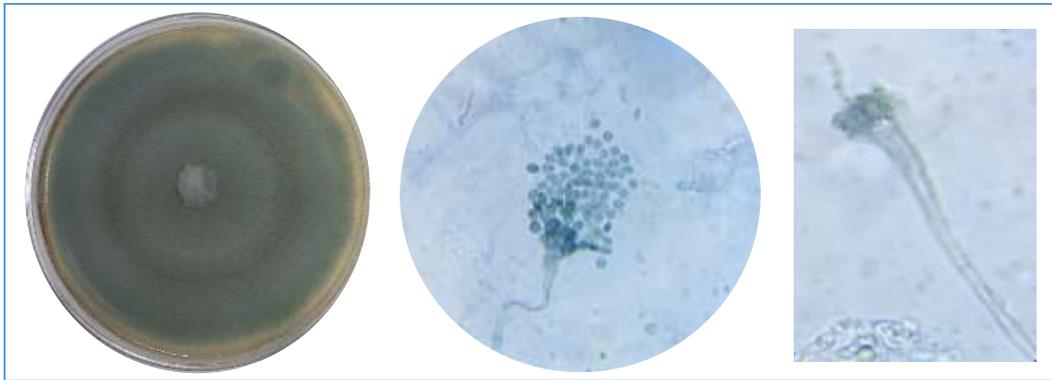


Figura 18. Foto macroscópica y microscópicas de la cepa HX8.

En la cepa HX9 se observa una forma granular, pulverulenta de color café claro seca y ligeramente opaca (Figura 19), en sus características microscópicas presentan hifas alargadas, con vesícula en la parte extrema de la hifa, conidios esféricos, pequeños incoloros y en gran número.

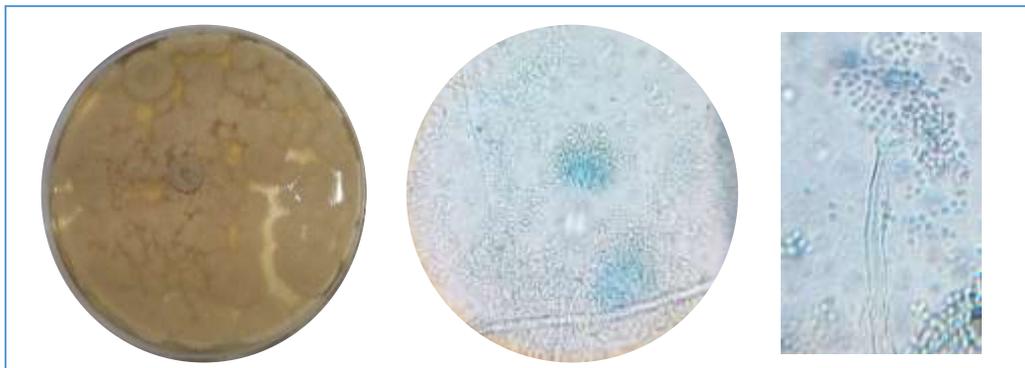


Figura 19. Foto macroscópica y microscópicas de la cepa HX9.

La figura 20 muestra las características taxonómicas de la cepa HX10, macroscópicamente presenta una colonia semicircular plana con textura aterciopelada, pulverulenta seca y ligeramente opaca de color beige. Microscópicamente se observa características de hifas largas, cabeza conidial y conidios esféricos, pequeños y ligeramente pigmentados.

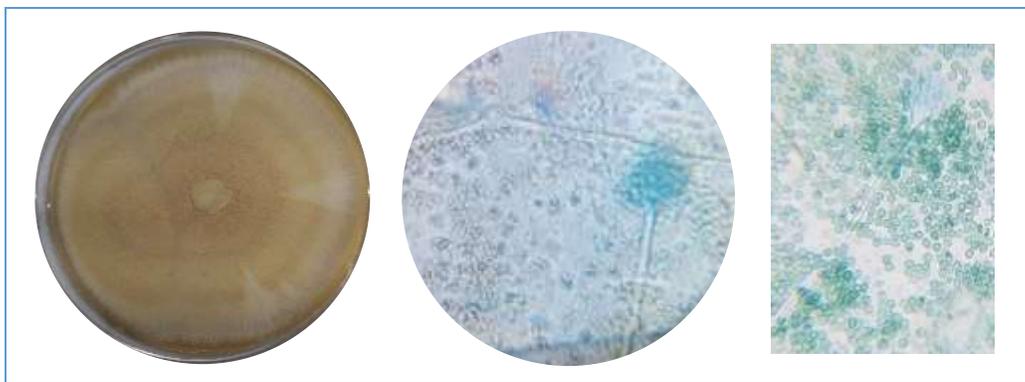


Figura 20. Foto macroscópica y microscópicas de la cepa HX10.

4.1.2 Identificación molecular de los aislados fúngicos.

En la identificación molecular de los aislados fúngicos se realizó la extracción del ADN genómico del cual se corrió un gel de agarosa al 1% en la cámara de electroforesis para asegurar la extracción del ADN (Figura 21).

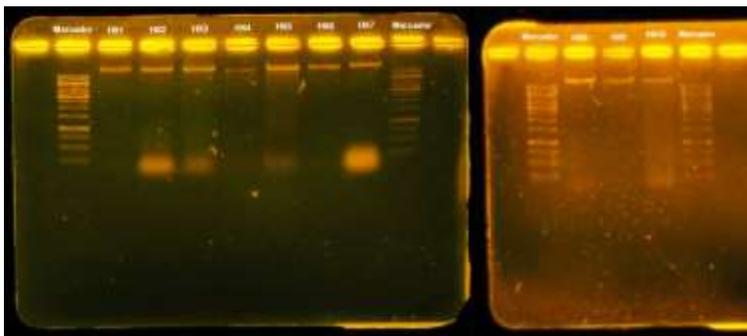


Figura 21. Gel de agarosa Extracción de ADN genómica a los aislados fúngicos.

A ese mismo ADN se aplicó la técnica de PCR “reacción en cadena de la polimerasa” para duplicar la región delimitada por la subunidad grande 25-28S RNAr, una vez concluido el ciclo de PCR se corrió nuevamente un gel de agarosa para revisar la calidad del ADN duplicado (Figura 22). Los residuos del PCR se enviaron a secuenciar a MACROGEN Korea, y al tener las secuencias se realizaron los Blats para su identificación a nivel de especie.



Figura 22. Gel de agarosa de PCR (ADN amplificado).

Con las secuencias se complementan las observaciones al microscopio y la morfología de las cepas en la identificación de los aislados fúngico resultado que se presenta en la tabla 11.

Tabla 11: Resultado del Blast de las secuencias fúngicas.

Fungal	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E. value	Per. Ident	Accession
HX1	<i>Eurotium amstelodami</i> strain CBS518.65 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1607	1607	61%	0.0	100.00%	JF922030.1
HX2	<i>Cladosporium perangustum</i> isolate SC1102_06 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1589	1589	56%	0.0	99.77%	MH875377.1
HX3	<i>Nigrospora osmanthi</i> strain CGMCC3.18126 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1561	1561	60%	0.0	99.77%	KX986106.1
HX6	<i>Penicillium chrysogenum</i> isolate HST25 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1633	1633	59%	0.0	99.66%	MK713338.1
HX7	<i>Aspergillus versicolor</i> strain CBS 117.34 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1607	1607	56%	0.0	99.89%	MH866938.1
HX8	<i>Aspergillus alabamensis</i> strain CBS 125693 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1613	1613	58%	0.0	99.77%	MH875099.1
HX10	<i>Aspergillus terreus</i> strain EUR1 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1602	1602	58%	0.0	99.77%	MF590163.1

La cepa HX1 pertenece a *Eurotium amstelodami* se clasifica como *Aspergillus amstelodami* [67] con 100% de identificación. HX7, HX8 y HX10 se identifican como *A. versicolor* con 99.89% de identificación, *A. alabamensis* y *A. terreus* con un 99.77% de identificación respectivamente. La cepa HX2 identificado como *Cladosporium perangustum* (99.77%), el hongo HX3 pertenece a *Nigrospora osmanthi* (99.77%) y HX6 se identificó como *Penicillium chrysogenum* con un porcentaje de 99.66. Para los aislados nombrados como HX4, HX5 y HX9 no se logró la amplificación del ADN para enviar a secuenciar y obtener su identificación a nivel de especie.

Para HX4, HX5 y HX9 con sus características microscópicas y macroscópicas se concluye que pertenecen al género *Aspergillus* las cuales se muestran en las figuras 14, 15 y 19 respectivamente.

4.1.3 Caracterización halófila.

Los hongos no adaptados a las condiciones de alta salinidad, mueren por deshidratación debido a la fuerte pérdida de agua generada por la diferencia en el potencial osmótico. La diferencia en este potencial hace que el agua del interior de las células tienda a salir hacia su exterior, por lo que las células se desecan y mueren [64, 65]. Sin embargo, en los hongos halófilos es posible desarrollarse óptimamente en este ambiente debido a diversas adaptaciones morfológicas y fisiológicas.

Un mecanismo de adaptación frecuente es acumular mayor cantidad de un soluto en el interior de ciertas estructuras celulares, lo cual genera un cambio en la diferencia de potencial osmótico, quedando el agua retenida en el interior de las células [64, 65]. En la Figura 23 se muestra la capacidad de crecimiento de las cepas fúngicas en diferentes condiciones salinas (0 M, 1 M, 1.5 M, 2 M y 2.5 M de NaCl), así como en el medio sin sal. Cada foto fue tomada al día 8.

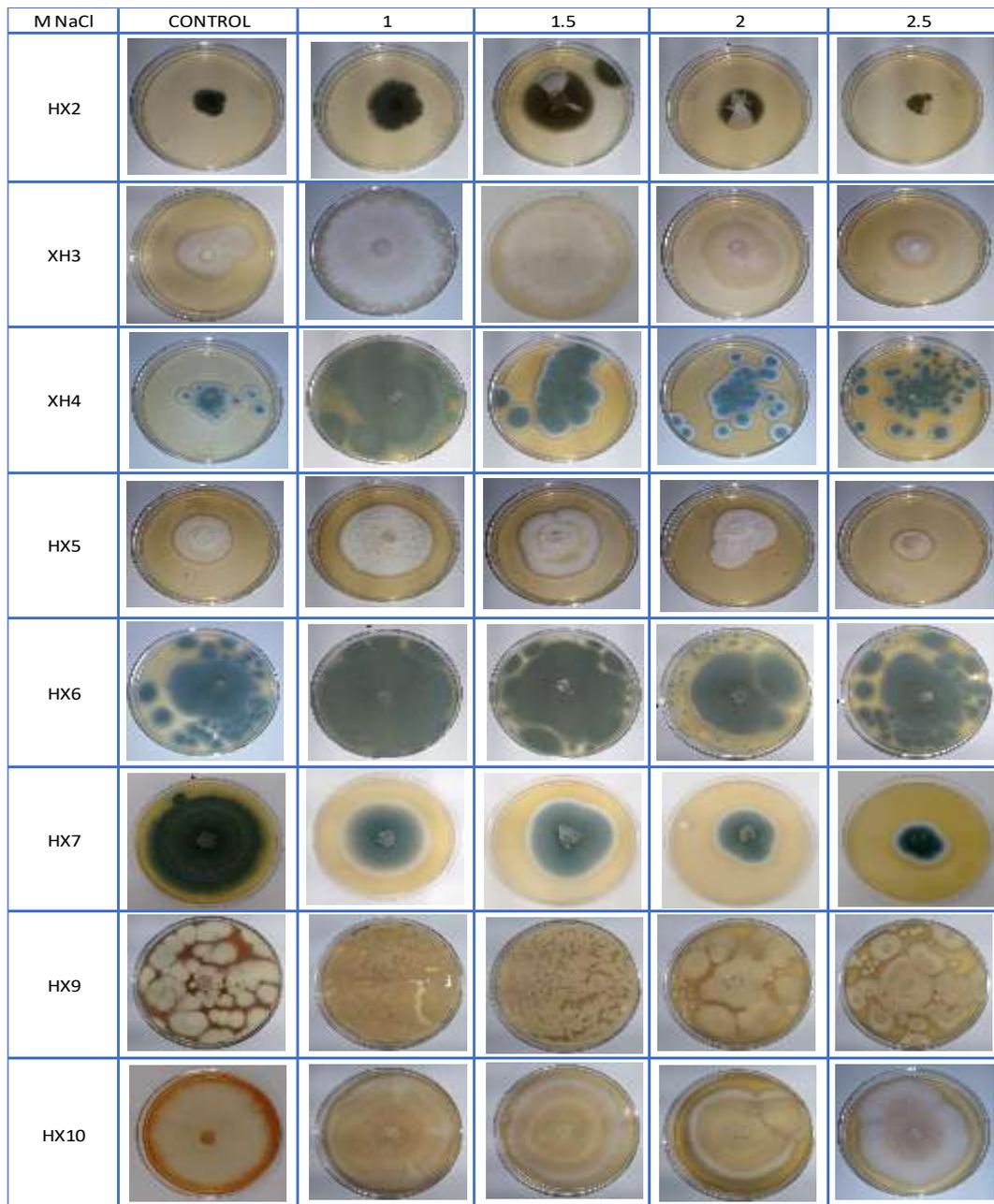
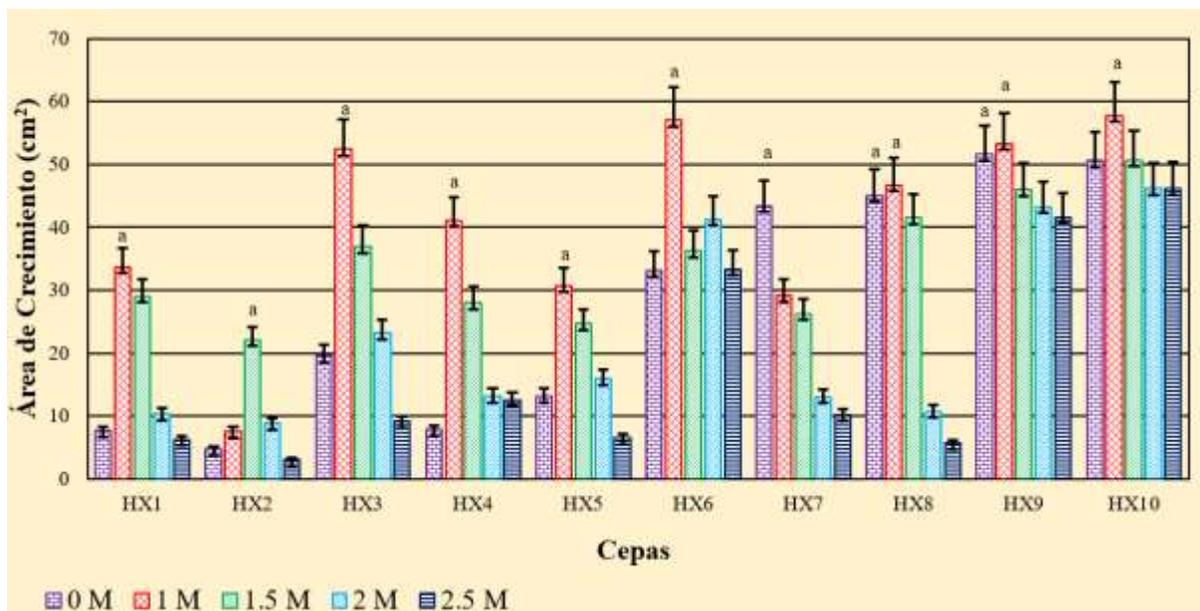


Figura 23: Crecimiento en MEA adicionado con NaCl a diferentes molaridades.

En la figura 24 se muestra el crecimiento de cada cepa, observando que el crecimiento óptimo de las cepas HX1, HX3, XH4, HX5, HX6 y HX10 es a 1 M de NaCl. Para las cepas HX8 y HX9 no existe diferencia significativa entre el crecimiento a las condiciones sin NaCl y al 1 M NaCl. Mientras que la cepa HX2 presenta crecimiento óptimo a 1.5 M NaCl. Y la cepa HX7 presenta una halotolerancia al NaCl, su crecimiento óptimo fue en el medio sin NaCl.

Ninguno de los aislados fúngicos es halófilo obligado ya que todos presentaron crecimiento en el medio sin cloruro de sodio.



^a Medias de crecimiento con diferencia significativa de 5% (prueba “t” de Student) al día 8.

Figura 24: Grafico de caracterización halófila.

4.1.4 Crecimiento xerófilo ($a_w = 0.85$).

La actividad de agua es el índice del agua disponible que puede ser utilizada por los microorganismos en función de la cantidad de solutos (tonicidad de solución). Es la relación entre la presión de vapor de agua del sustrato de cultivo y la presión de vapor del agua pura ($a_w = 1$) [68]. Los hongos capaces de crecer y desarrollar actividad metabólica en medios de baja actividad de agua ($a_w \leq 0.85$) se denominan xerofílicos [68], para crecer en ambientes con baja actividad de agua los hongos incrementan la concentración intracelular de solutos, estos solutos no intervienen con la actividad bioquímica del hongo. Los solutos compatibles suelen ser sustancias bastante hidrosolubles como glicerol, sorbitol y Cloruro de Magnesio $MgCl_2$. En la Figura 25 se muestran las fotografías de las cepas crecidas en MAE al cual se adicionó glicerol, sorbitol y $MgCl_2$, para obtener una a_w teórica de 0.85.

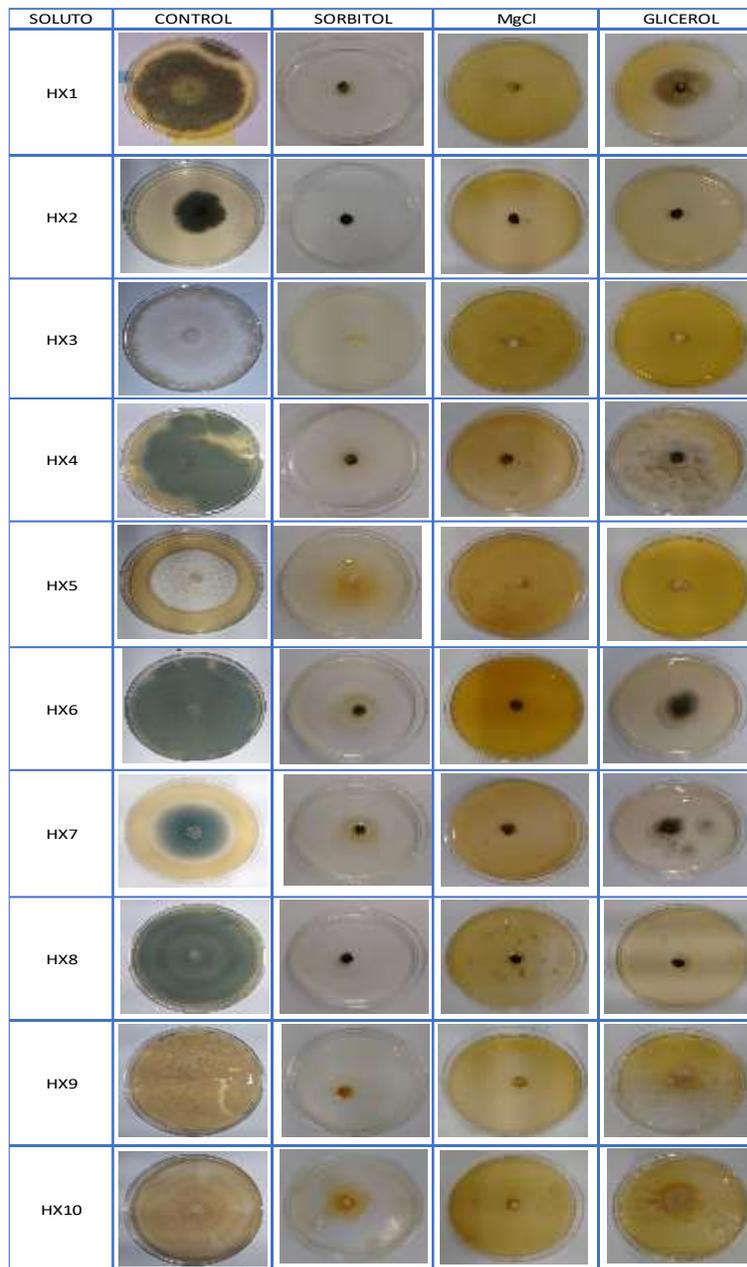
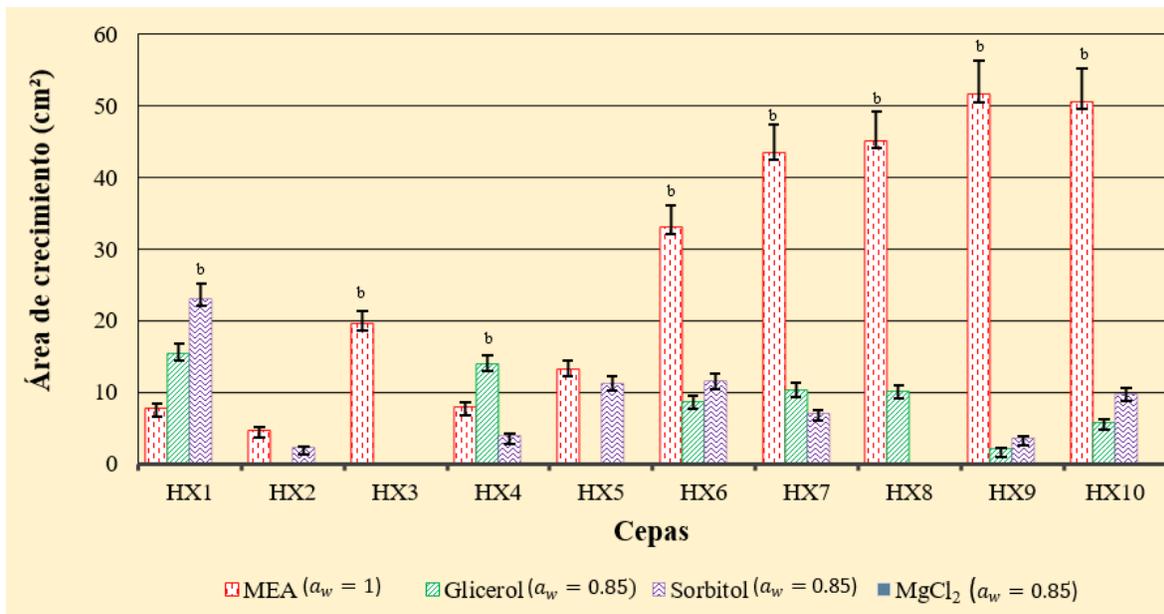


Figura 25: Crecimiento en MEA con una $a_w = 0.85$, usando glicerol, sorbitol y $MgCl_2$.

El mejor crecimiento lo presenta la cepa HX1 en el medio adicionado con sorbitol (25.07 cm^2), la cepa HX6 creció solo en el medio con sorbitol mientras que la cepa HX8 creció solo en presencia de glicerol, la cepa HX3 no tuvo crecimiento en ninguno de los medios. Ninguna cepa presentó crecimiento en el medio adicionado con $MgCl_2$ Como se muestra en la Figura 26.



^b Medias de crecimiento con diferencia significativa de 5% (prueba “t” de Student) al día 8.
 Figura 26: Grafico de crecimiento xerófilo.

La cepa HX1 muestra comportamiento xerófilo en condiciones de sorbitol y $a_w = 0.85$, las cepas HX2 y HX5 no tienen diferencias significativas en su crecimiento entre MEA ($a_w = 1$) y Sorbitol ($a_w = 0.85$). Mientras que la cepa HX4 es xerófila en ambientes con Glicerol ($a_w = 0.85$). En el caso de la cepa HX3 no hubo crecimiento en ninguno de los medios con ($a_w = 0.85$), su crecimiento óptimo se presentó en el MEA ($a_w = 1$). El resto de las cepas HX6, HX7, HX9 y HX10 tuvieron diferencia significativa ($\alpha=0.05$) en el crecimiento en MEA ($a_w = 1$), sin embargo, ambas cepas presentaron un leve crecimiento en medio con actividad de agua teórica de 0.85 en glicerol y sorbitol. Finalmente, la cepa HX8 presentó poco crecimiento 10 cm^2 solo en glicerol, tuvo una diferencia significativa de crecimiento en el MEA ($a_w = 1$) con 45 cm^2 .

4.2 Crecimiento en sangre bobina.

Al proceso de destrucción de glóbulos rojos que conlleva la liberación del contenido intraeritrocitario en el plasma alterando su composición se le llama hemólisis. Este proceso es causado por anticuerpos y sustancias tóxicas como ciertos venenos, sustancias vegetales, enzimas bacterianas o fúngicas [1].

Clasificándose en hemólisis alfa a una destrucción parcial de eritrocitos que produce una coloración verde que se observa alrededor de las colonias (debido a la liberación de un producto de degradación de la hemoglobina llamado biliverdina); la hemólisis beta se refiere a un halo de hemólisis completamente claro y la hemólisis gama se refiere a la ausencia de hemólisis [1].

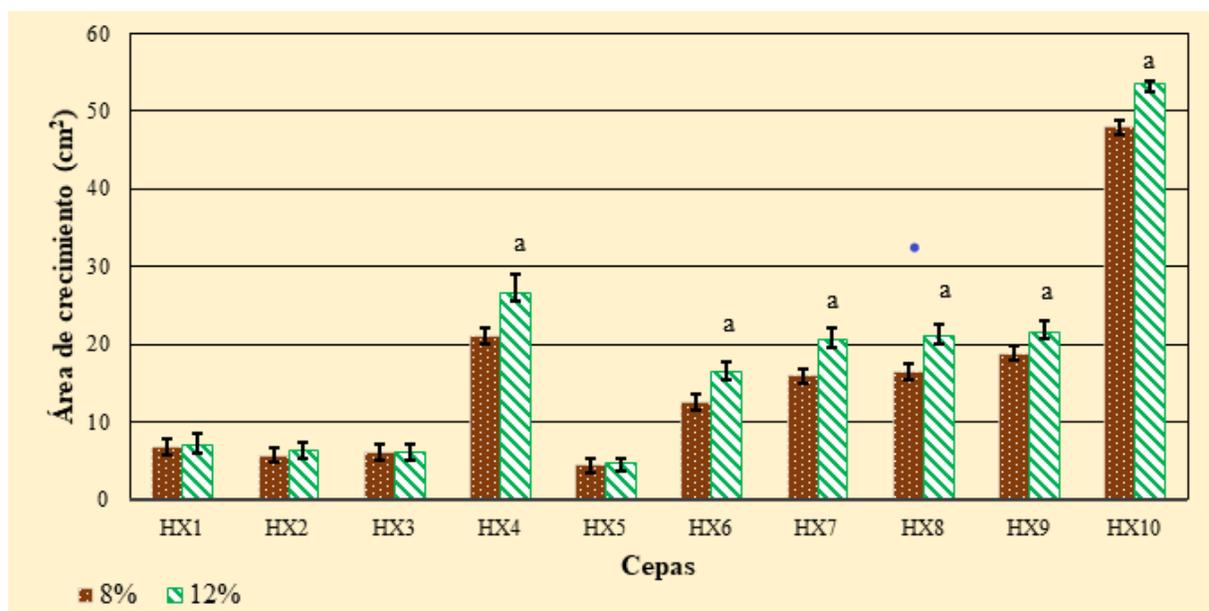
Se muestra en la Figura 27 el crecimiento de las cepas en MM-sangre bovina (8 y 12%) a los días 8 y 21, todas las cepas presentaron crecimiento, pero no todas presentan un rompimiento en los glóbulos rojos de la sangre, las cepas HX4, HX6, HX7 realizan una lisis total como se puede observar en las fotografías el halo de crecimiento es prácticamente transparente, de estas tres cepas se puede apreciar mayor hemólisis en la cepa HX4 la cual presenta la lisis de la sangre desde el día 8. Mientras que la cepa HX10 presenta una lisis parcial al tener un halo verdoso.

Día	8		21	
% Sangre	8	12	8	12
HX1				
HX2				
HX3				
HX4				
HX5				
HX6				
HX7				
HX8				
HX9				
HX10				

Figura 27: Crecimiento en medio mínimo Vogel's suplementado con sangre bovina.

Las cepas que presentaron crecimiento significativo de 5% en el medio suplementado con sangre bovina al 12% y día 8 fueron; HX10 con un área de 54.01 cm^2 , HX4 con 29.55 cm^2 , HX9 con 23.28 cm^2 , HX8 con 22.81 cm^2 , HX7 con 22.43 cm^2 y HX6 con 17.88 cm^2 . En el caso de las cepas HX1, HX2, HX3 y HX5 no presentan crecimiento significativo entre el

medio suplementado al 8% y 12% con sangre bovina. Sin embargo, las cepas HX4, HX6 y HX7 se observa una lisis total de los hematíes de la sangre, la cepa HX10 muestra una lisis parcial con un halo verdoso alrededor de la cepa. La figura 28 muestra la gráfica obtenida en el análisis estadístico.



^a Medias de crecimiento con diferencia significativa de 5% (prueba “t” de Student) al día 8.

Figura 28: Grafico de crecimiento suplementado con sangre bovina al 8% y 12%.

4.2.1 Crecimiento en MM Vogel’s con celulosa, HPAs, gasolina y diésel.

El agua residual generada en los rastros municipales presenta características particulares que dependen de: la optimización del proceso de sacrificio, número y tipo de especie sacrificada y de la cantidad de agua utilizada dentro del proceso [5,6,8,9]. Contiene una variedad de contaminantes como compuestos con celulosa, plaguicidas, hormonas, productos farmacéuticos veterinarios, ácidos grasos etc. los cuales no se encuentran regulados. Por consiguiente, se tiene el conocimiento de su presencia dentro de estas aguas residuales, pero no su cantidad aproximada o real. Así como se conoce la capacidad que presentan los hongos de producir un complejo enzimático con actividad oxidativa contra una amplia variedad de sustancias tóxicas recalcitrantes, que contaminan los cuerpos de agua y suelos [69]. Esta capacidad se debe a la baja especificidad de estas enzimas que les permite oxidar, además de

la lignina, una amplia variedad de compuestos orgánicos contaminantes como tintes, HPAs, fármacos, plaguicidas, pentaclorofenol, etc. [69,70].

Debido a que la carne es uno de los alimentos con mayor demanda por aportar la proteína necesaria para el mejor desarrollo fisiológico, físico y mental en la población mundial. El empleo de los implantes dentro del sistema de producción de carne es una de las prácticas zootécnicas con un mayor grado de adopción gracias a su alta relación costo-beneficio en todos los países cuyo uso está permitido. Estos implantes están constituidos a base de hormonas, algunas de las hormonas más usadas dentro de la ganadería son: compuestos estrogénicos, androgénicos, progestagénicos, tireostáticos, corticos teroides y beta adrenérgicos. Que pueden ser aplicados solos o en mezcla [71, 72, 73]. Estos compuestos tienen como mínimo en su estructura un anillo aromático. Uno de los medicamentos veterinarios utilizados en los animales de abasto son las sulfamidas empleadas como; antibióticos, antiparasitarios y coccidiostáticos (parásitos intracelulares que viven y se reproducen dentro de las células y producen la enfermedad intestinal conocida como coccidiosis), estos fármacos contienen un anillo aromático [74, 75]. Considerando la presencia de anillos aromáticos y la baja especificidad enzimática de los hongos, se tomó en este estudio el benzo [α] pireno y fenantreno formados por cinco y tres anillos aromáticos respectivamente como compuestos modelos para determinar el crecimiento de las cepas en estudio.

Otros componentes del agua residual son los ácidos grasos presentes en el rumen bovino como; ácido málico, ácido fumárico y ácido láctico que son compuestos de cadenas lineales, con enlaces sencillos y dobles [76]. La gasolina y el diésel se componen mayormente de parafinas y olefinas que son compuestos que presentan las mismas características estructurales, debido a ello, se han usado como modelos para evaluar el crecimiento de los aislados fúngicos en estudio [77].

En la Figura 29 se muestra el crecimiento de las cepas en MM con diferente fuente de carbono (algodón, CMC, olote y paja de trigo). Las cepas presentaron mayor crecimiento en el medio adicionado con CMC (2%) y olote (%), crecimiento moderado en paja de trigo (2%), poco y nulo crecimiento en medio adicionado con algodón (2%).

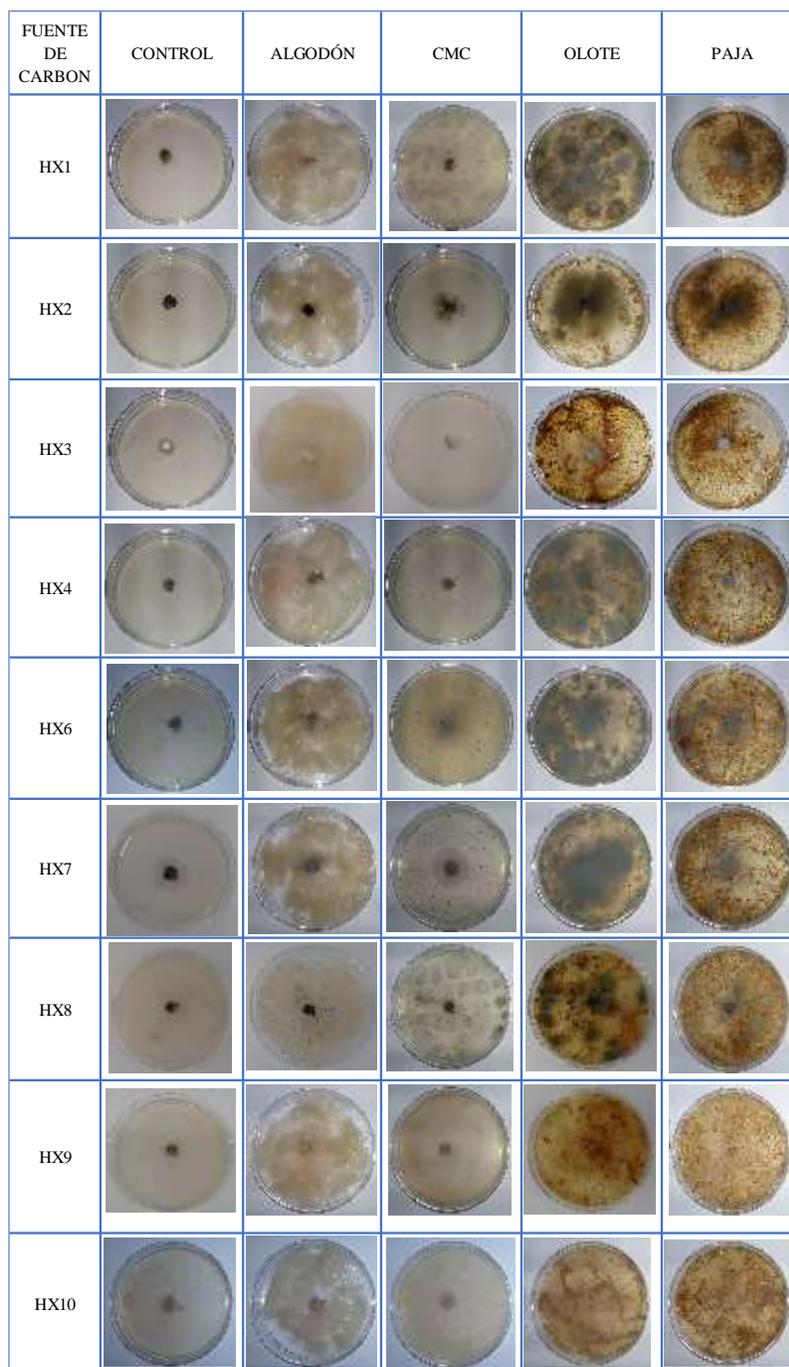


Figura 29: Crecimiento en medio mínimo Vogel's suplementado algodón, CMC, paja de trigo y olote (2%)

En el ensayo con hidrocarburos policíclicos aromáticos (Benzo(a)pireno y Fenantreno) las cepas HX7 y HX10 crecieron en las cuatro concentraciones 50, 100, 200 y 300 ppm. La cepa HX5 presentó crecimiento en 50, 100 y 200 ppm. Mientras que a una concentración de 50 ppm solo se observó crecimiento en la cepa HX6. Las cepas HX1, HX2, HX3, HX4, HX8 y HX9 no presentaron crecimiento a ninguna concentración como se muestra en la Figura 30.

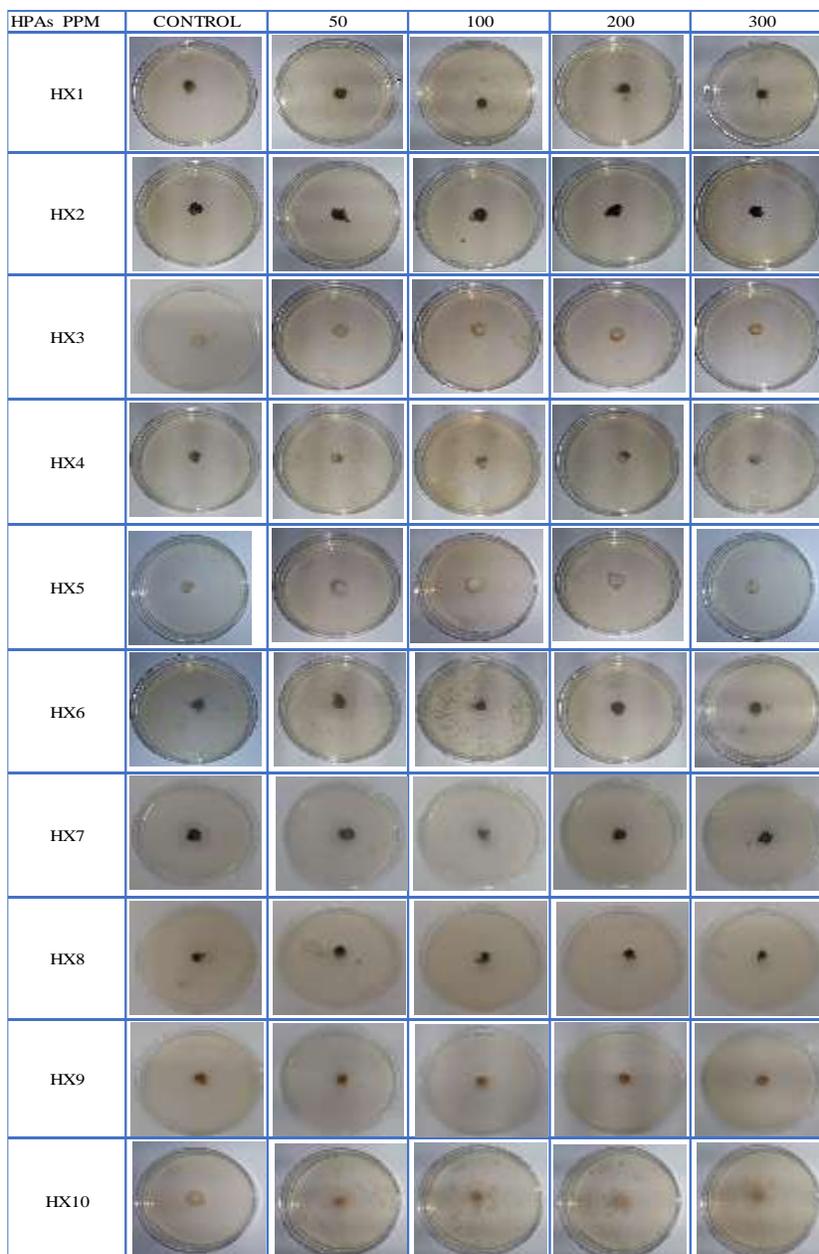


Figura 30: Crecimiento en MM Vogel's con benzo [α] pireno / fenantreno (50, 100, 200 y 300 ppm).

La Figura 31 presenta el crecimiento en presencia de diésel 1% se observa que las cepas HX1, HX3, HX4, HX5, HX7, HX8, HX9 y HX10 tuvieron mayor crecimiento en comparación con diésel 2% y gasolina al 1% y 2%. La cepa HX2 creció más en la condición de gasolina al 1% y la cepa HX6 creció más en diésel 1% y 2%.

%	CONTROL	DIESEL		GASOLINA	
		1	2	1	2
HX1					
HX2					
HX3					
HX4					
HX5					
HX6					
HX7					
HX8					
HX9					
HX10					

Figura 31: Crecimiento en MM Vogel's suplementado con diésel y gasolina (1% y 2%).

El promedio de cada crecimiento se muestra en un Heatmapper (mapa de calor) para los MM Vogel's suplementados con compuestos; algodón, CMC, paja de trigo, olote, benzo [α]pireno/fenantreno, diésel y gasolina (Figura 32). En el cual se muestra la jerarquía de los hongos que tuvieron mayor crecimiento (rojo), menor crecimiento (rojo claro) y nulo crecimiento (blanco).

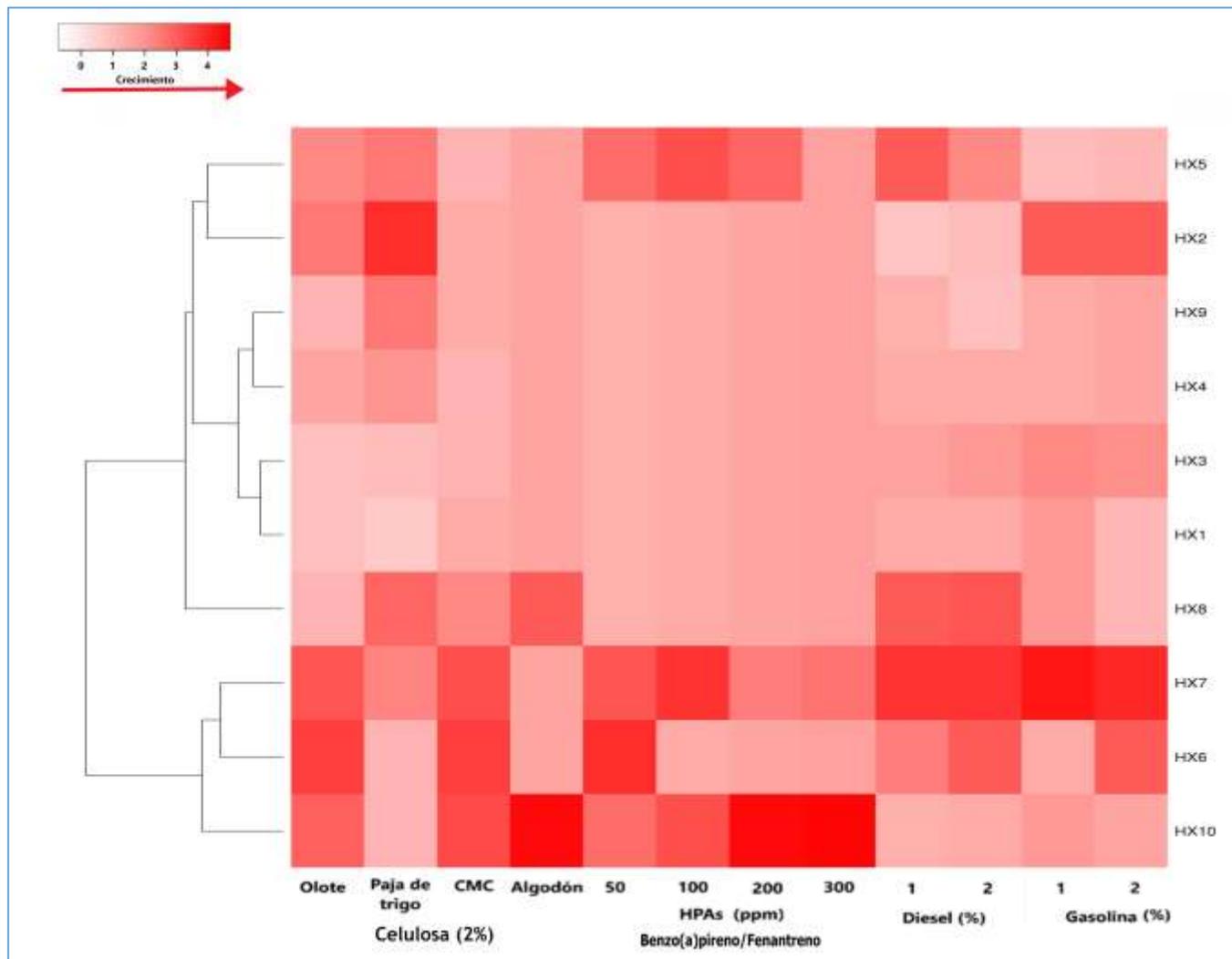


Figura 32: Crecimiento en MM Vogel's con compuestos celulósicos, HPAs, diésel y gasolina.

La cepa HX7 presenta crecimiento en más sustratos principalmente en gasolina 1% y 2%, diésel 1% y 2%, HPAs 50 y 100 ppm, CMC y olote 2%. HX10 creció en HPAs 100, 200 y 300 ppm, algodón, CMC, y olote (2%). HX6 creció en HPAs 50 ppm, CMC y olote (2%),

diésel y gasolina (2%). Las cepas HX1, HX3, HX4 y HX9 presentan crecimiento bajo o nulo en todos los sustratos.

Considerando los resultados obtenidos en los puntos 4.1.3, 4.1.4, 4.2 y 4.2.1 se seleccionaron las cepas HX4, HX6, HX7 y HX10. La cepa HX4 se logró identificar a nivel de género *Aspergillus*, es halófila (1M NaCl), xerófila ($a_w = 0.85$ con glicerol), presentó una lisis total, creció en los ensayos con sustrato paja de trigo y olote. La cepa HX6 se identificó como *Penicillium chrysogenum* (99.66%), halófila (1M NaCl), xerotolerante, presentó una lisis total, crecimiento en gasolina y diésel (2%), en 50 ppm HPAs, CMC y olote (2%).

En el caso de HX7 se identificó como *Aspergillus versicolor* (99.89%), halotolerante y como xerotolerante, presenta crecimiento en diésel y gasolina (1% y 2%), en 100 ppm HPAs, CMC y olote (2%). Finalmente, la cepa HX10 se identificó como *Aspergillus terreus* (99.77%), halófila (1M NaCl), xerotolerante, creció en 100, 200, 300 ppm HPAs, CMC y olote (2%).

4.3 Tratamiento fúngico en agua residual de rastros (prototipo)

Se formuló la composición de 500 mL de agua residual prototipo utilizando agua de grifo, restos orgánicos de la especie bovina (sangre, hígado, pansa, tejido adiposo, tripa, heces y orina), sulfamida y paja de trigo, como se describe en el punto 3.3.10 y en la tabla 10. Se mantuvo la condición de crecimiento a 1M NaCl.

Se midió la DQO en tiempo cero y a los 21 días de tratamiento (28°C a 250 rpm), para evaluar la degradación o remoción de las cepas *Aspergillus sp.*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus versicolor* y *Aspergillus terreus*. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 33.

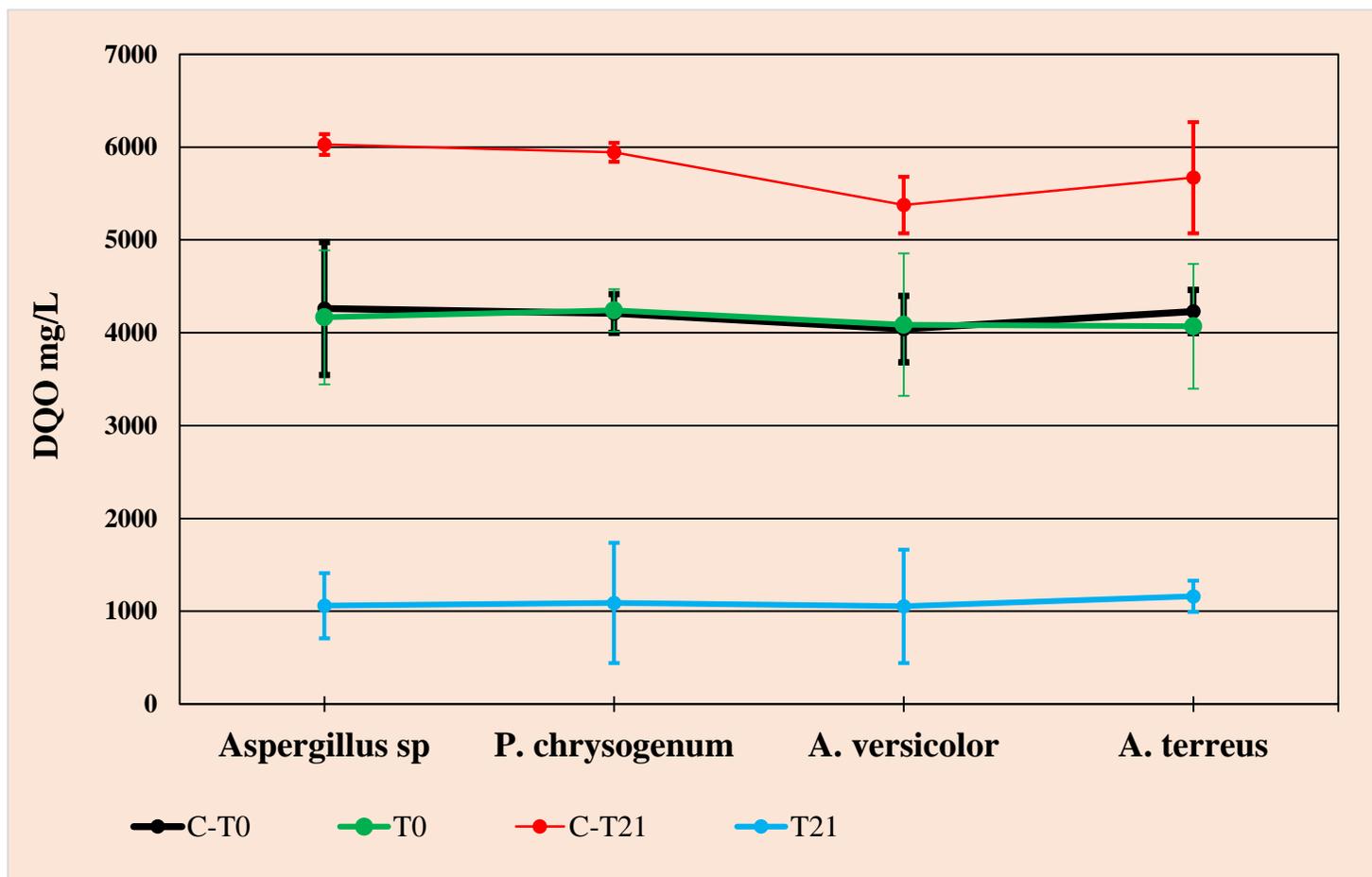


Figura 33: Determinación de DQO en tiempo cero y tiempo 21 días.

Estadísticamente los resultados no presentan una diferencia significativa ($\alpha=0.05$) entre los niveles de DQO para cada cepa, esta fue determinada por un diseño 2^k . C-T0 y C-T21 corresponden al control en tiempo cero y tiempo 21 días respectivamente, el control contiene 1.5 ml de la cepa inactiva correspondiente a cada tratamiento, para determinar la incidencia de algún otro microorganismo que pudiera estar en la composición del agua residual prototipo. Cabe mencionar que antes de inocular el agua con la cepa inactiva, se realizó una siembra en caja Petri con MEA a 1M NaCl, con el fin de asegurar la inactividad total de la cepa. T0 y T21 al tratamiento en tiempo cero y 21 días respectivamente. Como se puede observar en la gráfica C-T0 y T0 son prácticamente iguales, para el día 21 donde se mide la DQO nuevamente, C-T21 inoculado con la cepa inactiva presentó un aumento en el nivel de DQO, esto determina la presencia de microorganismos presentes en el agua que no tienen una incidencia positiva. Mientras que la DQO para T21 presenta una disminución de 75%

aproximadamente para las cuatro cepas, Con *Aspergillus sp.* La DQO disminuyó de 4165.78 a 1059.4 mg/L, *Penicillium chrysogenum* de 4241.04 a 1089.21 mg/L, *Aspergillus versicolor* de 4086.84 a 1053.41 mg/L y *Aspergillus terreus* de 4071.05 a 1150.79 mg/L. La disminución de la DQO en un 75% no es favorable ya que la Demanda Química de Oxígeno sigue siendo bastante alta, para cumplir con la NOM-003-SEMARNAT-1997.

4.3.1 Determinación de actividad enzimática extracelulares

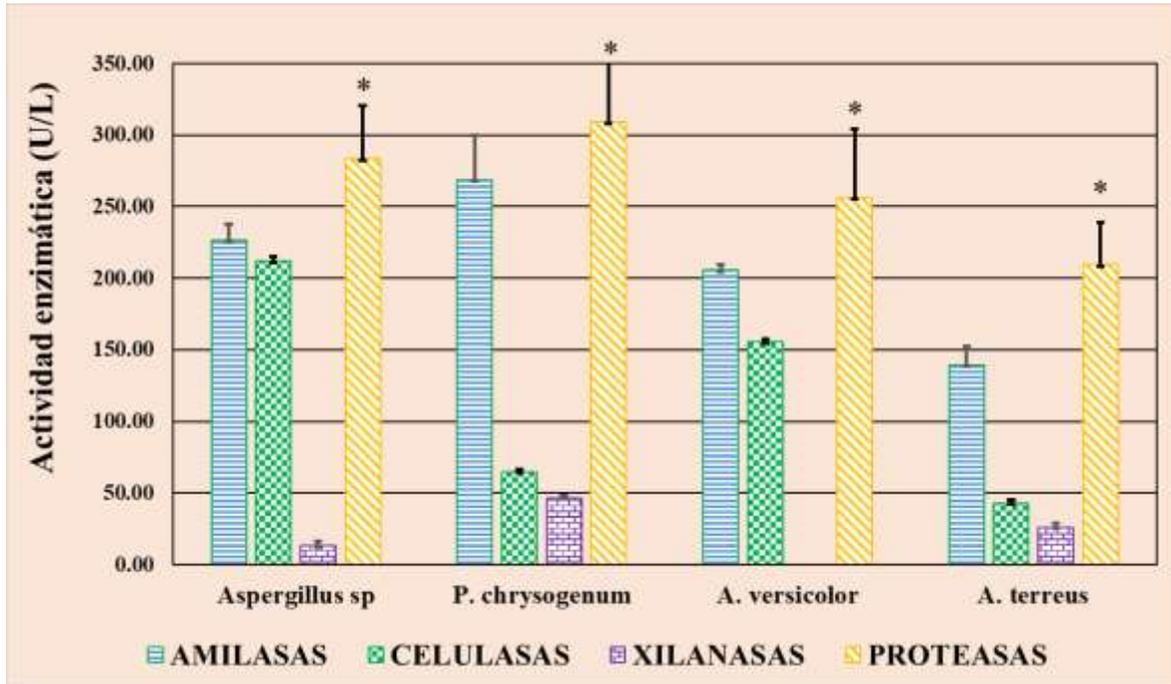
Las actividades enzimáticas extracelulares que se midieron son esterasa, lacasa, lignina peroxidasa, peroxidasa, xilanasas, amilasa, celulasa y proteasa. En la tabla 12 muestra la actividad enzimática de xilanasas, amilasa, celulasa y proteasa en (U/L). En el caso de esterasa, lacasa, lignina peroxidasa y peroxidasa no presentaron actividad.

Tabla 12: Actividades enzimáticas extracelulares cuantificadas en el tratamiento de agua residual de rastro municipal prototipo

Cepas	Enzimas extracelulares (U/L)			
	AMILASAS	CELULASAS	XILANASAS	PROTEASAS
<i>Aspergillus sp.</i>	226.18 ±11.65	212.00 ±3.4	13.27 ±2.97	283.45 ± 36.89
<i>P. chrysogenum</i>	268.78 ±31.09	64.78 ±1.94	46.60 ±1.46	309.16±41.28
<i>A. versicolor</i>	205.57 ±3.88	155.43 ±2.19	–	256.34±48.06
<i>A. terreus</i>	139.61 ±13.08	42.93 ±2.06	25.87 ±3.02	209.57±29.66

Unidades/Litro ± Desviación estándar

En la Figura 34 la actividad enzimática mayor fue la de proteasas, siendo esta significativamente ($\alpha=0.05$) para las cuatro cepas fúngicas. *Penicillium chrysogenum* presentó mayor actividad en xilanasas, amilasa y proteasas con 46.60 U/L, 268.78 U/L y 309.16 U/L respectivamente. En el caso de la cepa *A. versicolor* no presentó actividad xilanasas. Los resultados obtenidos muestran que las cepas *Aspergillus sp.*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus versicolor* y *Aspergillus terreus* tienen actividad metabólica en aguas residuales de rastros municipales, donde el principal contaminante es sangre animal, y generan una disminución del 75% en los niveles de DQO.



* Medias de crecimiento con diferencia significativa de 5% (prueba “t” de Student) al día 8.

Figura 34: Grafico de actividad enzimática en agua residual de rastros municipales (prototipo).

CAPITULO 5. CONCLUSIONES

El resultado obtenido en el presente estudio nos permite concluir que los aislados fúngicos *Aspergillus sp.*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus versicolor* y *Aspergillus terreus* de Baja California , tienen capacidad de remover o de biodegradar contaminantes presentes en el agua residual de rastros municipales en el estado de Morelos, presentan una remoción del 75% de la demanda química de oxígeno, indicador que determina la cantidad de oxígeno necesaria para oxidar toda la materia orgánica y oxidable presente en el agua residual. Si bien la remoción del 75% de los contaminantes no es un tratamiento suficiente para alcanzar los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Las aguas residuales procedentes de los establecimientos destinados al sacrificio y faenado de animales de abasto deben descargar con una DQO de

150 mg/L promedio mensual, 180 mg/L promedio diario y 210 mg/L promedio instantáneo. El agua prototipo tuvo una DQO de 4181.57 mg/L promedio en tiempo cero, un agua residual de rastro real tiene un promedio de 2500 a 4000 mg/L.

Se concluyó la identificación de los aislados fúngicos a nivel especie como *Eurotium amstelodami*, *Aspergillus amstelodami*, *Aspergillus versicolor*, *A. alabamensis* y *A. terreus*, *Cladosporium perangustum*, *Nigrospora osmanthi* y *Penicillium chrysogenum*, y la identificación de tres cepas a nivel género como *Aspergillus*. También se concluye que la caracterización halófila y xerófila es de; *A. versicolor* halotolerante y xerotolerante, *Cladosporium perangustum* halófilo a 1.5M NaCl y xerotolerante, *A. amstelodami* halófilo a 1 M NaCl y xerófilo en sorbitol $a_w=0.85$, *Aspergillus sp.* halófilo a 1 M NaCl y xerófilo en glicerol $a_w=0.85$, el resto de las cepas son halófilas a 1 M NaCl y xerotolerantes. Confirmando que son hongos halófilos y xerófilos lo que les da identidad de microorganismos extremófilos.

En el ensayo biotecnológico se concluye que *Cladosporium perangustum* creció en presencia de olote, paja de trigo gasolina al (2%) y en gasolina 1%. *Aspergillus sp.* tuvo crecimiento en olote y paja de trigo al 2%, en fenantreno/benzo[α]pireno 50, 100 y 200 ppm, en diésel al 1% y 2%. *Penicillium chrysogenum* creció en olote y carboximetilcelulosa al 2%, en fenantreno/benzo[α]pireno 50 ppm, en diésel y gasolina al 2%. *Aspergillus versicolor* presento crecimiento en olote y carboximetilcelulosa al 2%, en fenantreno/benzo[α]pireno 50 y 100 ppm, en diésel gasolina al 1% y 2%. El hongo *Aspergillus alabamensis* solo creció en paja de trigo y algodón al 2% y diésel 1% y 2%. *Aspergillus terreus* creció en olote, carboximetilcelulosa y algodón al 2%, fenantreno/benzo[α]pireno 100, 200 y 300 ppm. El crecimiento es debido a la capacidad que los hongos tienen de utilizar los diferentes sustratos como única fuente de carbono para desarrollarse ya que fueron sembrados en MM Vogel's.

Las cepas fúngicas; *Aspergillus sp.*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus versicolor* y *Aspergillus terreus* presentan actividad extracelular de las enzimas amilasas, xilanasas,

celulasas y proteasas. Las enzimas fúngicas han tenido mucha importancia industrial en las últimas décadas, saber que se tienen producción enzimática en el tratamiento fúngico de las aguas residuales de los rastros municipales puede ser una evidencia de su potencialidad en este tipo de residuos del cual se puede obtener enzimas de interés comercial. Concluyendo que *Penicillium chrysogenum* presentó mayor actividad en xilanasas, amilasas y proteasas, mientras que *Aspergillus sp.* Tuvo la mayor producción de celulasas.

BIBLIOGRAFIA

1. Nayak, A. P., Green, B. J., & Beezhold, D. H. (2013). Fungal hemolysins. *Medical mycology*, 51(1), 1–16. doi:10.3109/13693786.2012.698025
2. Monforte García G, Cantú Martínez PC. ESCENARIO DEL AGUA EN MEXICO: CULCYT-RECURSOS HIDRICOS. Enero-febrero, 2009
3. Jaime Sainz Santamaría y Mariana Becerra Pérez, Los conflictos por agua en México: avances de investigación, Instituto Nacional de Ecología, México, 2006.
4. Boris Graizbord, “Los umbrales del agua: preguntas y desafíos”, en Graizbord, Boris y Arrojo Alejandro, Jesús, (Coords.) El futuro del agua en México, Universidad de Guadalajara, El Colegio de México, México, 2004, p. 75
5. Guerrero E., Jhoniers; Ramirez F., Ignacio. Manejo ambiental de residuos en mataderos de pequeños municipios Scientia Et Technica, vol. X, núm. 26, diciembre, 2004, pp. 199-204
6. Signorini M, Civit S, Bonilla M, Cervates ME (colaboradores) Evaluación de riesgos de los rastros y mataderos municipales. Mexico,D.F., Julio 2006
7. Departamento del Distrito Federal. Plan maestro de agua potable del Distrito federal. CeiDoc de la ÁOT. 1997-2010
8. COFEPRIS. Evaluación de riesgos de los rastros y mataderos municipales. México. 2008: 67.
9. APHA. Standard Methods for the Analysis of Water and Wastewater. 21th edition. American Public Health Association. 2005. Washington DC, USA.
10. INEGI. Directorio de rastros en los cuales la delegación de la SAGARPA tiene conocimiento del arribo y sacrificio de Ganado Bovino y Porcino. 2017.
11. Malina J.F. y Pohland F.G. 1992. Design of anaerobic processes for the treatment of industrial and municipal wastes. Water Quality Management Library Vol. 7. Technomic, 214.
12. Mara D. y Horan N. 2003 The handbook of water and wastewater microbiology. Academic Press, 819.
13. Rodríguez, Jesús, Sosa, Gerardo J., & Garza, Yolanda. (2002). Bioconversión anaerobia como una alternativa para la remoción de DQO contenido en aguas residuales del rastro municipal de la Ciudad de Saltillo, Coahuila, México. *Revista de la Sociedad Química de México*, 46(2), 185-188.

14. Castillo Borges, Elba R., & Bolio Rojas, Alejandra, & Méndez Novelo, Roger I., & Osorio Rodríguez, José H., & Pat Canul, Roberto (2012). Remoción de materia orgánica en aguas residuales de rastro por el proceso de Contactor Biológico Rotacional. *Ingeniería*, 16(2).
15. A. López-López, J. de la Barrera-Fraire, R. Vallejo-Rodríguez. (2007). Acoplamiento de un sistema Anaerobio/Aerobio para el tratamiento de agua residual de rastro. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 4 (2):269 -277, 2008.
16. NORMA Oficial Mexicana NOM-CCA-022-ECOL/1993, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de la industria de matanza de animales y empaqueo de cárnicos.
17. COWI. Cleaner production assessment in meat processing. Consulting Engineers and Planners As. Dinamarca. 2001: 84.
18. Jarauta L., (2005) Digestión anaerobia para tratamiento de residuos orgánicos: estudio de las necesidades para la implantación en Perú. Proyecto de fin de carrera, ETSEIB-UPC.
19. Odegaard H. 1988. Treatment of anaerobically pretreated effluents. *Anaerobic Digestion*, Proc. 5 th Int. Symp. Anaerobic Digestion, E.R. Hall y P. N. Hobson, eds., Pergamon Press, Londres, 225-238.
20. Watanabe, K. 2001. Microorganisms relevant to bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology* 12, 237-241.
21. King, R.B., Long, G.M., Sheldon, J.K. 1997. Practical environmental bioremediation, the field guide. Lewis Publishers, NY.
22. Trent, J. D. 2000. Extremophiles in astrobiology: per Ardua ad Astra. *Gravitational and space biology bulletin*, 13(2), 5–11.
23. H. Peidro Guzmán y RA. Batista García. (2019). Analisis comparativo del transcriptoma del hongo Halófilo *Aspergillus sydowii*-like, creciendo en Bezo [a] pireno y fenantreno en condiciones hipersalinas. *UAEM Cuernavaca Morelos, México*
24. González-Abradelo D, Pérez-Llano Y, Peidro-Guzmán H, Sánchez-Carbente MDR, Folch-Mallol JL, Aranda E, Vaidyanathan VK, Cabana H, Gunde-Cimerman N, Batista-García RA. First demonstration that ascomycetous halophilic fungi (*Aspergillus sydowii* and *Aspergillus destruens*) are useful in xenobiotic mycoremediation under high salinity conditions. *Bioresour Technol.* 2019 May;279:287-296. doi: 10.1016/j.biortech.2019.02.002. Epub 2019 Feb 2.
25. Castillo-Carvajal LC, Sanz-Martín JL, Barragán-Huerta BE. Biodegradación de contaminantes orgánicos en aguas residuales salinas por microorganismos halófilos: una revisión. *Environ Sci Pollut Res Int.*2014; 21 (16): 9578-88. doi: 10.1007 / s11356-014-3036-z. Epub 2014 27 de mayo.
26. Espigares, M. y Pérez, JA. Aspectos sanitarios del estudio de las aguas. Universidad de Granada. Servicio de Publicaciones. Granada. 1985
27. CONAPO, Subdirección General de Programación. «Proyecciones de la Población en México 2005-2050.» México. 2008.
28. Comisión Nacional del Agua, C. Estadísticas del Agua en México. Ciudad de México: InDesign e Illustrator CC. (2016)

29. FCEA, Fondo para la Comunicación y la Educación Ambiental. A. C. «Agua y Medio Ambiente: Un prontuario para la toma de Decisiones. 2015.
30. Comición Nacional del Agua, C. Estadísticas del Agua en México. Ciudad de México: InDesign e Illustrator CC. (2016)
31. NORMA Oficial Mexicana NOM-CCA-003-SEMARNAT/1993, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicios al público.
32. INEGI. Directorio de rastros en los cuales la delegación de la SAGARPA tiene conocimiento del arribo sacrificio de Ganado Bovino y Porcino. 2018.
33. Quiroga, T. G., García, S. J. L., & Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (1994). *Manual para la instalación del pequeño matadero modular de la FAO*. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
34. EC, European Commission. Integrated Pollution Prevention and Control. Reference Document on Best Available Techniques in the Slaughterhouses and Animal By-products Industries. 2005: 433
35. Castillo, R., Montoya, L. y Ruiz, J. Tratamiento Integral de Residuos de Rastro. Ciencia y desarrollo. 2001: 27 (160), 48-53
36. NORMA Oficial Mexicana NOM194SSA12004, Productos y servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de productos.
37. Hamdy, S. y Amal, M. Treatment of Slaughterhouse Waste. Sixth International Water Technology Conference, IWTC 2001, Alexandria, Egypt. 2001: 269-275.
38. Marchaim, U., Levanon D., Danai O., Musaphy, S. y Galilee, M. A Suggested Solution for Slaughterhouse Uses of the Residual Materials after Digestion. Bioresource Technology. 1991: 37, 127-134.
39. KARL-HEINZ R, et al. (2005). Environmental Biotechnology. Concepts and Applications. Industrial - Wastewater Sources and Treatment Strategies. Environmental Biotechnology. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. Pp 49-77.
40. OSM, Organización Mundial de la Salud. Lucha contra las enfermedades transmitidas por el agua en los hogares. Printed in Switzerland. 2007
41. Sandra L. Villafana M. Evaluación Socioeconómica Para Proyectos de Recuperación Ambiental. Caso: Cuenca del río Apatlaco en el Estado de Morelos. Tesis – octubre 2010.
42. Linden G., Lorient D. (1997). Bioquímica agroindustrial: Revalorización alimentaria de la producción agrícola. Editorial Acribia S.A.: Zaragoza (España). 454 p.
43. FAO. (1991). Guidelines for slaughtering, meat cutting and further processing FAO Animal Production and Health paper 91. FAO: Roma.
44. Riojas-Rodríguez, Horacio, Schilman, Astrid, López-Carrillo, Lizbeth, & Finkelman, Jacobo. (2013). La salud ambiental en México: situación actual y perspectivas futuras. *Salud Pública de México*, 55(6), 638-649.
45. Rocha-Gutiérrez, Beatriz Adriana, Peralta-Pérez, María del Rosario, & Zavala-Díaz de la Serna, Francisco Javier. (2015). Global review of the problem of the emerging

- contaminants. PBDEs in Mexico, a particular case. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 31(3), 311-320.
46. Álvaro L. Fajardo-Zapata, Francy J. Méndez-Casallas, Luis H. Molina. (2010). Residuos de fármacos anabolizantes en carnes destinadas al consumo humano. Grupo Salud Pública, Fundación Universitaria del Área Andina, Bogotá, D.C. Colombia.
 47. Alarcón A y Ferrera-Cerrato R. (coordinadores). Biorremediación de suelos y aguas contaminadas con compuestos orgánicos e inorgánicos. Trillas, México, 2013:333.
 48. Verma JP, Jaiswal DK (2016) Reseña de libro: avances en biodegradación y bioremediación de residuos industriales. *Microbiol frontal* 6: 1–2.
 49. Frutos FJG, Pérez R, Escolano O, Rubio A, Gimeno A, Fernandez MD, Carbonell G, Perucha C, Laguna J (2012) Ensayos de remediación para lodos contaminados con hidrocarburos de un proceso de lavado de suelos: evaluación de tecnologías de biorremediación. *J Hazard Mater* 199: 262–271.
 50. Smith E, Thavamani P, Ramadass K, Naidu R, Srivastava P, Megharaj M (2015) Ensayos de remediación para suelos contaminados con hidrocarburos en ambientes áridos: evaluación de técnicas de biopilaje y biopilaje. *Int Biodeterior Biodegradation* 101: 56–65.
 51. Azubuikwe, CC, Chikere, CB y Okpokwasili, GC *World J Microbiol Biotechnol* (2016) 32: 180. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2137-x>
 52. Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. (eds). *Brock Microbiología de los Microorganismos*. Tenth edition. Ed. Pearson-Prentice Hall. Madrid. 2003:741-766.
 53. Demain, A. L. and Adrio, J. L. Contributions of microorganisms to industrial biology. *Molecular Biotechnology*. 2008;38(1): 41-55.
 54. Pant, D., Adholeya, A. 2007. Biological Approaches For Treatment Of Distillery Wastewater: A Review. *Bioresource Technology*. 98: 2321-2334
 55. Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., Nigman, P. 2001. Remediation Of Dyes In Textile Effluent: A Critical Review On Current Treatment Technologies With A Proposed Alternative. *Bioresource Technology*. 77: 247-255
 56. Moredo, N., Lorenzo, M., Dominguez, A., Moldes, D., Camselle, C., Sanroman, A. Enhanced Ligninolytic Enzyme Production And Degrading Capability Of *Phanaerochaete Chrysosporium* And *Trametes Versicolor*. *World Journal Of Microbiology And Biotechnology*. 19: 665-669
 57. Quintero, D., Gumersindo, J., Feijoo, C., Lema, R. 2006 Producción De Enzimas Ligninolíticas Con Hongos Basidiomicetos Cultivados Sobre Materiales Lignocelulósicos. *Vitae*. 13(2): 61-67.
 58. Davila, G., Vázquez, R. 2006. Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. **Mensaje Bioquímico, 30 : 29-55**
 59. Moeller, G.E Y Garzón, M.A., 2003. Desarrollo De Tecnologías No Convencionales Para El Tratamiento De Efluentes De La Fabricación De Colorantes Del Tipo Azo. Anuario Imta.
 60. Fernandez, J., Henao, L. 2007 Utilización De Hongos De Podredumbre Blanca Y Fotocatálisis Homogénea Nanoestructurada Como Alternativa Biotecnológica Para La Degradación Del Negro Reactivo 5. Tesis Pregrado. Microbiología Industrial, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá Colombia.

61. Rothschild L.J., Manicinelli R.L. Life in extreme environments. *Nature*. 2001: 409: 1092-1101.
62. Rossi M., Ciaramella M., Cannio R., Pisan F.M., Moracci M., Bartolucci S. Meeting Review (Extremophiles 2002). *Journal of Bacteriology*. 2003:185; 3683-3689.
63. Van Den Burg B. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinión in Microbiology*. 2003: 6: 1-6.
64. Domsch, K. H., Gams, W y Anderson, T. *Compendium of Soil Fungi*, 2nd edition, IHW Verlag, Eching. 2007. 74.
65. Zak, J.C., and S. Visser. An appraisal of soil fungal biodiversity: the crossroads between taxonomic and functional biodiversity. *Biodiversity and Conservation*. 1996:5:169-183
66. González Hernández JC, Peña A. 2002. Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (Levadura halófila). *Revista Latinoamericana de Microbiología* Vol. 44, No.3-4. Pp 137-156.
67. D. Montgomery. *Diseño y análisis de experimentos*. Editorial Iberoamericana, Estados Unidos. 1991, pp. 589
68. 67Chen, A. J., Hubka, V., Frisvad, J. C., Visagie, C. M., Houbraeken, J., Meijer, M., ... Samson, R. A. (2017). Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Aspergillus* (formerly *Eurotium*), and its occurrence in indoor environments and food. *Studies in mycology*, 88, 37–135. doi:10.1016/j.simyco.2017.07.001
69. 68Pitt JL. Xerophilic fungi and the spoilage of foods of plant origin. In: "Water relations of food" 273-307, R.B. Duckworth (ed.), Academic Press, London, 1975.
70. 69Bumpus JA, Tien M, Wright D, Aust SD. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science* 1985;228(4706):1434-1436
71. 70Arneith W. Hormones in animal production –a health risk for the consumer? *Z Gesamte Inn Med* 1992; 47: 45-7.
72. 71Stephany RW. Hormones in meat: different approaches in the EU and in the USA. *APMIS Suppl* 2001; S357-63; discussion S63-4.
73. 72Angsusingha K, Kenny FM, Nankin HR, Taylor FH. Unconjugated estrone, estradiol and FSH and LH in prepubertal and pubertal males and females. *J Clin Endocrinol Metab* 1974; 39: 63-8.
74. 73Vomend. K.C et al. Interacciones medicamentosas, reacciones adversas y toxicidad de los principales fármacos utilizados en bovino. *Arch.Med.Vet*, XXIV, #1. 1992: pp: 5-24.
75. 74Sumano y Ocampo. *Farmacología Veterinaria*. Segunda Edición. McGraw-Hill Interamericana. 1997. páginas: 92-94.
76. 75MONTROYA, Catalina, & GARCÍA, José Fernando, & BARAHONA, Rolando (2015). CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS EN CARNE DE BOVINOS CEBADOS EN DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUCCIÓN EN EL TRÓPICO COLOMBIANO. *Vitae*, 22(3), undefined-undefined.
77. 76Castillo-Hernández, P., Mendoza-Domínguez, A., & Caballero-Mata, P.. (2012). Análisis de las propiedades fisicoquímicas de gasolina y diesel mexicanos reformulados con Etanol. *Ingeniería, investigación y tecnología*, 13(3), 293-306.

ANEXOS

Anexo 1. Soluciones.

Almidón, Xilano, Celulosa y Caseína.

Se disolvió 0.4g de almidón, xilano, carboximetilcelulosa y caseína de leche respectivamente en 20 mL de Buffer citrato (pH 5).

Carbonato de sodio 0.5 N (Na_2CO_3).

En 120 mL de agua destilada se adiciono 3200 mg de carbonato de sodio

ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) 30mM.

Para una solución al 30 mM, adicionar 164.6 mg de ABTS en 10 mL de agua destilada. Tapar el tubo con papel de aluminio (es fotosensible).

Veranyl alcohol.

Se mezclaron 2.6 μL de líquido puro de veranyl en 10mL de agua destilada.

Peróxido de hidrógeno 0.005%.

En 10 mL de agua destilada se agregó 170 μL de peróxido de hidrógeno al 30%.

Ácido 3,5 dinitro salicílico (DNS).

En 141.6 mL de agua destilada se adiciono: 10.6 g de NaCl, 19.8 g de NaOH, 30.6 g de tartrato de sodio y 0.83 g de malato sodio.

Anexo 2. Preparación de sustrato de Esterasas.

Mezclar 10 mL de PBS al 1X Tritón (0.1 %) más 50 µL de 2-Naftil acetato y 10 µL de Fast Garnet.

- PBS al 1X Tritón: 10 mL de PBS 10X y 100 µL de Tritón en 90 Tritón,
- 2-Naftil acetato: Adicionar 5 mg de 2-Naftil en 500 µL de acetato.
- Fast Garnet: Agregar 10 mg de Fast Garnet en 100 µL de PBS al 1X – Tritón (0.1%) (Se obtuvo al 1X calculando del PBS 10 X preparado en 1 L)
- Buffer fosfato (PBS al 10 X) a pH 7: En 1000 mL de agua destilada mezclar: 80g de NaCl, 2 g de KCl y 14.4 g de Na₂HPO₄. Adicionar al final 0.1% de Tritón.

Anexo 3. Preparación de buffers.

Buffer fosfato pH 6.

Agregar 27.598 g de fosfato monobásico de sodio en 1000 mL de agua destilada, por separado adicionar 53.614 g de fosfato dibásico de sodio en 1000 mL de agua destilada. Preparar en vaso de precipitado 80 mL de los 1000 mL de fosfato monobásico de sodio previamente preparado y adicionar 5.0 mL de los 1000 mL de fosfato dibásico de sodio para obtener 100 mL de volumen total. Se ajusta el pH 6.

Buffer citrato de sodio pH 5.

En 100 mL de agua destilada adicionar 1.47 g de Citrato de sodio. Por separado agregar 0.96 g de Ácido cítrico en 100 mL de agua destilada. Adicionar en vaso de precipitado 60 ml de los 100 ml del citrato de sodio preparado anteriormente, adicionar 40 ml de los 100 ml de ácido cítrico para obtener 100 ml de mezcla final. Ajustar pH a 5.

Buffer tartrato pH 3.

Agregar 4.60 g de dihidrato de tartrato de sodio en 200 mL de agua destilada, por separado adicionar 1.68 mL de ácido tartárico en 200 ml de agua destilada. Posteriormente agregar en

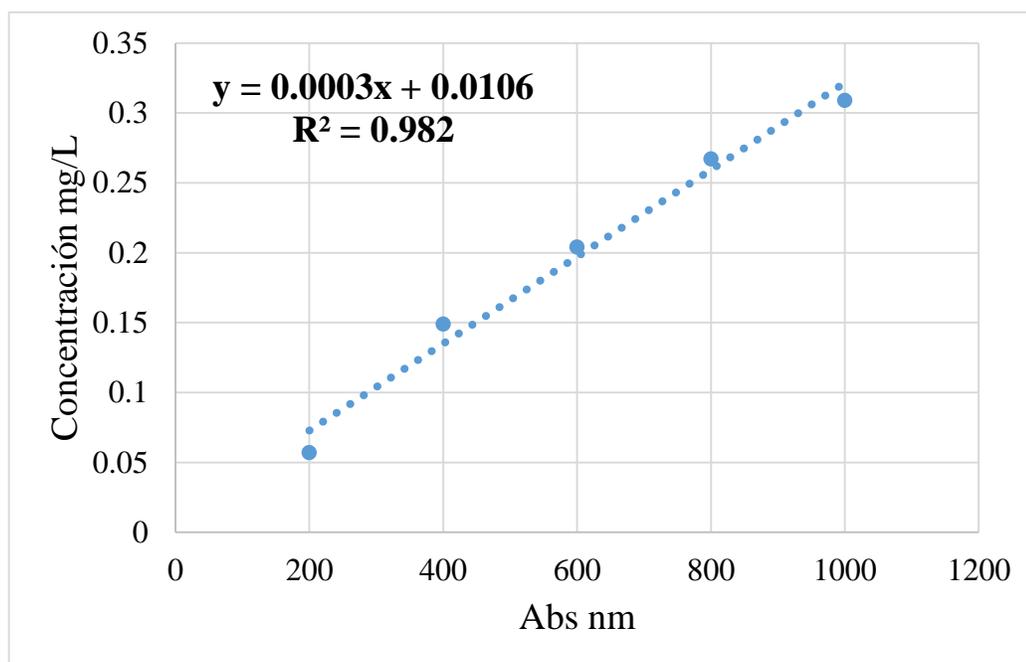
vaso de precipitado 35 ml de los 200 ml de ácido tartárico preparado anteriormente, adicionar 44.1 ml de los 200 ml de dihidrato de tartrato de sodio para obtener 100 ml de mezcla final. Ajustar el pH a 3.

Anexo 4. Curvas patrón para la cuantificación de DQO.

Concentración de curva patrón.

CURVA DE CALIBRACIÓN		
Tubo	Concentración mg/L	Absorbancia nm
1	200	0.057
2	400	0.149
3	600	0.204
4	800	0.267
5	1000	0.309

Grafica de curva patrón.



Anexo 5. Diseño 2^k para tratamiento de agua residual de rastro prototipo.

Tratamiento		Inoculo	Tiempo	DQO (mg/L)
<i>Aspergillus sp</i>	1	-1	-1	4260.51
	2	1	-1	4165.78
	3	-1	1	6028.78
	4	1	1	1059.74
<i>Penicillium chrysogenum</i>	5	-1	-1	4207.88
	6	1	-1	4241.04
	7	-1	1	5944.57
	8	1	1	1089.21
<i>Aspergillus versicolor</i>	9	-1	-1	4039.81
	10	1	-1	4086.84
	11	-1	1	5376.2
	12	1	1	1053.42
<i>Aspergillus terreus</i>	13	-1	-1	4228.93
	14	1	-1	4071.05
	15	-1	1	5670.91
	16	1	1	1160.79

Anexo 6. Niveles de DQO en los tratamientos fúngicos.

Valor de DQO mg/L			
Tiempo		0 días	21 días
Blanco		4181.51 ± 120.8	5439.56 ± 309.51
Control	<i>Aspergillus sp</i>	4260.51 ± 715.2	6028.78 ± 112.29
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	4207.88 ± 209.7	5944.58 ± 103.00
	<i>Aspergillus versicolor</i>	4039.81 ± 356.9	5376.21 ± 304.64
	<i>Aspergillus terreus</i>	4228.93 ± 232.6	5670.92 ± 599.60
Tratamiento	<i>Aspergillus sp</i>	4165.78 ± 723.5	1059.74 ± 352.09
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	4241.04 ± 227.9	1089.21 ± 647.37
	<i>Aspergillus versicolor</i>	4086.84 ± 768.3	1053.42 ± 610.93
	<i>Aspergillus terreus</i>	4071.05 ± 672.2	1160.78 ± 168.34

DQO mg/L ± Desviación estándar.

Anexo 7. Crecimiento fúngico cm².

Crecimiento en presencia de NaCl.

Cepas	Área de crecimiento (cm ²) en presencia de NaCl				
	0M	1M	1.5M	2M	2.5M
<i>A. amstelodami</i>	7.95 ± 0.87	33.93 ± 3.09	31.38 ± 4.83	10.37 ± 0.95	7.15 ± 1.67
<i>Cladosporium perangustum</i>	5.02 ± 0.67	7.75 ± 0.77	22.29 ± 2.04	8.99 ± 0.84	3.57 ± 0.98
<i>Nigrospora osmanthi</i>	19.87 ± 1.84	52.57 ± 4.77	37.08 ± 3.37	23.38 ± 2.13	10.28 ± 2.15
<i>Aspergillus sp.</i>	8.09 ± 0.85	41.24 ± 3.75	28.08 ± 2.55	13.23 ± 1.24	14.10 ± 2.88
<i>Aspergillus sp.</i>	13.38 ± 1.26	30.96 ± 2.82	24.86 ± 2.26	16.14 ± 1.49	7.47 ± 1.73
<i>Penicillium chrysogenum</i>	33.35 ± 3.04	57.07 ± 5.18	36.48 ± 3.31	41.45 ± 3.77	33.60 ± 3.06
<i>A. versicolor</i>	43.58 ± 3.96	29.22 ± 2.65	26.48 ± 2.42	13.20 ± 1.23	13.59 ± 5.94
<i>A.alabamensis</i>	45.28 ± 4.11	47.02 ± 4.28	41.73 ± 3.79	10.88 ± 1.02	6.49 ± 1.46
<i>Aspergillus sp.</i>	51.71 ± 4.69	53.56 ± 4.87	46.17 ± 4.19	43.37 ± 3.94	41.80 ± 3.80
<i>A. terreus</i>	50.72 ± 4.60	57.96 ± 5.26	50.83 ± 4.62	46.19 ± 4.19	46.41 ± 4.22

Área de crecimiento cm² ± Desviación estándar.

Crecimiento con actividad de agua teórica a_w = 0.85

Cepas	Área de crecimiento (cm ²) en a _w =0.85			
	MEA (a _w =1)	Glicerol	Sorbitol	MgCl ₂
<i>A. amstelodami</i>	7.64 ± 1.53	15.34 ± 3.07	22.98 ± 4.60	–
<i>Cladosporium perangustum</i>	4.72 ± 0.95	–	2.27 ± 0.45	–
<i>Nigrospora osmanthi</i>	19.60 ± 3.93	–	–	–
<i>Aspergillus sp.</i>	7.82 ± 1.57	13.87 ± 2.78	3.83 ± 0.77	–
<i>Aspergillus sp.</i>	13.14 ± 2.63	–	11.20 ± 2.24	–
<i>Penicillium chrysogenum</i>	33.12 ± 6.63	8.66 ± 1.73	11.47 ± 2.30	–
<i>Aspergillus versicolor</i>	43.358 ± 8.69	10.36 ± 2.08	6.42 ± 1.39	–
<i>Aspergillus alabamensis</i>	45.08 ± 9.03	10.03 ± 2.01	–	–
<i>Aspergillus sp.</i>	51.55 ± 10.32	1.99 ± 0.40	3.56 ± 0.71	–
<i>Aspergillus terreus</i>	55.76 ± 10.13	6.30 ± 1.14	10.77 ± 1.96	–

Área de crecimiento cm² ± Desviación estándar.

Crecimiento en presencia de sangre bovina.

Área de crecimiento (cm ²) en presencia de sangre bovina		
Cepas	Sangre 8%	Sangre 12%
<i>A. amstelodami</i>	6.79 ± 1.48	6.98 ± 1.96
<i>Cladosporium perangustum</i>	5.70 ± 0.99	6.26 ± 1.21
<i>Nigrospora osmanthi</i>	6.16 ± 0.77	6.05 ± 1.31
<i>Aspergillus sp.</i>	21.00 ± 1.87	26.50 ± 3.05
<i>Aspergillus sp.</i>	4.37 ± 0.46	4.60 ± 0.71
<i>Penicillium chrysogenum</i>	12.58 ± 0.93	16.35 ± 1.52
<i>Aspergillus versicolor</i>	15.52 ± 0.96	20.48 ± 1.95
<i>Aspergillus alabamensis</i>	16.45 ± 0.79	20.98 ± 1.83
<i>Aspergillus sp.</i>	18.84 ± 1.15	21.59 ± 1.69
<i>Aspergillus terreus</i>	47.88 ± 1.57	53.44 ± 0.57

Área de crecimiento cm² ± Desviación estándar.

Crecimiento en presencia de sustratos celulósicos.

Cepas	Área de crecimiento (cm ²) en presencia sustratos celulósicos			
	Olote	Paja de trigo	CMC	Algodón
<i>A. amstelodami</i>	4.03 ± 0.58	0.98 ± 0.16	4.50 ± 0.75	–
<i>Cladosporium perangustum</i>	32.69 ± 2.70	11.51 ± 1.05	5.28 ± 0.48	–
<i>Nigrospora osmanthi</i>	5.37 ± 0.77	1.36 ± 0.23	–	–
<i>Aspergillus sp.</i>	15.91 ± 2.27	5.02 ± 0.84	–	–
<i>Aspergillus sp.</i>	26.36 ± 1.20	7.18 ± 0.34	–	–
<i>Penicillium chrysogenum</i>	50.54 ± 2.71	2.90 ± 0.16	44.79 ± 2.54	–
<i>A. versicolor</i>	43.33 ± 2.66	6.88 ± 0.45	39.45 ± 2.58	–
<i>A. alabamensis</i>	10.86 ± 1.55	7.60 ± 1.27	17.80 ± 2.97	0.98 ± 0.16
<i>Aspergillus sp.</i>	11.41 ± 1.63	7.22 ± 1.20	4.05 ± 0.67	–
<i>A. terreus</i>	40.07 ± 2.76	2.88 ± 0.21	40.05 ± 2.97	1.72 ± 0.13

Área de crecimiento cm² ± Desviación estándar.

Crecimiento en presencia de benzo[α]pireno/fenantreno.

Área de crecimiento (cm ²) en presencia de benzo[α]pireno/fenantreno				
Cepas	50 ppm	100 ppm	200 ppm	300 ppm
<i>A. amstelodami</i>	–	–	–	–
<i>Cladosporium perangustum</i>	–	–	–	–
<i>Nigrospora osmanthi</i>	–	–	–	–
<i>Aspergillus sp.</i>	–	–	–	–
<i>Aspergillus sp.</i>	5.16 ± 1.20	4.93 ± 1.14	4.29 ± 0.99	–
<i>Penicillium chrysogenum</i>	8.91 ± 2.05	–	–	–
<i>A. versicolor</i>	6.55 ± 1.51	5.85 ± 1.35	2.93 ± 0.67	4.08 ± 0.94
<i>A. alabamensis</i>	–	–	–	–
<i>Aspergillus sp.</i>	–	–	–	–
<i>A. terreus</i>	5.29 ± 1.22	5.82 ± 1.34	8.48 ± 1.96	12.04 ± 2.78

Área de crecimiento cm² ± Desviación estándar.

Crecimiento en presencia de diésel y gasolina.

Área de crecimiento (cm ²) en presencia de diésel y gasolina				
Cepas	Diésel		Gasolina	
	1%	2%	1%	2%
<i>A. amstelodami</i>	6.78 ± 1.43	4.28 ± 0.90	1.93 ± 0.41	–
<i>Cladosporium perangustum</i>	1.41 ± 0.30	1.40 ± 0.30	6.23 ± 1.31	4.20 ± 0.32
<i>Nigrospora osmanthi</i>	7.92 ± 1.67	6.05 ± 1.27	3.39 ± 0.71	2.66 ± 0.56
<i>Aspergillus sp.</i>	5.98 ± 1.22	3.41 ± 0.72	1.76 ± 0.37	1.81 ± 0.38
<i>Aspergillus sp.</i>	17.38 ± 2.04	8.49 ± 1.00	–	–
<i>Penicillium chrysogenum</i>	13.35 ± 2.81	13.74 ± 2.89	5.38 ± 1.13	5.05 ± 1.06
<i>A. versicolor</i>	22.05 ± 3.42	17.82 ± 2.76	9.46 ± 1.47	6.44 ± 0.50
<i>A. alabamensis</i>	17.56 ± 2.51	13.66 ± 1.95	2.48 ± 0.35	–
<i>Aspergillus sp.</i>	5.36 ± 1.13	–	1.50 ± 0.32	1.19 ± 0.25
<i>A. terreus</i>	4.97 ± 1.05	3.61 ± 0.76	2.04 ± 0.43	1.44 ± 0.30

Área de crecimiento cm² ± Desviación estándar.