

## Evaluación del consorcio entre *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* y bacterias aeróbicas para remoción de colorantes sintéticos

### Evaluation of the consortium between *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and aerobic bacteria for removal of synthetic dye

Daniela Hernández-Sáenz\*, Cindy Stephanie Puentes-Morales\*\*, Juan Felipe Mateus-Maldonado\*\*\*, Lucas David Pedroza-Camacho\*\*\*\*, Julio Ramírez-Rodríguez\*\*\*\*\*, Claudia Marcela Rivera-Hoyos<sup>1</sup>\*\*\*\*\*, Aura Marina Pedroza-Rodríguez\*\*\*\*\*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v22n1.82735

#### RESUMEN

Los residuos líquidos producidos al elaborar tinciones biológicas contienen mezclas de compuestos químicos y microorganismos, que generan un elevado impacto ambiental si no son tratados adecuadamente. Por esta razón, en el presente trabajo se evaluaron a *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Enterobacter xianfangensis*, *Pseudomonas azotoformans*, *Pseudomonas* sp., *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens*, para el tratamiento de un residuo líquido que contenía colorantes trifenilmetánicos y azóicos, a escala de laboratorio. Inicialmente, se seleccionaron las cepas con menor efecto antagónico y se determinó su potencial para producir las enzimas Lacasa, Manganese Peroxidasa y Lignino Peroxidasa, al emplear sustratos inductores y mezclas de colorantes. Para el consorcio fúngico/bacteriano la disminución de las unidades de color y demanda química de oxígeno fueron del 99 % y 70 % a las 96 h. La remoción de estos parámetros se relacionó con la interacción positiva e incremento de las poblaciones de hongos, bacterias y la producción de enzimas ligninolíticas, obteniendo valores a las 96 h de 7.0 y 14.0 unidades logarítmicas para hongos y bacterias, con unas actividades enzimáticas de 75 U/L, 205 U/L y 0.63 U/L para Lacasa, MnP y LiP, respectivamente. Con el presente trabajo se demostró que con el uso consorcios fúngicos/bacterianos se incrementa la remoción de colorantes y se disminuye el tiempo de proceso. Sugiriendo que estos microorganismos podrían ser evaluados en plantas de tratamiento que integren diferentes unidades de tratamiento para optimizar la remoción de contaminantes con baja biodegradabilidad.

**Palabras clave:** Consorcio fúngico/bacteriano, residuos líquidos de tinciones biológicas, enzimas ligninolíticas.

\* Microbióloga Industrial. Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Suelos, Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Carrera 7 No 43-82. Bogotá, D.C., Colombia. daniela-hernandez@javeriana.edu.co.

\*\* Ingeniero Ambiental y Sanitario. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Ambiental. Universidad de La Salle. Carrera 2 N° 10-70. Bogotá, D.C., Colombia. lpedroza56@unisalle.edu.co.

\*\*\* Microbiólogo Industrial. Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Suelos, Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Carrera 7 No 43-82. Bogotá, D.C., Colombia. juan-mateus@javeriana.edu.co

\*\*\*\* Ingeniero Ambiental y Sanitario. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Ambiental. Universidad de La Salle. Carrera 2 N° 10-70. Bogotá, D.C., Colombia. cpuentes16@unisalle.edu.co.

\*\*\*\*\* MSc. En Ingeniería Ambiental y Sanitaria. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Ambiental. Universidad de La Salle. Carrera 2 N° 10-70. Bogotá, D.C., Colombia. jramirez@unisalle.edu.co.

\*\*\*\*\* PhD en Ciencias. Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Suelos, Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Carrera 7 No 43-82. Bogotá, D.C., Colombia. <sup>1</sup>Autor para correspondencia: claudia-rivera@javeriana.edu.co. Orcid ID: <https://orcid.org/0000-0003-0915-8229>.

\*\*\*\*\* PhD en Ciencias. Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Suelos, Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Carrera 7 No 43-82. Bogotá, D.C., Colombia.

## ABSTRACT

The liquid wastes generated when biological stains are prepared, contain a mixture of chemical compounds and microorganisms, with high environmental impact. For this reason, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Enterobacter xianfangensis*, *Pseudomonas azotoformans*, *Pseudomonas* sp., *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens*, were used to evaluate the treatment of a liquid waste containing triphenylmethane and azo dyes, on a laboratory scale. Initially, the strains with less antagonistic effect among them were selected for their potential to produce enzymes as Laccase, Manganese Peroxidase and Lignin Peroxidase. The enzymatic activity was determined by using inducing substrates and dye mixtures. For fungal/bacterial consortium, the decrease in color, Chemical Oxygen Demand and in Biochemical Oxygen demand was of 99 %, 70 % and 65 % at 96 h, respectively. The removal of these parameters was related to the positive interaction between the populations of fungi, bacteria and the production of ligninolytic enzymes, obtaining values of 7.0 and 14.0 logarithmic units for fungi and total bacteria at 96 h with enzymatic activities of 75 U/L, 205 U/L and 0.63 U/L for Laccase, MnP and LiP. The present work demonstrates that using of fungal/bacterial consortia, the removal of dyes is increased, and the process time is decreased. Suggesting that these microorganisms could be evaluated in treatment plants that integrate different treatment units to optimize the removal of contaminants with low biodegradability.

**Key words:** Fungus/ Bacterial consortium, Synthetic Biological Stains Wastewater and ligninolytic enzymes.

**Recibido:** noviembre 15 de 2019 **Aprobado:** mayo 23 de 2020

## INTRODUCCIÓN

En los centros de investigación, universidades y hospitales, se realizan diferentes tipos de tinciones para identificar microorganismos y sus estructuras. Para elaborarlas se emplean gran variedad de colorantes, mordientes, solventes y agua potable (Fernández *et al.*, 2015). En la mayoría de los sitios estos residuos líquidos se colectan en recipientes especiales, se entregan a una empresa especializada y se realiza su disposición final bajo condiciones controladas. Aunque el manejo es muy satisfactorio, en algunas ocasiones se pueden eliminar por los sifones de los laboratorios, pequeñas cantidades de residuos líquidos coloreados con presencia de microorganismos (García *et al.*, 2017). Estos residuos líquidos se mezclan con el agua residual doméstica y podrían generar un impacto ambiental alto en los cuerpos de agua receptores si no se realiza un tratamiento apropiado (Fernández *et al.*, 2016).

Para el tratamiento de estos residuos líquidos se emplean operaciones y/o procesos unitarios de tipo físico, químico y biológico (Deletze *et al.*, 2015; Fernández *et al.*, 2016). En relación con los tratamientos biológicos se utilizan microorganismos aeróbicos, anaeróbicos o facultativos, los cuales pueden ser procariotas, eucariotas o una mezcla de los dos (Badia-Fabregat *et al.*, 2017). En la mayoría de los casos se generan entre ellos interacciones positivas que permiten mantener la eficiencia del tratamiento bajo condiciones no estériles ya sea con células libres o inmovilizadas (Sharma *et al.*, 2011; Kausik *et al.*, 2014). Adicionalmente, la remoción de estos compuestos químicos se puede incrementar al usar consorcios fúngicos/bacterianos no tradicionales, esto quiere decir que se emplean una o más cepas de hongos

ligninolíticos en cooperación con bacterias aeróbicas productoras de peroxidasas y oxidasas (Badia-Fabregat *et al.*, 2017). La ventaja y diferencial que presentan este tipo de consorcios es que los hongos como *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor*, pueden iniciar la remoción de los colorantes por medio de varios mecanismos. La adsorción a la pared fúngica (adsorbentes naturales), la biotransformación mediada por enzimas como Laccasas (E.C. 1.10.3.2), Manganese Peroxidasas (E.C. 1.11.1.13), Lignino Peroxidasas (E.C. 1.11.1.14), enzimas generadoras de peróxido, y la reacción Fenton de tipo biológico, la cual ha sido reportada como un mecanismo no enzimático implicado en la degradación de lignina y colorantes aromáticos (Arantes *et al.*, 2011; Rivera-Hoyos *et al.*, 2015; Morales-Álvarez *et al.*, 2017; Pollegioni *et al.*, 2015). Otra ventaja que se obtiene al unir más de un hongo ligninolítico con bacterias aeróbicas es que se producen enzimas diferentes, isoformas de una misma enzima y la biomasa fúngica forma pellets de diferente tamaño y forma. Estos pellets y la producción de conidios se convierten en nuevas unidades de propagación que garantizan la estabilización de la biomasa o lodo fúngico/bacteriano activo dentro de los reactores para aguas residuales (Espinosa-Ortiz *et al.*, 2016).

Una vez los hongos ligninolíticos han realizado la biotransformación de los compuestos más complejos y responsables de generar el color, las bacterias aeróbicas pueden continuar con el proceso de oxidación de ciertos anillos aromáticos, formación de intermediarios alifáticos y liberación de iones como productos de la mineralización (Badia-Fabregat *et al.*, 2017). Para esto, las bacterias producen enzimas como mono oxigenasas, dioxigenasas, NADH-DCIP reductasas, tirosinasas, hexano oxidasas, aminopirina N-demetilasa, peroxida-

sas, entre otras (Sharma *et al.*, 2011; Ajao *et al.*, 2011). En este sentido, las bacterias del género *Pseudomonas* y *Bacillus*, han sido ampliamente estudiados, demostrando que son muy eficientes en la remoción de colorantes con diferente estructura química (Sharma *et al.*, 2011; Ajao *et al.*, 2011). Sin embargo, el uso combinado de *P. ostreatus*, *T. versicolor*, *Enterobacter xianfangensis*, *Pseudomonas azotoformans*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens*, podría ser una alternativa novedosa.

Por esta razón, el objetivo del presente estudio fue evaluar un consorcio fúngico/bacteriano, para establecer su potencial de remoción a escala de laboratorio y bajo condiciones no estériles, empleando un residuo líquido sintético que contenía colorantes trifenilmetánicos y azoicos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Microorganismos y producción de inóculos*

*Pleurotus ostreatus* (HPB/P3), *Trametes versicolor* (HPB/T2), *Enterobacter xianfangensis* (CB1), *Pseudomonas azotoformans* (CB2), *Pseudomonas sp.* (CB3), *Bacillus subtilis* (CB4) y *Pseudomonas fluorescens* (CB5), pertenecen a la colección de microorganismos de la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Los hongos se reactivaron en agar extracto salvado de trigo (AEST) según Morales-Álvarez *et al.* (2016) y las bacterias se reactivaron a partir del banco de cepas primario en agar nutritivo siguiendo la metodología de Meza *et al.*, (2004). Los pellets de biomasa de *P. ostreatus* (CF1) y *T. versicolor* (CF2), se produjeron en caldo extracto salvado de trigo (CEST) empleando Erlenmeyers de 250 mL que contenían 100 mL de medio y 7 discos de agar con micelio fúngico. Los hongos se cultivaron por 7 días a 30 °C y 120 rpm, en un agitador horizontal termostático New Brunswick™ Innova® 44. Para las bacterias se prepararon suspensiones con solución salina al 0.85 % (m/v) y se mezclaron en proporciones iguales para obtener la misma concentración de cada una de ellas (1x10<sup>8</sup> células/mL). Se tomaron 40 mL de biomasa pelletizada de cada hongo y se homogenizaron mecánicamente empleando una licuadora estéril marca Oster por 2 minutos. A esta mezcla se le adicionó 1.0 mL de la suspensión de bacterias y nuevamente se homogenizó por 2 minutos. El inóculo se empleó para inocular los reactores de 1 L.

### *Pruebas de interacción fúngica y bacteriana*

Para evaluar si los hongos y las bacterias podían unirse para formar un consorcio se realizaron pruebas de interacción bacteria-bacteria y hongo-bacteria. Las pruebas de interacción entre bacterias se desarrollaron siguiendo

las metodologías reportadas por Barrera *et al.*, (1999) y Angulo-Cortés *et al.*, (2012), a las cuales se les realizaron modificaciones: Se prepararon suspensiones de cada una de las bacterias en solución salina al 0.85 % (m/v) con una concentración de 1x10<sup>6</sup> UFC/mL. Posteriormente, se sembró en superficie 0.1 mL de cada una de ellas en agar BHI y se colocaron 4 anillos de plástico estériles de 1.0 cm de alto x 0.5 cm de diámetro. A continuación, se adicionaron 100 µL de la bacteria a enfrentar con la que se sembró de forma masiva en el agar BHI. La formación de halos de inhibición en milímetros en la zona aledaña al anillo se consideró como prueba de interacción positiva. Como control negativo se utilizó solución salina al 0.85 % (m/v), las cajas se incubaron por 48 horas a 30 °C en una incubadora Memmert® y se determinó por triplicado el halo de inhibición en milímetros (mm).

En relación con los hongos se sembró en superficie 0.1 mL de cada una de las bacterias a evaluar (1x10<sup>6</sup> UFC/mL) en agar Papa Dextrosa sin acidificar (PDA). Posteriormente, se sembró un disco de agar PDA de 5 mm que contenía micelio fúngico en el centro de la caja. Como control de crecimiento se sembró sólo a *P. ostreatus* y *T. versicolor* en agar PDA, todas las cajas se incubaron por 8 días a 30 °C en una incubadora Memmert® y se realizaron mediciones a los 8 días. Como variable de respuesta se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial empleando la Ec. 1.

$$\% \text{ ICM} = \frac{(\text{CML} - \text{CMLb})}{(\text{CML})} \times 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde: % ICM corresponde al porcentaje de inhibición del crecimiento micelial, CML es el crecimiento micelial libre en milímetros, y CMLb es el crecimiento micelial influenciado por la bacteria en milímetros.

### *Determinación de actividad enzimática en presencia de inductores y colorantes sintéticos*

Se realizó un experimento a escala de Erlenmeyer de 250 mL para establecer si los hongos y las bacterias tenían actividades enzimáticas como Lacasa y peroxidasas. Los hongos y las bacterias se cultivaron por separado en medio mínimo compuesto por: Glucosa 0.5 g/L, triptosa 0.05 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/L, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.250 g/L, CaCl<sub>2</sub> 0.05 g/L y 10 mL/L de una solución de elementos traza (MnSO<sub>4</sub> 0.5 g/L, FeSO<sub>4</sub> 0.1 g/L, ZnSO<sub>4</sub> 0.1 g/L y CuSO<sub>4</sub> 0.1 g/L). A este medio se le adicionó ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), 2,6-dimetoxifenol (DMP) y veratril alcohol (VA), en una concentración de 10 mg/L para cada inductor y con un pH final 6.8. Cada uno de los recipientes se

inoculó con 10 % (v/v) de biomasa viable (pelletizado fúngico homogenizado o suspensión bacteriana) y se incubaron por 3 días a 30 °C y 120 rpm, en un agitador horizontal termostataado New Brunswick™ Innova® 44. Posteriormente, los sobrenadantes se recuperaron por centrifugación a 9000 x g por 20 minutos a 4 °C en una centrifuga refrigerada Sorvall y se cuantificaron las enzimas Lacasa, Manganese Peroxidasa y Lignino peroxidasa. La viabilidad de la biomasa se determinó por triplicado sembrando los hongos en agar EST y midiendo el crecimiento radial a los 8 días a 30 °C. Para las bacterias se realizaron diluciones decimales y siembra por micro gota en agar BHI (Martínez *et al.*, 2013).

La actividad Lacasa se determinó siguiendo la oxidación del ABTS 5 mM empleando el protocolo de Tinoco *et al.*, (2001) y Rivera-Hoyos *et al.*, (2015) definiendo la unidad enzimática como la cantidad de enzima necesaria para realizar la oxidación de 1 μmol de ABTS por minuto. La actividad Manganese Peroxidasa se evaluó por la oxidación del 2,6-Dimetoxifenol 10 mM, la unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima que se necesita para realizar la oxidación de 1 μmol de 2,6-DMP por minuto (Santoyo *et al.*, 2008). La actividad Lignino Peroxidasa se evaluó por la oxidación del Veratril Alcohol (VA) 10 mM a veratril aldehído y la unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para la oxidación de 1 μmol de VA por minuto (Tien y Kirk, 1983). Para leer las absorbancias de las muestras y convertirlas en actividad enzimática se utilizó un espectrofotómetro Genesis 20®.

#### *Pruebas de decoloración en medio sólido*

La capacidad para decolorar los colorantes sintéticos sin ningún suplemento de carbono y nitrógeno se evaluó por triplicado preparando agar colorante (Cristal Violeta, Rojo Congo, Fuscina de Gram y Verde Malaquita a 10 mg/L con 15 g/L de agar a pH 6.8 ± 0.2). Los hongos se sembraron colocando un disco de agar de 5 mm de diámetro que contenía micelio fúngico en la parte central de la caja. Las cajas se incubaron durante 8 días a 30 °C empleando una incubadora Memmert®. Al finalizar el tiempo de incubación se midió el crecimiento del micelio en mm y se determinó el porcentaje de decoloración, empleando la Ec. 2.

$$\% \text{ Decoloración} = \frac{(A \times b)}{(100)} \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde: A equivale a los 50 mm del diámetro de la caja de Petri. B es el halo de decoloración en mm generado por el hongo, y 100 corresponde al 100 % o máximo de

decoloración a obtener bajo las condiciones del ensayo que fue equivalente a 50 mm.

Para evaluar el crecimiento y decoloración de las bacterias, se sembraron 10 μL de cada una de ellas en el mismo agar colorante en la parte central de la caja. Se cultivaron por 8 días a 30 °C en una incubadora Memmert® y al finalizar el tiempo de incubación se determinó un índice de crecimiento y decoloración (ICD) empleando una escala adimensional de 0 a 10. Donde un índice de 10 equivale a una cepa con crecimiento, adsorción del colorante y decoloración; 7.5 indicó que la bacteria creció en el agar, adsorbió el colorante, pero no se evidenció decoloración; 5.0 correspondió solamente al crecimiento, sin adsorción, ni decoloración; y finalmente, los índices con valores de cero indicaron que la bacteria no creció, no adsorbió colorante, ni decoloró los colorantes a los 8 días de observación.

#### *Identificación Molecular*

Se realizó la identificación molecular de tres bacterias empleando herramientas moleculares. Cada una de ellas se reactivó por aislamiento en agar BHI y se cultivaron por 24 horas a 30 °C. A partir de las colonias aisladas se realizó el aislamiento y purificación del DNA, amplificación por PCR (C1000™ Thermal Cycler, Bio-Rad) de la región ribosomal 16S de un tamaño de 1465 pb, purificación de los fragmentos de PCR y secuenciación con los indicadores 27F, 517F, 800R, 1492R del gen ribosomal 16S. Posteriormente, se realizó limpieza manual de cada una de las secuencias de los fragmentos obtenidos, ensamblaje de las secuencias y obtención de la secuencia problema. El análisis taxonómico de la secuencia problema ensamblada, se realizó mediante la comparación contra las bases de datos NCBI (*National Center For Biotechnology Information*) Greengenes (*Laurence Berkeley National Laboratory*) y RDP (*Ribosomal Database Project*). Finalmente, se realizó el alineamiento y generación de los árboles de distancias utilizando las secuencias con mayor similitud a la secuencia problema y la clasificación taxonómica de la secuencia consenso (datos no mostrados).

#### *Experimentos de remoción empleando residual líquido sintético*

##### *Muestreo y caracterización del agua residual real para diseñar el residuo líquido sintético*

Se realizaron muestreos puntuales de los residuos líquidos generados en 4 laboratorios de docencia en los que se realizan coloraciones de Gram y coloraciones especializadas para observar esporas y cápsula bacteriana. A cada muestra se le determinaron los valores de demanda química de oxígeno (DQO) (Método 5210B) (APHA, 2012), demanda bioquímica de oxígeno al quinto día

(DBO<sub>5</sub>) (Método respirométrico) (Martínez *et al.*, 2013), relación de tratabilidad (DBO<sub>5</sub>/DQO), unidades de color (UC) (Livernoche *et al.*, 1983; Pallerla *et al.*, 1997), pH, conductividad (determinada por conductivímetro), sólidos suspendidos totales (Método 2540D) (APHA, 2012) y recuento de *Escherichia coli* (Log<sub>10</sub> de UFC/mL) como indicador de contaminación fecal (Martínez *et al.*, 2013). Tomando como base la caracterización de cada uno de los lotes, se preparó un nuevo residual líquido sintético (RLS) que simuló los valores promedio y permitió controlar las concentraciones iniciales en los experimentos de remoción.

El RLS estaba compuesto por una mezcla de Cristal violeta (CV), Verde de malaquita (VM), Rojo Congo (RC) y Fucsina de Gram (FG) a una concentración de 10 mg/L en una proporción de 1:1:1:1, inductores enzimáticos (MnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 1 mM y CuSO<sub>4</sub> 7.5 mM), carbono y nitrógeno de fácil asimilación (Glucosa 0.5 g/L y Cloruro de amonio 0.05 g/L). El pH final fue de 6.8 ± 0.2, de tal manera que se favoreciera tanto el crecimiento de las bacterias como de los hongos.

#### Experimentos de remoción en función del tiempo

Se evaluaron 3 tratamientos que se presentan a continuación: T<sub>1</sub>: Consorcio fúngico/bacteriano. T<sub>2</sub>: *P. ostreatus* y *T. versicolor* y T<sub>3</sub>: Solo las bacterias (*Enterobacter xianfangensis*, *Pseudomonas azotoformans*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens*). Como control absoluto se empleó el RLS sin inocular ningún microorganismo y como control de adsorción se realizó el mismo montaje que para los tratamientos, pero la biomasa se inactivó en autoclave por 15 minutos a 121 °C. Los experimentos se realizaron por triplicado empleando recipientes de un litro con 0.8 L de RLS como volumen efectivo de trabajo. Cada reactor tenía dos puertos de entrada (inoculación y aireación) y dos puertos de salida (muestreo de RLS y salida de gases). La aireación y mezcla se realizó por inyección de aire en profundidad empleando difusores cilíndricos porosos (3 mm de diámetro de poro) instalados en la parte inferior y central del reactor. El aire se suministró con aireadores eléctricos (con capacidad para alimentar 1 L/min). Cada reactor se inoculó con 10 % (v/v) de biomasa de acuerdo con cada uno de los tratamientos y controles a evaluar. La temperatura promedio fue de 20 °C ± 3.0. Se realizaron muestreos periódicos hasta completar 96 h para observar los cambios asociados con pH, DQO, recuento de hongos, bacterias (expresados como Log<sub>10</sub> de unidades formadoras de colonia por mililitro), actividades enzimáticas (Lacasa, MnP y LiP) y unidades de color. Para determinar este parámetro, las muestras se centrifugaron a 9000 x g por 10 minutos a 4 °C en una centrifuga refrigerada Sorvall. Se recuperaron

los sobrenadantes iniciales y los correspondientes a cada punto de muestreo. Con la muestra inicial se realizó un barrido UV/VIS (200-700 nm) empleando un espectrofotómetro Genesis 20®, para determinar en la región visible la longitud de máxima absorción para el RLS. La cuál se utilizó para medir la absorbancia de cada uno de los puntos de muestreo y determinar las unidades de color utilizando la Ec. 3.

$$UC = \frac{A_1 \times 500}{0.132} \text{ (Ec. 3)}$$

**Donde:** A<sub>1</sub> es absorbancia a la longitud de onda a la cual la absorbancia fue máxima para RLS y 0.132 es la ABS<sub>465nm</sub> de una solución estándar de platino-cobalto a 500.00 CU (Livernoche *et al.*, 1983).

Una vez de determinaron las unidades de color con estos valores se calculó el porcentaje de remoción de las unidades color empleando la Ec. 4.

$$RUC (\%) = \frac{UC_i - UC_f}{UC_i} \times 100 \text{ (Ec. 4)}$$

**Donde:** RUC es remoción de unidades de color en porcentaje. UC<sub>i</sub> son las unidades de color iniciales. UC<sub>f</sub> son las unidades de color finales (Fernández *et al.*, 2015).

#### Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza y una comparación entre cepas mediante una prueba de Tukey para seleccionar las cepas con menor efecto antagónico y capacidad de decoloración en medio sólido. Para los experimentos de remoción se realizó una comparación entre los tratamientos T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub>, a las 96 horas. Adicionalmente, se realizaron análisis de correlación de Pearson teniendo en cuenta las 96 horas de proceso. Los datos se analizaron empleando el programa estadístico SAS 9.0, usando un nivel de significancia para todas las pruebas del 5 % (α=0.05).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Pruebas de interacción fúngica y bacteriana

Uno de los principales inconvenientes al emplear consorcios fúngicos y bacterianos para el tratamiento de aguas residuales, es que los hongos pueden ser inhibidos por las bacterias a través de diferentes mecanismos (Morato *et al.*, 2014; Badia-Fabregat *et al.*, 2017). Por esta razón, en el presente estudio se realizaron pruebas de interacción *in vitro* antes de evaluar la eficiencia de los hongos y las bacterias en la remoción de unidades de color y DQO, presentes en el RLS. Se observaron diferencias significativas entre cepas (p<0.0001). El pri-

mer grupo (letra a) fueron las cepas CB1 (*Enterobacter xiangfangensis*) y CB2 (*Pseudomonas azotoformans*), con halos de inhibición de 2.0 y 4.0 mm de diámetro sobre las cepas CB4 (*Bacillus subtilis*) por *E. xiangfangensis* y CB1 por la cepa de *P. azotoformans*. El segundo grupo (letra b) contenía a todas las bacterias que no generaron inhibición sobre las demás destacándose las cepas CB3 (*Pseudomonas* sp.), CB4 (*Bacillus subtilis*) y CB5 (*Pseudomonas fluorescens*), (Tabla 1). Siguiendo la metodología reportada por Angulo y colaboradores en el 2012, ninguna de las cepas generó halos de inhibición superiores a 5.0 mm y por lo tanto ninguna fue excluida del estudio (Angulo-Cortés *et al.*, 2012).

Al analizar los resultados de enfrentamiento bacteria/hongo se observó que las cepas CB1 y CB4 solamente generaron una inhibición en el crecimiento micelial del 3.0 % y 5.0 % sobre *T. versicolor* a los 8 días de evaluación. *P. ostreatus* no fue inhibido por ninguna de las bacterias obteniendo porcentajes del 0 % (Tabla 1). Los

porcentajes obtenidos fueron bajos determinando que los dos hongos podrían unirse a las cinco bacterias.

En relación con las tres cepas bacterianas que generaron baja inhibición, se estableció que pertenecen a los géneros *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Bacillus*. Las tres han sido empleadas como controladores biológicos en suelos, por la producción antibióticos (pirrolnitrina, 2,4-diacetilfloroglucinol, piocianina y el ácido fenacín-1-carboxílico), bacteriocinas y sideróforos (Santoyo *et al.*, 2010). Aunque estas sustancias no han sido reportadas recientemente en el tratamiento de aguas residuales, en el presente estudio se implementaron dos estrategias para tratar controlar su posible efecto negativo. Se adicionó mayor cantidad de biomasa fúngica en relación con la biomasa bacteriana y se disgregó el micelio fúngico, para incrementar el área superficial de contacto.

Las bacterias que no generaron halos de inhibición pudieron desarrollar interacciones positivas no obligadas

**Tabla 1.** Inhibición en mm para bacterias e inhibición del crecimiento micelial para hongos.

<b>Interacción Bacteria/Bacteria. Halos de Inhibición (mm)</b>					
<b>Cepas sembradas de forma masiva</b>	<b>Cepas sembradas en los pozos</b>				
	CB1 <i>Enterobacter xiangfangensis</i>	CB2 <i>Pseudomonas azotoformans</i>	CB3 <i>Pseudomonas</i> sp.	CB4 <i>Bacillus subtilis</i>	CB5 <i>Pseudomonas fluorescens</i>
CB1 <i>Enterobacter xiangfangensis</i>	0 <sup>b</sup>	4.0±0.9 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
CB2 <i>Pseudomonas azotoformans</i>	0 <sup>b</sup>	0	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
CB3 <i>Pseudomonas</i> sp.	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
CB4 <i>Bacillus subtilis</i>	2.0±0.5 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
CB5 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>

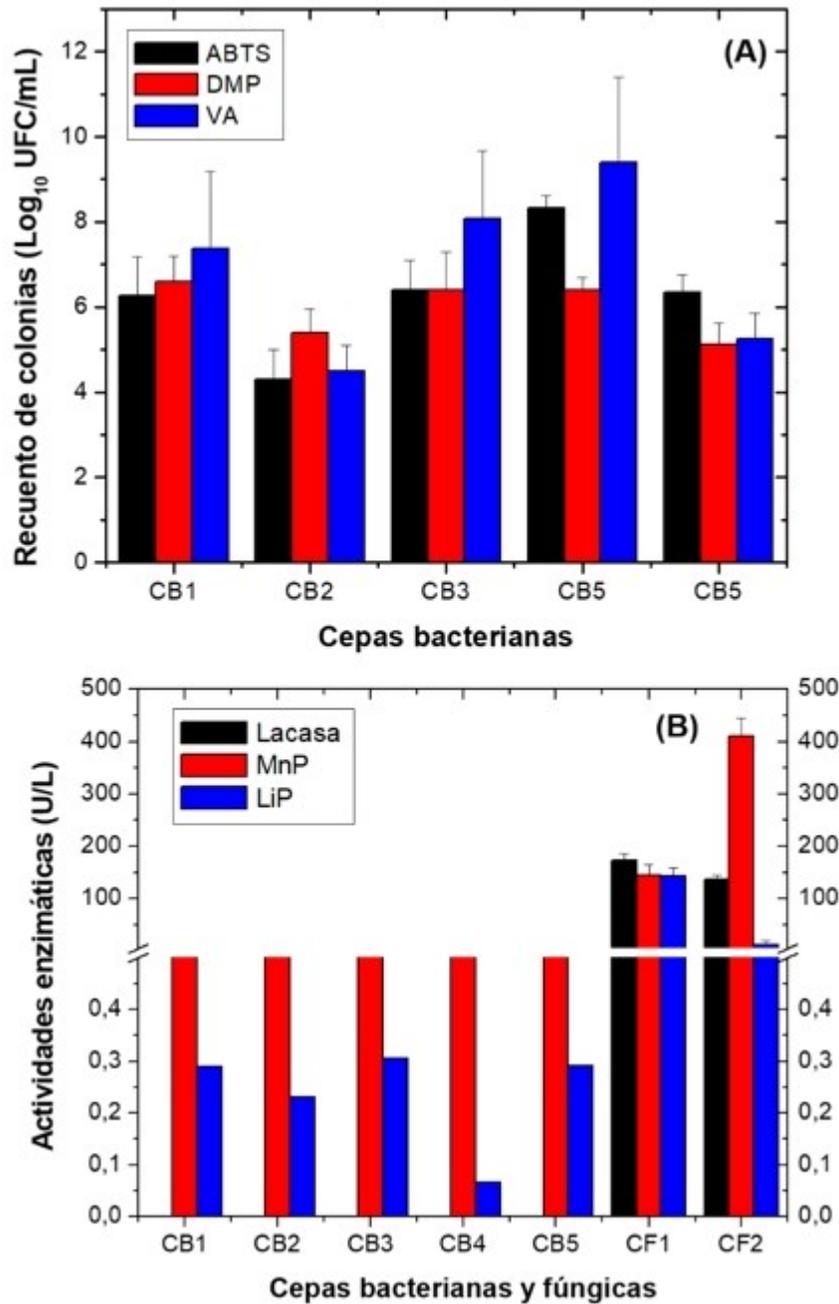
  

<b>Interacción Bacteria/Hongo. Inhibición del crecimiento micelial (%)</b>					
<b>Hongo sembrado por disco central</b>	<b>Cepas sembradas masivas en el agar PDA</b>				
	CB1 <i>Enterobacter xiangfangensis</i>	CB2 <i>Pseudomonas azotoformans</i>	CB3 <i>Pseudomonas</i> sp.	CB4 <i>Bacillus subtilis</i>	CB5 <i>Pseudomonas fluorescens</i>
CF1 <i>P. ostreatus</i>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
CF2 <i>T. versicolor</i>	3.0±0.7 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	5.0±0.9 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>

Efecto antagónico de las cepas bacterianas aisladas de residuales líquidos reales y efecto antagónico entre las bacterias y los hongos ligninolíticos. Promedio de 3 réplicas. En cada tratamiento se indica la desviación estándar. Las letras a y b quieren decir que existen diferencias significativas entre cepas evaluadas, obtenidas

entre ellas mismas y con los dos hongos (protocooperación/ sinergismo) (Mir-Tutusaus *et al.*, 2017). Esta interacción permite que los hongos primero transformen los compuestos más complejos, liberando intermediarios que pueden ser empleados por las bacte-

rias (Dashtban *et al.*, 2010). Por otro lado, tanto los hongos como las bacterias producen enzimas e isoformas diferentes de una misma enzima que oxidan la estructura aromática y sustituyentes alifáticos de los colorantes. Esto podría favorecer los procesos de mineralización



**Figura 1.** Crecimiento y actividades enzimáticas en medios inductores para las cepas bacterianas (CB1: *Enterobacter xianfangensis*, CB2: *Pseudomonas azotoformans*, CB3: *Pseudomonas sp.*, CB4: *Bacillus subtilis* y CB5: *Pseudomonas fluorescens*) y los hongos *P. ostreatus* y *T. versicolor* (CF6 y CF7).

hasta CO<sub>2</sub>, agua, liberación de iones solubles e incremento de la biomasa (Dashtban *et al.*, 2010).

#### *Determinación de actividad enzimática en presencia de inductores y colorantes sintéticos*

En la figura 1A se presentan los resultados de los recuentos de las bacterias al cultivarlas en presencia de inductores enzimáticos como ABTS, DMP y VA, con una concentración inicial de 10 mg/L. Todas crecieron alcanzando recuentos que oscilaron entre 4.0 y 10 unidades logarítmicas. Con los hongos también se observó crecimiento al cultivarlos con los inductores, sin embargo, *T. versicolor* creció más despacio que *P. ostreatus* (89, 75 y 85 mm de crecimiento miceliar), obteniendo valores de 23, 55 y 20 mm en presencia de ABTS, DMP y VA, respectivamente.

El crecimiento inicial de los hongos y las bacterias se relacionó con el uso de la fuente de carbono (Glucosa) y nitrógeno (Cloruro de amonio), los cuales pudieron ser metabolizados para la producción de biomasa y energía (Martinko *et al.*, 2014). Por otro lado, a partir de la oxidación de los inductores enzimáticos los microorganismos también pudieron obtener una fuente adicional de energía (Dashtban *et al.*, 2010).

En relación con las actividades enzimáticas, las bacterias no produjeron la enzima Lacasa en presencia del ABTS y con los hongos los valores obtenidos fueron de 173 y 137 U/L para *P. ostreatus* y *T. versicolor* (Figura 1B). La actividad MnP para las bacterias osciló entre 0.5 y 1.6 U/L, valores bajos si se comparan con los hongos ya que la actividad para *P. ostreatus* fue de 143 U/L y para *T. versicolor* fue de 433 U/L (Figura 1B). En relación con la actividad LiP los resultados oscilaron entre 0.06 y 0.3 U/L, para las bacterias y entre 11 y 143 U/L para *T. versicolor* y *P. ostreatus* (Figura 1B). Aunque las bacterias tuvieron actividades enzimáticas bajas, vale la pena resaltar que es el primer reporte de géneros como *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Bacillus*, aislados de aguas residuales reales contaminadas con colorantes de Gram que tienen actividad Manganese peroxidasa y Lignino peroxidasa.

Los compuestos como el ABTS, DMP y VA, son empleados como inductores de actividad enzimática, mediadores redox para la oxidación de fracciones no aromáticas de la lignina y como sustratos para monitorear la actividad enzimática *in vitro* (Grassi *et al.*, 2011). Estos compuestos tienen un potencial redox más bajo que las enzimas Lacasa, MnP y LiP, por esta razón son susceptibles a ser oxidados por la sustracción de electrones y se producen intermediarios oxidados (Cation ABTS<sup>+</sup>, Cation ABTS<sup>++</sup>, veratril aldehído, entre otros) que finalmente

pueden llegar hasta ácido succínico y ácido acético (Dashtban *et al.*, 2010; Elisashvili y Kachlishvili, 2009).

#### *Pruebas de decoloración en medio sólido*

Los resultados relacionados con el índice de crecimiento y decoloración (ICD) para las bacterias y los hongos se presentan en la Tabla 2. Todos los microorganismos fueron cultivados bajo una condición limitante de carbono y nitrógeno de fácil asimilación, ya que el agar no tenía ningún suplemento nutricional y esto permitió evaluar su potencial para crecer y decolorar, utilizando como única fuente de carbono y nitrógeno los colorantes pertenecientes a la familia de los trifenilmetánicos y el colorante azóico rojo congo. De acuerdo con los rangos establecidos para calcular el ICD las cepas bacterianas con índices de 10 son las que tuvieron mayor potencial para crecer, realizar adsorción y decoloración, siendo estadísticamente diferentes ( $p < 0.0001$ ). El segundo grupo estaba compuesto por las bacterias que crecieron, adsorbieron parte del colorante, pero no generaron zonas de decoloración cercanas a la colonia. Por último, las bacterias con menor potencial fueron las que crecieron formando colonias pequeñas, en las cuales no se observó ni adsorción, ni decoloración. En relación con las familias de colorantes, el rojo congo (azóico) y verde de malaquita (trifenilmetánico) fueron los más biodegradables ya que se obtuvieron ICD de 10 para la mayoría de las bacterias. Los colorantes Cristal Violeta y Fucsina pertenecen a los trifenilmetánicos, pero tienen una estructura más compleja que el verde malaquita, esta podría ser una de las causas por las cuales los ICD oscilaron entre 5.0 y 7.5. Al realizar la mezcla de los 4 colorantes en concentraciones de 10 mg/L para cada uno de ellos se observó una disminución en ICD determinando que los valores oscilaran entre 5.0 y 7.5, para todas las bacterias. Esto se relacionó con la mezcla de colorantes con estructuras químicas diferentes, pero cabe resaltar que, a pesar de esto, ninguna fue inhibida en un 100 % (ICD: 0) (Tabla 2).

Los resultados obtenidos con los hongos permitieron confirmar su gran versatilidad para crecer a partir de sustratos complejos de tipo aromático, que tengan similitud estructural con las sub unidades de fenil propano de la lignina. Para *P. ostreatus* y *T. versicolor* los ICD fueron iguales a 10 para los colorantes por separado y en mezcla (Tabla 2).

#### *Identificación Molecular*

Una vez se determinó el potencial enzimático y el ICD, se realizó la identificación molecular de tres de las bacterias (CB1, CB2 y CB3). Las cepas CB4 y CB5, ya habían sido caracterizadas previamente, donde se determinó que CB4 correspondía a *Bacillus subtilis* y CB5 a

**Tabla 2.** Índice de decoloración y crecimiento para las bacterias y hongos en medio sólido.

Cepas	Cristal Violeta 10 mg/L	Fucsina de Gram 10 mg/L	Verde malaquita 10 mg/L	Rojo congo 10 mg/L	Mezcla de colorantes 10 mg/L
CB1 <i>Enterobacter xiangfangensis</i>	7.5±0.2 <sup>b</sup>	10±0.2 <sup>a</sup>	10±0.7 <sup>a</sup>	10±0.7 <sup>a</sup>	7.5±0.4 <sup>b</sup>
CB2 <i>Pseudomonas azotoformans</i>	7.5±0.3 <sup>b</sup>	7.5±0.1 <sup>b</sup>	10±0.8 <sup>a</sup>	7.5±0.5 <sup>b</sup>	7.5±0.3 <sup>b</sup>
CB3 <i>Pseudomonas sp</i>	5.0±0.1 <sup>c</sup>	5.0±0.5 <sup>c</sup>	10±0.3 <sup>c</sup>	7.5±0.4 <sup>b</sup>	5.0±0.1 <sup>c</sup>
CB4 <i>Bacillus subtilis</i>	7.5±0.4 <sup>b</sup>	7.5±0.6 <sup>b</sup>	10±0.5 <sup>a</sup>	10±0.6 <sup>a</sup>	7.5±0.3 <sup>b</sup>
CB5 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	10±0.2 <sup>a</sup>	10±0.3 <sup>a</sup>	10±0.3 <sup>a</sup>	10±0.3 <sup>a</sup>	7.5±0.1 <sup>b</sup>
CF1 <i>P. ostreatus</i>	10±0.2 <sup>a</sup>	10±0.5 <sup>a</sup>	10±0.3 <sup>a</sup>	10±0.3 <sup>a</sup>	10±0.3 <sup>a</sup>
CF2 <i>T. versicolor</i>	10±0.2 <sup>a</sup>	10±0.4 <sup>a</sup>	10±0.3 <sup>a</sup>	10±0.3 <sup>a</sup>	10±0.3 <sup>a</sup>

Crecimiento (C). Adsorción (Ad). Decoloración (D). No se observó crecimiento (NC). C/Ad/D: 10. C/Ad/-: 7.5. C/-/-: 5.0. NC: 0. Las letras representan los grupos heterogéneos de acuerdo con el análisis estadístico. (Las mismas letras entre cepas indican que no existen diferencias significativas entre ellas ( $p > 0.05$ )).

*Pseudomonas fluorescens*. Los hongos *P. ostreatus* y *T. versicolor* fueron caracterizados desde el año 2003.

Los resultados del análisis taxonómico para el aislamiento CB1, con una longitud de la secuencia consenso de 1409 pb, indicaron que se trata de un microorganismo perteneciente al género *Enterobacter* (Clasificadores RDP y Greengenes), especie *xiangfangensis* (*refseq/RNA - NCBI*), con un 99 % de identidad en el 97 % de su longitud, comparada con secuencias del gen ribosomal 16S pertenecientes a *Enterobacter xiangfangensis*, indicando una alta probabilidad de pertenecer a esta especie. Para las secuencias ensambladas de 1350 pb (CB2) y 1363 pb (CB3), los clasificadores RDP y Greengenes determinaron que se trata de secuencias de microorganismos pertenecientes al género *Pseudomonas*, sin embargo, no fue posible determinar de manera concluyente la especie para el aislamiento CB3, asignándola finalmente como *Pseudomonas* sp. Por otra parte, al analizar la secuencia de CB3 contra la base de datos *refseq/RNA - NCBI*, se obtuvo un 99 % de identidad en el 100 % de la longitud de la secuencia consenso, con secuencias del gen ribosomal 16S pertenecientes a la especie *Pseudomonas azotoformans*, con un soporte de ramas del 100 %, indicando una alta probabilidad de pertenecer a dicha especie.

#### Experimentos de remoción en función del tiempo

En los laboratorios de docencia para las asignaturas de Microbiología se producen residuos líquidos provenientes

de las tinciones biológicas; desde el año 2012 estos subproductos se colectan, se almacenan y se entregan a una empresa externa para que realice su disposición final apropiadamente. Adicionalmente, durante todo este tiempo se han realizado muestreos puntuales (2012 – 2016) para conocer sus características físicas, químicas y microbiológicas. Como se puede observar en la Tabla 3, la composición de los residuos líquidos varía en cada lote de muestreo, las concentraciones de algunos de ellos fueron altas y no cumplen con la normatividad vigente para Colombia (Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, Resolución 0631 del 2015).

Tomando como base los resultados de la caracterización de 5 años, se realizó el diseño de un residuo líquido sintético (RLS) que simulara las características de algunos de los parámetros de los residuos reales y permitiera valorar el nuevo consorcio fúngico/bacteriano bajo unas condiciones más controladas.

Al realizar la caracterización inicial de RLS los valores obtenidos fueron: DQO 2719 mg/L, DBO<sub>5</sub> 345 mg/L, relación de tratabilidad DBO<sub>5</sub>/DQO 0.130, unidades de color 3200, SST 1044 mg/L, pH 7.0 y conductividad 1.71 mS/cm. Las poblaciones de bacterias y hongos totales fueron menores a 2.0 unidades logarítmicas. Bajo estas condiciones se determinó con mayor grado de control la capacidad de remoción del consorcio fúngico/bacteriano (T<sub>1</sub>), *P. ostreatus*/*T. versicolor* (T<sub>2</sub>) y el consorcio bacteriano solo (T<sub>3</sub>).

Tabla 3. Caracterización física, química y microbiológica para el agua residual proveniente de tintones biológicos durante los años 2012 a 2016.

Lotes	pH	Conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	SST (mg/L)	DQO (mg/L)	DBO <sub>5</sub> (mg/L)	Tratabilidad DBO <sub>5</sub> /DQO	Color (UC)	Log 10 (ufc/mL) <i>E. coli</i>
Valores de referencia. Resolución 0631 del 215. Capítulo VI. Artículo 14. <i>Parámetros físicoquímicos y sus valores máximos permisibles en los vertimientos puntuales de aguas residuales no domésticas de actividades asociadas con servicio y otras actividades. No especificado por la resolución (NE)</i>								
	pH	Conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	SST (mg/L)	DQO (mg/L)	DBO <sub>5</sub> (mg/L)	Tratabilidad DBO <sub>5</sub> /DQO	Color (UC)	Log 10 (ufc/mL) <i>E. coli</i>
Valor	6.0-9.0	NE	400	2000	800	NE	NE	NE
1	3.22	0.805	1.0	3750	1693	0.451	1890	3.0
2	7.35	0.833	1.0	3105	1234	0.397	1560	4.6
3	8.3	2,165	234	7129	1992	0.279	1292	6.1
4	8.0	2,012	87	5191	1755	0.338	1006	5.6
5	3.2	1,376	276	9920	3450	0.348	2159	5.8
6	3.6	0.89	46	2700	730	0.270	1647	3.2
7	6.6	1,212	74.3	5487	1775	0.323	1642	4.1
8	6.0	1,895	122	6811	3696	0.543	2640	3.5

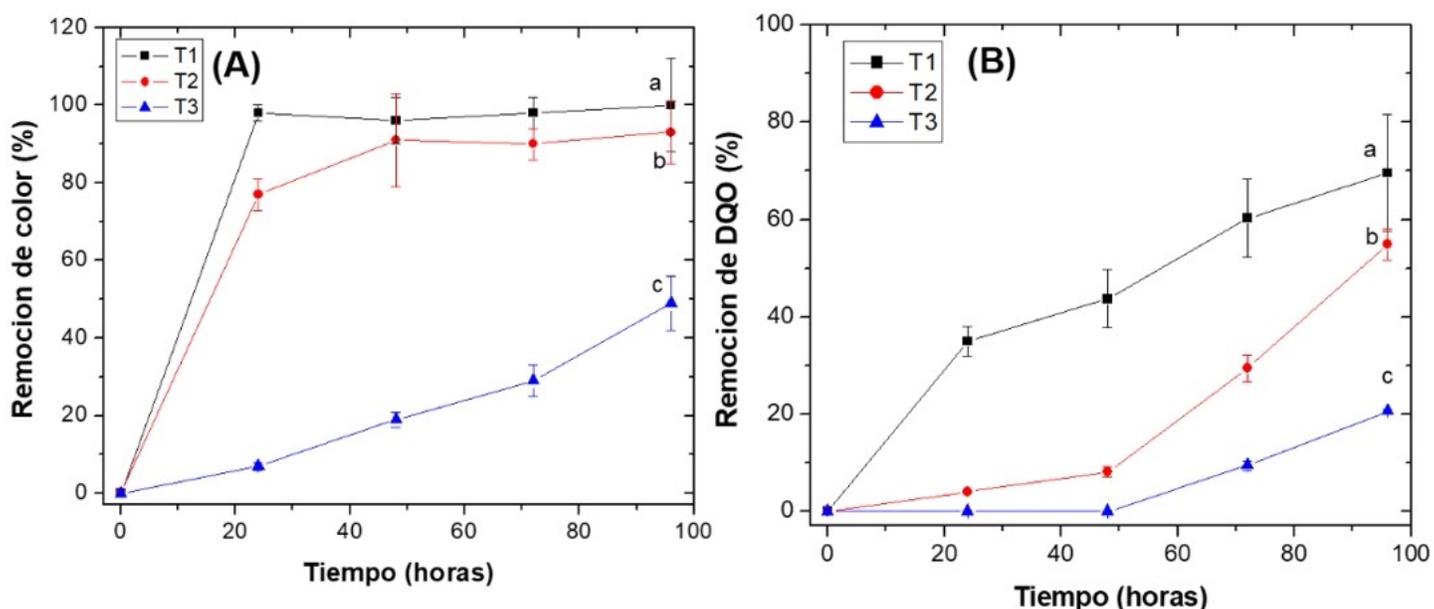


Figura 2. (A) % remoción de unidades de color y (B) % remoción para DQO, para T<sub>1</sub>: Consorcio fúngico/bacteriano, T<sub>2</sub>: Cocultivo de *P. ostreatus*/*T. versicolor*, T<sub>3</sub>: *Enterobacter xiangfangensis*, *Pseudomonas azotoformans*, *Pseudomonas* sp., *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens*. La letra a, corresponde al mejor tratamiento seguido por las letras b y c (prueba de Tukey). Las barras representan la desviación estándar y el promedio de tres replicas.

#### Experimentos de remoción en función del tiempo

En la Figura 2A se presenta la remoción de unidades de color expresadas como remoción de color en porcentaje. En relación con el control absoluto (RLS sin inocular los microorganismos) la remoción de color y DQO no

superó el 3 % para los dos parámetros y no se detectaron actividades enzimáticas. La remoción de color por adsorción a la biomasa inactiva del consorcio fúngico/bacteriano, los dos hongos y solo bacterias, no superó el 10 % (datos no mostrados o no graficados) y no se de-

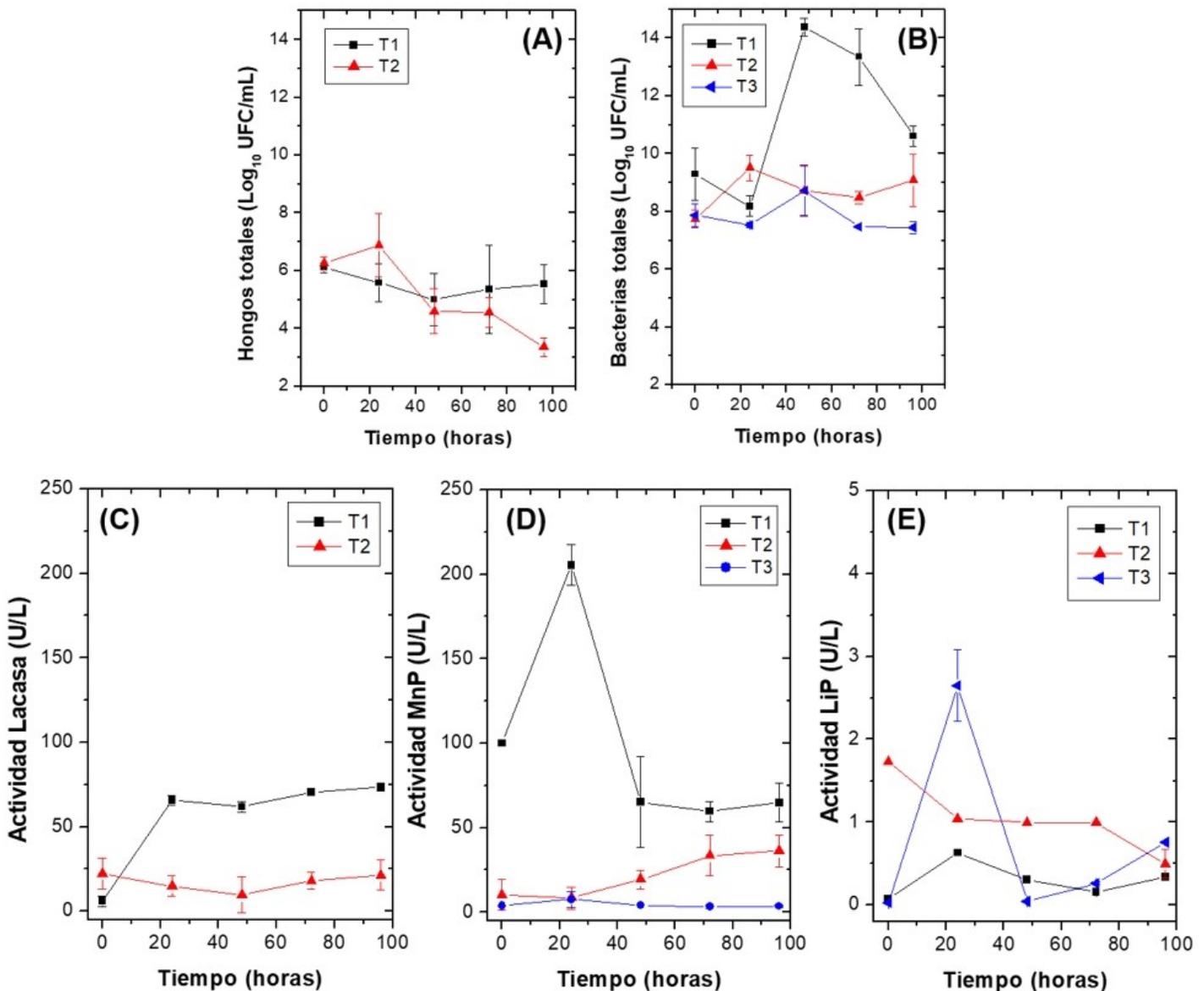


Figura 3. (A) Recuentos de hongos totales. (B) Recuentos de bacterias totales en reactor de 1 L. (C) Actividad enzimática Lacasa (U/L). (D) Manganeso Peroxidasa (MnP) y (E) Lignino Peroxidasa (LiP), para T<sub>1</sub>: Consorcio fúngico bacteriano, T<sub>2</sub>: Co cultivo de *P. ostreatus*/*Trametes versicolor*, T<sub>3</sub>: *Enterobacter xiangfangensis*, *Pseudomonas azotoformans*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens*.

tectaron actividades enzimáticas. Por lo tanto, los tratamientos superaron a los controles y el análisis estadístico solamente se realizó entre los tres tratamientos.

Se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.0001$ ) determinando que el mejor fue T<sub>1</sub> obteniendo porcentajes del 99 %, seguido por T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub> con valores de 93 %, y 49 % a las 96 h de proceso. Para los tratamientos T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub>, se evidenció una remoción elevada de las unidades de color durante las primeras 24 h (98 % y 72 %) la cual podría relacionarse con la adsorción de

los colorantes a la pared celular de *P. ostreatus* y *T. versicolor*, ya que el T<sub>3</sub> solamente tenía las cinco bacterias y la remoción a las 24 h fue del 7 %. Las UC de color finales fueron de 15, 111 y 881 UC, respectivamente para T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub>.

Dadas las características químicas de los colorantes que son los responsables de las elevadas concentraciones de DQO, la remoción se realizó más lentamente y los porcentajes fueron más bajos si se comparan con la remoción de UC. A las 96 horas, la remoción fue del 70 % y

el 55 % para el consorcio fúngico/bacteriano ( $T_1$ ) y los dos hongos en proporción 1:1 ( $T_2$ ), respectivamente. Con las bacterias la remoción no superó el 20 % (Figura 2B).

Al realizar una correlación entre decoloración y remoción de DQO se obtuvo un valor positivo y significativo entre las dos variables de respuesta para los tratamientos  $T_1$  y  $T_2$  ( $\rho=0.97$ ,  $p<0.0001$ ,  $\rho=0.90$ ,  $p=0.0004$ , respectivamente). Demostrando que a medida que se modifican los grupos cromóforos, anillos aromáticos y sustituciones alifáticas, la carga contaminante se hace más biodegradable y se favorece la remoción de la DQO. Obteniendo concentraciones finales de DQO de 823 mg/L, 1133 mg/L y 963 mg/L para  $T_1$ ,  $T_2$  y  $T_3$ , respectivamente.

Cuando los microorganismos entraron en contacto con una mezcla de colorantes, lo primero que se evidenció fue un proceso de adsorción el cual fue rápido y posiblemente independiente del metabolismo. El consorcio evaluado en  $T_1$  y los dos hongos en cocultivo ( $T_2$ ) removieron más eficientemente el color que las bacterias solas ( $T_3$ ), básicamente porque los hongos se adicionaron en mayor proporción que las bacterias y fueron preparados como una suspensión, esto favoreció que en las primeras horas de proceso se tuvieran mayor cantidad de sitios activos disponibles en la pared fúngica para unirse con los colorantes. Adicionalmente, el pH cercano a la neutralidad (6.5-6.8) permitió que los colorantes catiónicos fueran atraídos a la pared fúngica (grupos amino, carboxilo, entre otros) y posiblemente se unieran por fuerzas de *Van der Waals* y los puentes de Hidrógeno (Morales-Álvarez *et al.*, 2016; Castillo *et al.*, 2013; Kurade *et al.*, 2017).

Una vez se alcanzó el equilibrio de adsorción, los colorantes fueron transformados por las enzimas extracelulares que produjeron los hongos y las bacterias, reflejándose en la remoción de la DQO y color (Figura 2A, B). La remoción obtenida en  $T_1$  y  $T_2$ , podría asociarse con la producción de diferentes isoformas de una sola enzima como la lacasa, actividades LiP, MnP y consumo de la glucosa como co sustrato por parte del consorcio. Vijayalakshmi y Muthukumar, (2015), reportaron al igual que en el presente trabajo que, si bien los microorganismos de forma individual pueden remover eficientemente ciertos compuestos presentes en aguas residuales, los consorcios mejoran significativamente el desempeño de los tratamientos biológicos. En relación con el comportamiento del pH, todos los experimentos iniciaron con un valor de 7.0 y a las 96 h los valores finales fueron 6.19, 5.45 y 5.98 para  $T_1$ ,  $T_2$  y  $T_3$ . La disminución se asoció con la producción de ácidos orgánicos a partir del con-

sumo glucosa y por la biotransformación de los colorantes.

En la Figura 3 se presentan los recuentos expresados como  $\text{Log}_{10}$  de UFC/mL para los hongos y las bacterias. En el  $T_1$  el recuento de hongos osciló entre 4.0-7.0 unidades logarítmicas, siendo más bajos que los obtenidos con las bacterias (Figura 3A). Lo que podría atribuirse a la menor velocidad de crecimiento que tienen los hongos, en especial la cepa de *T. versicolor* la cual al ser cultivada en agar salvado de trigo tuvo una velocidad de 3.3 mm/d siendo 4 veces menor que la de *P. ostreatus* (12.5 mm/d) (datos no mostrados). En relación con los recuentos de bacterias en  $T_1$  oscilaron entre 4.0 y 14.0 unidades logarítmicas, evidenciando un crecimiento exponencial hasta las 48 horas, posteriormente las poblaciones descendieron hasta finalizar en 10.0 unidades logarítmicas (Figura 3B). Los recuentos de bacterias más elevados se relacionaron con la mayor velocidad de crecimiento y tiempos de duplicación más cortos. Por otro lado, las poblaciones de bacterias fueron más altas en  $T_1$  que en  $T_3$ , demostrando que se requiere de la presencia de los hongos ligninolíticos para que se favorezca el crecimiento de las bacterias y los intermediarios producidos por los hongos fueron asimilados con mayor facilidad que los colorantes iniciales.

Durante los mismos intervalos de muestreo se monitorearon las enzimas lacasa y peroxidasa (Figuras 3C, D, E). En el  $T_1$  la actividad lacasa fue incrementando en función del tiempo hasta obtener un máximo de 75 U/L a las 96 h. Para  $T_2$  la actividad fue más baja que en  $T_1$  y no siguió una tendencia ascendente en función del tiempo (Figura 3C). En relación con las peroxidasa, la actividad MnP se cuantificó en todos los tratamientos, obteniendo los valores más altos en  $T_1$  (205 U/L), seguido por  $T_2$  (36 U/L) y  $T_3$  (7.5 U/L). En ninguno de los tratamientos se evidenció una actividad progresiva lo que podría relacionarse con el mecanismo de acción de estas enzimas sobre los colorantes e intermediarios (Figura 3D). La actividad LiP fue la más baja en todos los tratamientos oscilando entre 0.073-0.63 U/L en  $T_1$ , 0.5-1.7 U/L para  $T_2$  y 0.025-2.6 U/L en  $T_3$  (Figura 3E). Al realizar la correlación entre decoloración, remoción de DQO, actividad lacasa, MnP y LiP, se obtuvo una correlación positiva significativa ( $\rho=0.81$ ,  $p<0.0050$ ) entre decoloración, DQO y actividad lacasa para el  $T_1$ . Las peroxidasa no tuvieron correlación positiva con la decoloración y remoción de DQO para el  $T_1$  ( $\rho=0.345$ ,  $p<0.56$ ). Demostrando que las enzimas que más influenciaron la decoloración y disminución de DQO fueron las lacasas.

Durante la etapa inicial del proceso pueden participar las enzimas producidas por los hongos como lacasas y

peroxidasas, de tal forma que se generen intermediarios más sencillos que pueden ser empleados por las bacterias. Adicionalmente, las bacterias produjeron Manganeso peroxidasa y lignino peroxidasa, enzimas que tienen el mismo mecanismo de acción que las peroxidasas fúngicas. En relación con el posible orden mediante el cual actúa cada enzima, las lacasas han sido reportada como las responsables de oxidar los grupos cromóforos de los colorantes de la familia de los trifenilmetánicos y azóicos, generando intermediarios que actúan como sustratos con bajo potencial redox para las peroxidasas siempre y cuando esté presente el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que actúa como co factor (Morales-Álvarez *et al.*, 2016; Castillo *et al.*, 2013).

## CONCLUSIONES

Se desarrolló un consorcio formado por *P. ostreatus*, *T. versicolor*, *Enterobacter xiangfangensis*, *Pseudomonas azotoformans*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens*, con capacidad para remover elevadas concentraciones de DQO, DBO<sub>5</sub> y color, presentes en un residuo líquido sintético bajo condiciones de laboratorio. La cual se favoreció por la acción combinada de la adsorción de los colorantes a las paredes celulares y producción de enzimas ligninolíticas fúngicas y bacterianas. El nuevo consorcio es una alternativa biológica novedosa para el tratamiento de aguas residuales reales contaminadas con mezclas de colorantes que pertenecen a la familia de los trifenilmetánicos y azóicos, al emplearlo en unión con procesos unitarios de tipo físico o químico.

## AGRADECIMIENTOS.

Esta investigación fue financiada por el proyecto 7135, aprobado por la Vicerrectoría de Investigación de la Pontificia Universidad Javeriana. El cual se desarrolló en cooperación con la Universidad de La Salle, dentro del convenio No CEC-00368-17 del 2017. Los microorganismos utilizados en este estudio fueron colectados siguiendo la resolución No 00778 del 2017 "Permiso Marco de recolección de especímenes de especies silvestres de la diversidad biológica con fines de investigación científica no comercial otorgado a la Pontificia Universidad Javeriana por el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. Número de radicación 2018041984-1-000.

## REFERENCIAS

Ajao, A.T., Adebayo, G.B., Yakubu, S.E. (2011). Bioremediation of Textile Industrial Effluent using mixed culture of *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* immobilized on agar agar in a Bioreactor.

*Journal of Microbiology and Biotechnology Research*. 1(3): 50-56

Angulo-Cortés, J.P., García-Díaz, A., Pedroza, A.M., Martínez-Salgado, M.M., Gutiérrez-Romero, V. (2012). Diseño de un medio para la producción de un cultivo de bacterias fosfato solubilizadoras con actividad fosfatasa. *Universitas Scientiarum*. 17(1): 1-10.

APHA. (2012). Standard Methods for the examination of water and wastewater. 21nd Ed. Washington, DC, USA.

Arantes, V., Milagres, A.M.F., Filley, T.R., Goodell, B. (2011). Lignocellulosic polysaccharides and lignin degradation by wood decay fungi: the relevance of nonenzymatic Fenton-based reactions. *Journal Industrial Microbiology & Biotechnology*. 38(4): 541-555.

Badia-Fabregat, M., Lucas, D., Tuomivirta, T., Fritze, H., Pennanem, T., Rodriguez-Mozaz, S., Barcelo, D., Caminal, G., Vicent, T. (2017). Study of the effect of the bacterial and fungal communities in real wastewater effluents on the performance of fungal treatments. *Science of the Total Environment*. 579, 366-377.

Barrera, R., Reyes, C., Martínez, M.M., Pedroza, A. (1999). Aislamiento e identificación de bacterias lipolíticas y proteolíticas capaces de depurar aguas residuales del lavado del café. *Universitas Scientiarum*. 6: 23-30.

Castillo, L.C., Pedroza, A.M., Barragan, E.B. (2013). Adsorption and biological removal of basic Green 4 dye using White-rot fungi immobilized on *Agave tequilana* weber waste, Fresenius. *Environmental Bulletin*. 22: 2334-2343.

Dashtban, M., Schraft, H., Syed, T., Qin, W. (2010). Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 1(1): 36-50.

Deletze, E., Antoniadis, A., Kitsiou, V., Kostopoulou, E., Litic, D., Cretescu, I. (2015). Photocatalytic treatment of colored wastewater from medical laboratories: photodegradation of Nuclear Fast Red. *Desalination and Water Treatment*. 57(40): 18897-18905.

Elisashvili, V. and Kachlishvili, E. (2009). Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase

- production by white-rot Basidiomycetes. *Journal of Biotechnology*. 144(1): 37-42.
- Espinoza-Ortiz, E.J., Rene, E.R., Pakshirajan, K., Van-Hullebusch, E.D., Lens, P.N.I. (2016). Fungal pelleted reactors in wastewater treatment: Applications and perspectives. *Chemical Engineering Journal*. 283(1): 553-571.
- Fernandez, J.A., Cardozo, M.G., Carrascal, A.K., Salcedo, J.C., Pedroza, A.M., Daza, C.E. (2015). Tratamiento de agua residual de microbiología usando películas delgadas de TiO<sub>2</sub>. *Ingeniería y Competitividad*. 17 (1): 35-48.
- Fernández, J.A., Suan, A., Ramírez, J.C., Robles, J., Salcedo, J.C., Pedroza, A.M., Daza, C.E. (2016). Treatment of real wastewater with TiO<sub>2</sub>-films sensitized by a natural-dye obtained from *Picramnia sellowii*. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 4(3): 2848-2856.
- García, J.C., Pedroza, A.M., Daza, C.E. (2017). Magnetic Fenton and Photo-Fenton-Like Catalysts Supported on Carbon Nanotubes for Wastewater Treatment. *Water Air Soil Pollution*. 228-246.
- Grassi, E., Ecodeller, P., Filiel, N., Romina, C., Levin, L. (2011). Potential of *Trametes trogii* culture fluids and its purified laccase for the decolorization of different types of recalcitrant dyes without the addition of redox mediators. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 65(4): 635-643.
- Kaushik, P., Mishra, A., Malik, A., Kishore, K.P. (2014). Biosorption of Textile Dye by *Aspergillus lentulus* Pellets: Process Optimization and Cyclic Removal in Aerated Bioreactor. *Water Air Soil Pollution*. 225-1978.
- Kurade, M., Waghmode, T., Patil, S., Jeon, B. Govindwar. (2017). Monitoring the gradual biodegradation of dyes in a simulated textile effluent and development of a novel triple layered fixed bed reactor using a bacterium-yeast consortium. *Chemical Engineering Journal*. 307: 1026-1036.
- Livernoche, D., Jurasek, L., Desrochers, M., Dorica, J., 1983. Removal of color from Kraft mill wastewater with cultures of white rot fungi and with immobilized mycelium of *Coliorus versicolor*. *Biotechnol Bioeng* 24(8), 2055-2065.
- Martinko, M., Clark, S. (2014). Brock Biology Microorganisms, Fourteenth ed, Benjamin Cummings. San Francisco.
- Meza, R.A., Monroy, A.F., Mercado, M., Poutou, R.A., Rodríguez, P., Pedroza, A.M. (2004). Study of the stability in real time of cryopreserved strain Banks. *Universitas Scientiarum*. 9(2): 35-42.
- Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. Resolución 0631. (2015). en: [http://www.minambiente.gov.co/images/normativa/app/resoluciones/d1-res\\_631\\_marz\\_2015.pdf](http://www.minambiente.gov.co/images/normativa/app/resoluciones/d1-res_631_marz_2015.pdf). Accesado: 17 febrero 2018.
- Mir-Tutusaus, J.A., Parlade, E., Llorca, M., Villagrasa, M., Barcelo, D., Rodríguez-Mozaz, S., Martínez-Alonso, M., Gaju, N., Caminal, G., Sarra, M. (2017). Pharmaceuticals removal and microbial Community assessment in a continuous fungal treatment of non-sterile real hospital wastewater after a coagulation-flocculation pretreatment. *Water Research*. 116: 65-75.
- Morales-Álvarez, E.D., Rivera-Hoyos, C.M., Chaparro-Núñez, L.E., Daza, C.E., Poutou-Pinales, R.A., Pedroza-Rodríguez, A.M. (2016). Decolorization and Detoxification of Malachite Green by *Ganoderma lucidum*: Key Operating Parameters and Adsorption Studies. *Journal of Environmental Engineering*. 143(4): 1-12.
- Morales-Álvarez, E.D., Rivera-Hoyos, C.M., Poveda-Cuevas, C.A., Reyes-Guzmán, E.A., Pedroza-Rodríguez, A.M., Reyes-Montaño, E.A., Poutou-Piñales, R.A. (2017). Malachite Green and Crystal Violet Decolorization by *Ganoderma lucidum* and *Pleurotus ostreatus* Supernatant and by rGILCC1 and rPOXA 1B Concentrates: Molecular Docking Analysis. *Applied Biochemical Biotechnology*. 10, 2560-2572.
- Morato, C.C., Lucas, D., Llorca, M., Mozaz, S.R., Gorda, M., Petrovic, M. (2014). Hospital wastewater treatment by fungal bioreactor: Removal efficiency for pharmaceuticals and endocrine disruptor compounds. *Science Environment*. 493. 365-376.
- Pallerla, S., Chambers, R. (1997). Characterization of a Ca-Alginate-Inmovilized *Trametes versicolor* Bioreactor for Decolorization and AOX Reduction of Paper Mill Effluents. *Bioresource Technology*. 60 (1): 1-8.

- Pollegioni, L., Tonin, F., Rosini, E. (2015). Lignin-degrading enzymes. *The FEBS Journal*. 282(7): 1190-1213.
- Rivera-Hoyos, C.M., Morales- Álvarez, E.D., Poveda-Cuevas, S.A., Reyes-Guzmán, E.A., Poutou-Piñales, R.A., Reyes-Montaño, E.A., Pedroza-Rodríguez, A.M., Rodríguez-Vázquez, R., Cardozo-Bernal, A.M. (2015). Computational Analysis and Low-Scale Constitutive Expression of Laccases Synthetic Genes GILCC1 from *Ganoderma lucidum* and POXA1B from *Pleurotus ostreatus* in *Pichia pastoris*. *PLOS one*. 1-21.
- Santoyo, F., González, A.E., Terrón, M.C., Ramírez, L., Pisabarro, A.G. (2008). Quantitative linkage mapping of lignin-degrading enzymatic activities in *Pleurotus ostreatus*. *Enzyme and Microbial Technology*. 43(2): 137-143.
- Santoyo, G., Valencia-Cantero, E., Orozco-Mosqueda, M.C., Peña-Cabriales, J.J., Farías-Rodríguez, R. (2010). Role of Siderophores in Antagonic Activity of *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 Against Plant Fungi. *Terra Latinoamericana*. 28(1): 53-60.
- Sharma, S., Munjal, A., Gupta, S. (2011). Comparative studies on decolorization of textile Azo dyes by different bacterial consortia and pure bacterial isolate. *Journal of Pharmacy Research*. 4(9): 3180-3183.
- Tien, M. and Kirk, T. (1983). Lignin degradation enzyme from the hymenomycete. *Phanerochaete chrysosporium* burds. *Industrial Science*. 221 (3611): 661-663.
- Tinoco, R.M.A., Pickard, R. Vazquez-Duhalt. (2001). Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. *Letter Applied Microbiology*. 32(5): 331-335.
- Vijayalakshmidivi, S. and Muthukumar, K. (2015). Improved biodegradation of textile dye effluent by coculture. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 114: 23-30.