

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**OBTENCIÓN Y UTILIZACIÓN DE PIGMENTOS TEXTILES A
PARTIR DE HONGOS FILAMENTOSOS AISLADOS DE SUELOS
DEL ALTIPLANO PERUANO**

TESIS

PRESENTADA POR:

Br. LISETH ALVAREZ VALDEZ

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PUNO - PERÚ

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



OBTENCIÓN Y UTILIZACIÓN DE PIGMENTOS TEXTILES A PARTIR DE
HONGOS FILAMENTOSOS AISLADOS DE SUELOS DEL ALTIPLANO
PERUANO

TESIS

PRESENTADA POR:

Br. LISETH ALVAREZ VALDEZ

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

APROBADO POR EL JURADO REVISOR CONFORMADO POR:

PRESIDENTE


.....
Mg. DANTE MAMANI SAIRITUPAC

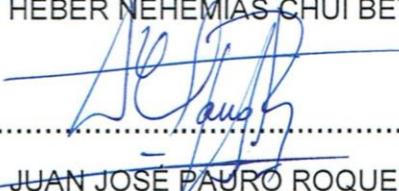
PRIMER MIEMBRO


.....
M. Sc. MARIA ELENA SUAÑA QUISPE

SEGUNDO MIEMBRO


.....
M. Sc. HEBER NEHEMIAS CHUI BETANCUR

DIRECTOR / ASESOR


.....
M. Cs. JUAN JOSÉ PAURO ROQUE

ÁREA: Microbiología y Laboratorio Clínico

TEMA: Biotecnología Microbiana

DEDICATORIA

*A Dios mi más grande
amigo porque ilumina mi
camino y por su infinita
bondad, amor y
comprensión.*

*A mis padres por sus
consejos, todo su gran
amor, apoyo y comprensión.*

*A mi madre, la mujer más
linda y maravillosa del
universo porque siempre
fue y será mi motivo para
seguir adelante.*

*A mis hermanos por todo su
cariño y porque a pesar de
sus defectos, cada uno es
un gran ejemplo.*

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional del Altiplano Puno, Facultad de Ciencias Biológicas, por facilitarme el laboratorio de Microbiología.

Al M. Cs. Juan José Pauro Roque, por ser no sólo el director y asesor de este proyecto sino también un gran docente, amigo y guía.

A la Dra. Youri Teresa del Carpio Condori, porque pese a estar en horas de clase, nos permitió trabajar en el mismo ambiente.

A todos y cada uno de los docentes que fueron parte de toda mi formación profesional.

ÍNDICE GENERAL

Resumen	11
Abstract	12
I. Introducción	13
II. Revisión de literatura	15
2.1 Antecedentes.....	15
2.2 Marco teórico.....	18
2.3 Marco conceptual	26
III. Materiales y métodos.....	28
3.1. Ámbito de Estudio.....	28
3.2. Métodos	29
IV. Resultados y discusión	36
V. Conclusiones	55
VI. Recomendaciones	56
VII. Referencias	57
Anexos	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Zona de muestreo en el centro Poblado de Jayllihuaya en octubre del 2016. .	28
Figura 2. Toma de muestra de suelos de cultivo de papa en el centro Poblado de Jayllihuaya en octubre del 2016.	29
Figura 3. Diluciones de muestra de suelo y cultivo en agar papa dextrosa en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano Puno en octubre y diciembre del 2016.	30
Figura 4. Microcultivo de hongos y observación al microscopio en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano Puno en octubre y diciembre del 2016.....	31
Figura 5. Obtención de discos de micelio y cultivo de hongos en caldo papa sacarosa en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano Puno en octubre y diciembre del 2016.....	32
Figura 6. De izquierda a derecha: Filtrado de pigmento, mezcla de pigmentos con etanol, centrifugado de pigmentos en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano Puno en octubre y diciembre del 2016.	32
Figura 7. De izquierda a derecha mordientes y mordentado y teñido de fibras naturales con los pigmentos fúngicos en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano Puno en octubre y diciembre del 2016.....	33
Figura 8. Inoculación y sometimiento de pulgas a diferentes concentraciones de pigmento en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano Puno en octubre y diciembre del 2016.	35
Figura 9. Medio de cultivo control y cepas puras de los hongos productores de pigmento (cepa 1 <i>Fusarium</i> sp y cepa 2 <i>Penicillium</i> sp) en agar papa dextrosa, en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano Puno en octubre y diciembre del 2016.	36

- Figura 10. Izquierda: Esquema de la estructura de hongos del género *Fusarium* según la guía de Barnett (1973). Derecha: Esquema que ilustra la estructura del hongo productor de pigmento amarillo al microscopio en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano Puno en octubre y diciembre del 2016. 40
- Figura 11. Izquierda: Esquema de la estructura de hongos del género *Penicillium* según la guía de Barnett (1973). Derecha: Esquema que ilustra la estructura del hongo productor de pigmento naranja al microscopio en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano Puno en octubre y diciembre del 2016. 40
- Figura 12. De izquierda a derecha: caldo control y cultivos en caldo sacarosa papa con producción de pigmentos naranja y amarillo, en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano Puno en octubre y diciembre del 2016. 43
- Figura 13. Teñido de fibras de *Ovis orientalis* con los pigmentos fúngicos. De izquierda a derecha: fibras en forma suelta y tejida teñidas con pigmento amarillo, fibras control en forma suelta y tejida y fibras en forma suelta y tejida teñidas con pigmento naranja en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano Puno en octubre y diciembre del 2016. 46
- Figura 14. Teñido de fibras de *Lama glama* con los pigmentos fúngicos. De izquierda a derecha: fibras en forma suelta y tejida teñidas con pigmento amarillo, fibras control en forma suelta y tejida y fibras en forma suelta y tejida teñidas con pigmento naranja en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano Puno en octubre y diciembre del 2016. 46
- Figura 15. Teñido de fibras de *Vicugna alcos* con los pigmentos fúngicos. De izquierda a derecha: fibras en forma suelta y tejida teñidas con pigmento amarillo, fibras control en forma suelta y tejida y fibras en forma suelta y

tejida teñidas con pigmento naranja en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano Puno en octubre y diciembre del 2016.....	47
Figura 16. Mortalidad de pulgas de aguas en concentraciones crecientes del pigmento de los hongos <i>Penicillium</i> sp. (recuadros rojos) y <i>Fusarium</i> sp. (recuadros azules), en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano Puno en octubre y diciembre del 2016.....	51
Figura 17. Gráfica de relación concentración - porcentaje de mortalidad del pigmento producido por <i>Penicillium</i> sp y <i>Fusarium</i> sp frente a pulgas de agua (<i>Daphnia pulex</i>), en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano Puno en octubre y diciembre del 2016.....	51

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Mortalidad de pulgas de aguas al contacto con el pigmento producido por hongos del género *Penicillium* sp, en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano Puno en octubre y diciembre del 2016. 49
- Tabla 2. Mortalidad de pulgas de aguas al contacto con el pigmento producido por hongos del género *Fusarium* sp, en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano Puno en octubre y diciembre del 2016..... 50

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

PDA: agar papa dextrosa.

PAS: caldo papa sacarosa.

RPM: revoluciones por minuto.

g: gramos

mL: mililitros

cm: centímetros

mm: milímetros

µm: micrómetros

°C: grados Celsius o centígrados.

CL₅₀: concentración letal media

C. P.: Centro Poblado.

RESUMEN

La investigación se ejecutó en la ciudad de Puno en octubre y diciembre del 2016, y se realizaron experimentos de producción de pigmentos en hongos filamentosos que habitan los suelos de la provincia de Puno, como alternativa ecológica en el teñido de fibras. Los objetivos fueron a) obtener pigmentos fúngicos disueltos en caldos de cultivo a partir del aislamiento de hongos filamentosos de los suelos del Altiplano Peruano, b) evaluar la afinidad de los pigmentos fúngicos disueltos en caldos de cultivo producidos por los hongos seleccionados frente a fibras naturales y c) evaluar la toxicidad de los pigmentos fúngicos disueltos en los caldos de cultivo producidos por hongos utilizando como indicador al microcústáceo *Daphnia pulex* (pulga de agua). Los hongos fueron aislados de suelos del centro poblado de Jayllihuaya (Puno), luego en laboratorio fueron cultivados en agar dextrosa papa (PDA), incubados a temperatura ambiente por un lapso de 20 días, posteriormente la identificación de los hongos se llevó mediante la técnica del microcultivo y claves dicotómicas de Alexopoulos (1996), Barnett (1973) y Arias y Piñeros (2008), la producción de pigmentos se evaluó en medios de cultivo líquido conteniendo sacarosa y extracto de papa, durante 15 días, en condiciones de oscuridad, los pigmentos disueltos en caldos de cultivo se extrajeron con etanol, posteriormente se realizó el mordentado y teñido, finalmente se evaluó su toxicidad. Se aislaron a los géneros *Fusarium* sp y *Penicillium* sp productores de pigmentos amarillo y anaranjado, los cuales presentaron afinidad por las fibras naturales, ambos pigmentos presentaron una toxicidad alta (CL₅₀ de 5.55 y 8.64) en organismos de pulga de agua (*Daphnia pulex*).

Palabras clave: afinidad textil, altiplano peruano, hongos, pigmentos fúngicos, toxicidad.

ABSTRACT

The research was carried out in the city of Puno, and experiments were carried out in the production of pigments by filamentous fungi that inhabit the soils of the province of Puno, as an ecological alternative in the staining of fibers. The objectives were to a) obtain pigments from the isolation of filamentous fungi from the Peruvian Altiplano soils, b) evaluate the affinity of the pigments produced by the selected fungi against natural fibers and c) evaluate the toxicity of the pigments produced by fungi using as an indicator to the microcystophora *Daphnia pulex* (water flea). The fungi were isolated from soils in the populated center of Jayllihuaya, then in laboratory were cultures on potato dextrose agar (PDA), incubated at room temperature for a period of 20 days, after identification of the fungi was carried out using the technique of microculture and Dichotomous clues of Alexopoulos (1996), Barnett (1973) and Arias & Piñeros (2008), the production and production of pigments was evaluated in liquid culture media containing sucrose and potato extract for 15 days under dark conditions, the pigments were extracted with ethanol the etching and dyeing were carried out, finally their toxicity was evaluated. *Fusarium* sp and *Penicillium* sp genera producing yellow and orange pigments were isolated, which had affinity for natural fibers and also showed toxicity (LC₅₀ 5.55 y 8.64) in water flea (*Daphnia pulex*) organisms.

Key words: Fungi, pigments, toxicity, Peruvian altiplano, textile affinity.

I. INTRODUCCIÓN

Los pigmentos se definen como sustancias químicas que imparten color a otros materiales por el efecto óptico de la refracción de la luz del sol, aunque también pueden ser definidos como sustancias en polvo que cuando se mezclan con un líquido vehículo, imparten color a una superficie (Wani *et al.*, 2004) mientras que en biología, un pigmento es cualquier molécula que produce color en las células de animales, vegetales, bacterianas y fúngicas (ArgenBio, 2007), en tanto los hongos filamentosos han sido estudiados por su actividad metabólica en la generación de metabolitos tanto primarios como secundarios (como los pigmentos), además de su capacidad de producción extracelular, facilitar procesos fermentativos y por los altos rendimientos obtenidos (Carvalho *et al.*, 2003); fue así como se resaltó su cualidad de producir pigmentos debido a que estos podían ser utilizados en diferentes campos como la farmacéutica, alimentaria o textil.

Los estudios realizados sobre microbiología del suelo y su aumento gradual en los últimos años también han ido demostrando que tienen nuevas cualidades para su uso en biotecnología, la variedad de microorganismos encontrados lo hace un lugar idóneo de estudio, es por ello que el presente estudio pretende investigar los pigmentos naturales fúngicos disueltos en los caldos de cultivo producidos por hongos filamentosos aislados de suelos y su uso como colorante textil puesto que los colorantes sintéticos tuvieron desde el siglo XIX una producción indiscriminada que contribuyó con una alta contaminación y daño a la naturaleza y debido a que los tintes naturales de las plantas habían sido rápidamente reemplazados por los tintes sintéticos desde su descubrimiento, ya que estos presentaban mayores ventajas sobre los tintes naturales como bajo costo, variedad de colores y la capacidad de impartir mejores propiedades sobre los materiales teñidos (Lopes *et al.*, 2013); es así que desde hace un tiempo atrás se está buscando revertir de forma progresiva esta

contaminación generada en el medio ambiente, a esto pusieron énfasis los gobiernos con el fin de evitar su destrucción, en tanto, la toma de conciencia del rol del ser humano sobre la contaminación de la naturaleza llevó a tener en cuenta a los pigmentos naturales y en especial aquellos producidos por hongos filamentosos como una nueva alternativa porque se ha evidenciado que pueden producir una amplia gama de colores; un ejemplo de estos son los pigmentos producidos por hongos de los géneros *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. (Suhr *et al*, 2002), *Cladosporium*, *Fusarium* (Choque *et al.*, 2015) y *Monascus purpureus* (Velázquez, 2013) que nos servirían como una base para el desarrollo de una industria textil sustentable con visión de futuro, creando así métodos de producción de colorantes con un concepto amigable con el medio ambiente.

En tal sentido se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo general:

Obtener y utilizar pigmentos textiles fúngicos disueltos en los caldos de cultivo a partir de hongos filamentosos aislados de suelos del Altiplano peruano.

Objetivos específicos:

1. Obtener pigmentos fúngicos disueltos en los caldos de cultivo a partir del aislamiento de hongos filamentosos de los suelos del Altiplano peruano.
2. Evaluar la afinidad de los pigmentos fúngicos disueltos en los caldos de cultivo producidos por los hongos seleccionados frente a fibras naturales.
3. Evaluar la toxicidad de los pigmentos fúngicos disueltos en los caldos de cultivo producidos por hongos utilizando como indicador al microcrustáceo *Daphnia pulex* (pulga de agua).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 ANTECEDENTES

Los pigmentos son muy importantes para diversas industrias, como la alimentaria (como aditivos, intensificación de color, etc.), farmacéutica (coloración de vehículos, coloración de cosméticos, etc.), textil (coloración de prendas), etc. Desde hace mucho tiempo se ha investigado la producción de pigmentos de origen natural, aislando, caracterizando y purificando muchos compuestos de este tipo (Durán *et al.*, 2002); los cuales fueron obtenidos a partir de plantas y microorganismos principalmente. Los pigmentos microbianos, además de ser naturales, también muestran otras ventajas sobre otros pigmentos (sintéticos); tales como, mayor estabilidad a la luz, al pH, a la temperatura, entre otras (Wani *et al.*, 2004), sin embargo los procesos biotecnológicos parecen ser una mejor alternativa para la obtención de estos compuestos ya que si a hongos filamentosos nos referimos, estos en su actividad metabólica generan como metabolitos secundarios a los pigmentos (Carvalho *et al.*, 2003), pigmentos que poseerán la cualidad de usos distintos; un ejemplo de estos pigmentos son aquellos producidos por los hongos de los géneros *Monascus* sp. (Blanc *et al.*, 2001 y Cruz *et al.*, 2015), *Paecilomyces* sp. (Cho *et al.*, 2002), *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. (Suhr *et al.*, 2002) que son hongos productores de pigmentos naturales.

Las investigaciones sobre la producción de pigmentos a partir de fuentes naturales y los procesos biotecnológicos demostraron ser una buena alternativa para la obtención de compuestos coloridos, principalmente mediante hongos filamentosos, por su gran diversidad, versatilidad bioquímica y adaptación a condiciones no favorables de crecimiento, mostrándose como excelentes substitutos en la obtención de colorantes por la vía de síntesis química (Méndez *et al.*, 2007) por lo que a algunos compuestos que imparten color en diferentes tonalidades y de características hidrosolubles, se les

ha atribuido además propiedades biológicas antibacteriales, anticancerígenas y antioxidantes, como ejemplo las células productoras de estos compuestos se tiene a los integrantes del género *Monascus* sp. (Teppey *et al.*, 2013) y hongos del género *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp., que son considerados también productores de pigmentos (Hosoe *et al.*, 2011).

Los pigmentos de origen natural (hojas, semillas, frutos, etc.) se utilizaron en los procesos industriales hasta la segunda mitad del siglo IX, cuando fueron reemplazados por los colorantes sintéticos, se estima que hasta el 50% de este tipo de colorantes termina en los efluentes producidos por éstas industrias y el empleo de microorganismos, en especial los hongos filamentosos, al traer consigo la generación de nuevas tecnologías y nuevos pigmentos puede reemplazar en gran parte el uso de colorantes químicos o sintéticos (Méndez *et al.*, 2007). Los hongos filamentosos como alternativa para la producción de pigmentos naturales tienen a su favor gran variedad de géneros que producen pigmentos, un ejemplo de ello son los géneros *Cladosporium* que produce el pigmento marrón oscuro, el género *Penicillium* que produce los pigmentos marrón, amarillo, amarillo oscuro y rojo, el género *Fusarium* que produce el pigmento púrpura y el género *Aspergillus* que produce el pigmento anaranjado (Choque *et al.*, 2015).

Según Malik *et al.* (2012), registran una lista de géneros de hongos que son capaces de producir pigmentos; siendo algunos ejemplos las especies *Helminthosporium catenarium*, *Fusarium sporotrichioides*, *Haematococcus pluvialis*, *Penicillium oxalicum*, *Blakeslea trispora*, *Penicillium purpurogenum*, *Paecilomyces sinclairii* y *Pacilomyces farinosus* productoras de pigmento rojo, las especies *Penicillium nalgovensis*, *Monascus* sp. y *Ashbya gossypi* productoras de pigmento amarillo, la especie *Blakeslea trispora* es productora de pigmento crema, Lopes *et al.* (2013), descubrió que los hongos *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium graminearum*, *Monascus*

purpureus, y *Penicillium vasconiae* fueron seleccionados como productores de pigmentos y casi todos fueron capaces de crecer y producir pigmentos solubles en agua de residuos agroindustriales, Velmurugan *et al.* (2011), experimentaron el teñido de hilados de algodón con pigmentos de cinco hongos tales como *Monascus purpureus*, *Farinosa isaria*, *Emericella nidulans*, *Fusarium verticillioides*, y *Penicillium purpurogenum* usando etanol.

Los hongos proporcionan una fuente de alternativa de fácil acceso de los pigmentos naturales, como lo son las cepas de *P. chrysogenum* que resultaron como los mayores productores, pero además de ello producen pigmentos y micotoxinas y sus filtrados crudos tienen potencial para ser utilizados en la industria textil (Lopes *et al.*, 2013) de mismo modo que el hongo productor de pigmento amarillo es *Thermomyces* sp. que ha sido utilizado para procesos de teñido por su capacidad de teñido de los en tejidos de algodón, seda y lana y mostró una alta afinidad con las telas de seda (Poorniammal *et al.*, 2013) al igual que los géneros *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Aspergillus* que presentaron la cualidad de pigmentar y fijarse en telas de algodón pima (Choque *et al.*, 2015).

Velmurugan *et al.* (2011), afirma que la máxima concentración de pigmento la obtuvieron con hongos *Monascus purpureus* (rojo) seguido de *Penicillium purpurogenum* (amarillo), obteniendo mejores resultados al utilizar el alumbre y sulfato ferroso para un mejor mordentado, Méndez *et al.* (2007), obtuvo la producción fúngica de un pigmento rojo empleando la cepa xerofílica *Penicillium purpurogenum* GH-2, siendo capaz de crecer y producir pigmentos en 6 de los 9 medios analizados, con tonalidades rojas en diferentes intensidades.

2.2 MARCO TEÓRICO

2.2.1 Suelos de cultivo y diversidad microbiana

Miles y millones de organismos son parte del suelo, desde organismos microscópicos hasta lombrices e insectos que a comparación de los microbios son gigantescos. Todos ellos forman una palpitante comunidad viviente. Un suelo de formación típica posee millones de bacterias por gramo, siendo mayor la población en la zona superficial y disminuyendo rápidamente en zonas más profundas (Tortora *et al.*, 2007). El suelo es generalmente un hábitat propicio para la proliferación de microorganismos y en las pequeñas partículas que son parte de él se desarrollan microcolonias. Normalmente en los hábitats del suelo se puede encontrar desde 10^8 a 10^{10} bacterias por gramo de suelo. Siendo los microorganismos aislados que comprenden el suelo: virus, hongos, bacterias, algas y protozoos (Atlas y Bartha, 2002).

Los suelos que tienen una actividad constante de cultivo son suelos muy ricos en microorganismos, la gran cantidad de raíces que quedan en los suelos después de la cosecha (rizósferas) son aquellas que servirán como fuente de materia orgánica en el suelo. Por otro lado la densidad y variedad de microorganismos serán susceptibles a cambiar dependiendo de la especie vegetal, su edad y estado nutricional, de las características físico químicas que posee el suelo, de su manejo y de las condiciones ambientales en las que se encuentren (Adeboye *et al.*, 2006), en tanto se calcula que los exudados rizosféricos pueden llegar a contener entre 10 y 44% del carbono asimilado y una variedad de compuestos que aportan generalmente con un aumento de las densidades poblacionales de microorganismos (Primavesi, 1984) y se ha descubierto que las densidades bacterianas y fúngicas que se hallan en esta zona (rizósfera) de directo intercambio con la planta pueden llegar a ser entre 10 y 50 veces aún más grandes que en los suelos no rizosféricos (Reyes *et al.*, 2007).

2.2.2 Suelos del Altiplano peruano

La región de Puno se caracteriza por ser un gran productor nacional de papa, gran parte de sus suelos son utilizados para este tipo de cultivo. Según el MINAGRI, al finalizar el año 2013 nuestra región ocupaba el primer lugar con el 14,1% en producción nacional de papa, haciéndola una zona idónea de estudio. Una razón más por la que se eligió la región de Puno fue debido a que en un estudio comparativo sobre la microbiota encontrada en las rizósferas de cultivos de papa se utilizan suelos tanto de esta región como de la región de Huancavelica e indican que la región de Puno se caracteriza por poseer suelos franco-arenosos, un pH más alcalino (Calvo *et al.*, 2008) y mayor contenido de fósforo disponible (Reyes *et al.*, 2007) los cuales favorecen el desarrollo de poblaciones microbianas. En el caso de hongos, se sabe que éstos son más competitivos en suelos ácidos (Alexander, 1994), sin embargo, al hablar de rizósfera, los exudados producidos por las plantas pueden jugar un papel tan determinante como el tipo de suelo; por esta razón las poblaciones de hongos son más altas en la región de Puno a pesar de poseer un pH más alcalino que la región de Huancavelica (Reyes *et al.*, 2007).

2.2.3 Hongos filamentosos

Los hongos filamentosos se caracterizan por tener un aspecto algodonoso, aterciopelado o pulverulento y poseen diferentes colores. Su característica fundamental es que van a estar conformados por muchos filamentos microscópicos con la capacidad de crecer de manera longitudinal y de ramificarse, los cuales se disponen para dar origen a las diferentes estructuras macroscópicas que logramos observar (García, 2004).

Las hifas de casi todos los hongos filamentosos están constituidas por tabiques que las dividen en unidades separadas semejantes a células mononucleadas (un núcleo). A estas hifas se las denominan tabicadas. No obstante, existen clases de hongos en la

que sus hifas no contienen tabiques y se muestran como células continuas y largas con muchos núcleos. A estas hifas se las denominan cenocíticas. Inclusive, los hongos que tienen hifas tabicadas poseen aberturas en los tabiques que llevan un continuo de citoplasma de “células” adyacentes y en realidad estos hongos también son organismos cenocíticos. Las hifas tienden a crecer alargándose desde sus extremos. Cada parte de una hifa puede llegar a crecer y al desprenderse un fragmento puede alargarse y formar una hifa nueva. (Tortora, 2007).

a. Ciclo de vida

Los hongos filamentosos tienen la característica de reproducirse de forma asexual por medio de la fragmentación de sus hifas. Además de una reproducción sexual y asexual en la que los hongos forman esporas. De hecho, los hongos suelen identificarse por el tipo de espora. Después de que un hongo filamentosos forme una espora, la espora se separará de la célula de origen y germinará con el objetivo de formar un nuevo hongo filamentosos. Las esporas se forman a partir de las hifas aéreas de modos distintos, de acuerdo a la especie. Pueden ser esporas asexuales o sexuales. Las esporas asexuales nacen de las hifas de un organismo. Al crecer, estos organismos son genéticamente idénticos a sus progenitores. Las esporas sexuales nacen de la unión de los núcleos de dos cepas de sexo opuesto pertenecientes a la misma especie de hongo. Las esporas sexuales son menos frecuentes que las esporas asexuales. Los hongos que crezcan a partir de esporas sexuales poseerán características genéticas de ambas cepas progenitoras (Tórtora, 2007).

b. Condiciones ambientales requeridas para el crecimiento (García, 2004)

- **Oxígeno.** Los hongos necesitan oxígeno para desarrollarse, y se puede decir que la mayoría son aerobios estrictos. Su crecimiento se ve favorecido cuando hay abundante suministro de oxígeno.

- **pH.** Los hongos, en general, tienen un rango muy amplio de la tolerancia al pH. Pueden crecer en concentraciones relativamente altas de ácido, así como en medios bastante alcalinos. El rango de pH para una gran mayoría es de 2.0 a 9.0, pero casi todos crecen mejor en un pH ácido. El pH óptimo se encuentra alrededor de 5.6.
- **Temperatura.** La mayoría de los hongos pueden ser considerados mesófilos, con temperaturas óptimas de crecimiento entre 22 y 30 °C. Algunos hongos patógenos para el hombre y animales tienen una temperatura óptima un poco más elevada, entre 30 y 37 °C. Otros pueden crecer a temperaturas de refrigeración y aún a °C o menos, como los que causan el deterioro de alimentos refrigerados o congelados.
- **Concentración de solutos.** En su mayoría, los hongos pueden crecer en medios cuya concentración de azúcar (o sal) sería inhibitoria para la mayoría de las bacterias. Esta tolerancia a altas concentraciones de soluto hace que los hongos sean importantes en el deterioro de productos alimenticios.

2.2.4 Los colorantes

Los colorantes son aquellos compuestos químicos que tienen un origen ya sea sintético o natural que son solubles en cierto medio utilizado con el fin de impartir un color a los textiles u otros tipos de productos no alimenticios. La evolución en la manufactura desarrolló a la par de la ciencia y se ha visto incrementada conforme se requieren productos con colores de cualidades más resistentes y una mayor calidad (Parra, 2004).

En realidad, las primeras civilizaciones ya utilizaban colorantes naturales, los cuales obtenían de plantas, minerales e incluso animales, para colorearse el cuerpo, pintar utensilios, objetos religiosos, y teñir la ropa. En consecuencia, el teñido es un arte no reciente, que ya se practicaba en Egipto, India, Persia y China desde hace miles de

años. Pero, obviamente, en esos tiempos no había disposición de la variedad de colores con la que se cuenta actualmente. Hoy en día, por suerte, podemos optar entre diferentes tonos, gamas y matices, gracias al creciente desarrollo que han obtenido, desde el siglo XIX, la industria de los colorantes y las técnicas de teñido (DOV, 2007).

Colorantes como contaminantes. Entre los contaminantes se destacan los colorantes. Estos compuestos se diseñan para ser altamente resistentes, incluso a la degradación microbiana, por lo que son difíciles de eliminar en las plantas de tratamiento convencionales (Cortazar *et al.*, 2010). Más de diez mil diferentes tipos de pigmentos y colorantes sintéticos son usados en diferentes industrias como la textil, papelera, cosmética y farmacéutica, entre otras. Muchas actividades industriales liberan grandes cantidades de efluentes, contaminadas con colorantes, al ambiente. La principal fuente emisora de colorantes es la industria textil (Días *et al.*, 2007).

2.2.5 Pigmentos fúngicos

En biología, un pigmento es cualquier molécula que produce color en las células animales, vegetales, bacterianas y fúngicas. Muchas estructuras biológicas, como la piel, los ojos y el pelo en mamíferos contienen pigmentos (como la melanina) localizados en células especializadas denominadas cromatóforos. En mamíferos, son nombrados específicamente Melanocitos. Dentro de los cromatóforos, los pigmentos se hallan en vacuolas o vesículas. En los vegetales, los pigmentos pueden localizarse en diferentes organelas denominadas plástidos. Estas moléculas tienen la capacidad de captar ciertas longitudes de onda y reflejar otras, de acuerdo a su conformación química. Las longitudes que se reflejan son aquellas que los ojos receptionan y que el cerebro interpreta como “color” (Argenbio, 2007).

Los hongos desarrollaron métodos de adaptación que les facilitara la síntesis de una gran variedad de sustancias complejas a partir de un simple suministro de carbono y nitrógeno. Entre sus productos de síntesis podemos encontrar no solo proteínas celulares y materiales de reserva, también con capaces de producir metabolitos secundarios como ácidos orgánicos, antibióticos, micotoxinas y pigmentos (Kuhn, 2003).

2.2.6 Pruebas de toxicidad con bioensayos

En la toxicología y la ecotoxicología se necesita determinar el efecto que produce uno o diversos compuestos químicos (presuntamente tóxicos) sobre los individuos de determinada especie; así como su capacidad de acumularse en los tejidos vivos y, en general, como se comporta en el compartimento biótico del ecosistema. Los experimentos fueron diseñados para este fin y son denominados bioensayos. Este tipo de experimentos se pueden utilizar para determinar la toxicidad de contaminantes para diferentes especies de organismos, registrando la mortalidad que producen, u otros efectos no letales (subletales) que ponen en peligro la supervivencia de los individuos o de las poblaciones en el medio natural, como por ejemplo ejemplos negativos sobre el comportamiento, la reproducción o el metabolismo (Serrano, 2003).

En cuanto a toxicidad acuática se refiere, actualmente se están utilizando varias especies, lo que facilita una mejor valoración toxicológica, además los organismos acuáticos son muy variables en sus respuestas a los contaminantes. La FAO recomienda el uso de organismos planctónicos (algas, protozoos, cladóceros, moluscos, crustáceos, peces, etc) por su tamaño reducido, el mínimo espacio que ocupan, su corto ciclo de vida y porque conocen sus requerimientos nutricionales; adicionalmente, son útiles en bioensayos de bioacumulación por encontrarse en el nivel más bajo de la cadena alimenticia (González, 2012).

Según Serrano (2003), los bioensayos utilizados en ecotoxicología acuática se clasifican en función de su duración y del método que se emplea para añadir el tóxico al agua, de la siguiente manera:

- **Test de flujo:** es el más sofisticado, ya que el medio se va renovando continuamente mediante sistemas de circulación y dosificación automática.
- **Test de renovación o estático con renovación:** en este tipo de bioensayo el medio se renueva periódicamente.
- **Test estático:** son bioensayos generalmente de corta duración en la que los organismos están durante todo el período de experimentación en el mismo medio.
- **Test a largo plazo:** su duración oscila entre 7 días y uno o varios meses; la ventaja que presenta frente a los anteriores es su mayor fiabilidad.
- **Test a corto plazo:** el período de tiempo oscila entre 48 y 96 horas y normalmente se suministra comida a los organismos de experimentación; la gran ventaja de este tipo de bioensayos es la rapidez de los resultados.

2.2.7 Ensayo tóxico con pulga de agua (*Daphnia pulex*)

Los cladóceros son los más utilizados con sus representantes de las especies del género *Daphnia*, estas especies se cultivan fácilmente en laboratorio, son muy sensibles a sustancias tóxicas, presentan un ciclo de vida corto, reproducción de tipo asexual por partenogénesis, un número elevado de crías, tamaño apropiado, y se conoce muy bien su biología y los parámetros ambientales óptimos para su desarrollo. Estas son algunas de las condiciones que lo han convertido en el grupo de organismos ideal para la realización de bioensayos a nivel mundial (González, 2012).

Según Gonzáles (2012) las pulgas de agua poseen un cuerpo ovalado, cubierto parcialmente por un caparazón bivalvo transparente, el cual mudan varias veces durante su ciclo de vida; no presentan segmentación visible, su cuerpo se divide en cabeza, tronco y abdomen; en la cabeza tienen un par de antenas largas bifurcadas terminadas en setas, y en la parte inferior poseen un par de anténulas que permiten diferenciar entre machos y hembras; tienen un ojo compuesto y un ojo simple o naupliar. En el tronco presentan de cinco a seis pares de apéndices, los cuales están cubiertos de setas; el último par permite identificar la especie. Se desplazan con movimiento natatorio. Son organismos filtradores, se alimentan especialmente de partículas suspendidas, bacterias y algas. Una de las características para diferenciar machos de hembras es el tamaño: los machos son más pequeños, tienen las antenas más largas, posabdomen modificado y un par de patas que se usan para la copulación.

Gonzáles (2012) menciona que las etapas o estadios de vida de las pulgas de agua son:

- **Etapas de huevo:** Se inicia cuando los huevos pasan a la cámara de incubación hasta que nacen los organismos completamente formados; tiene una duración aproximada de 24 horas.
- **Etapas de neonato:** Llamada también etapa del recién nacido, empieza cuando nacen los organismos hasta que tienen su primera muda, iniciando así el crecimiento; duración aproximada de 24 a 36 horas.
- **Etapas juvenil:** Es una etapa de continuo crecimiento de los organismos, tienen cuatro o cinco mudas, maduran los órganos reproductores, de manera que se desarrollan los primeros huevos en el ovario y se alistan para su primer parto; duración aproximada de 10 a 12 días.
- **Etapas adulta:** Comienza con el primer parto; tiene una duración de 45 días aproximadamente.

2.3 MARCO CONCEPTUAL

- **Conidios:** Los conidios son estructuras reproductivas asexuales (mitosporas) producidas por la transformación de una levadura vegetativa o una hifa, o por una célula conidiógena especializada, que puede ser sencilla o compleja y elaborada. Los conidios pueden formarse en hifas especializadas llamadas conidióforo (Jawetz *et al.*, 2010).
- **Espora:** propágulo especializado con una mayor capacidad de supervivencia, como oponer resistencia a situaciones adversas o poseer rasgos estructurales que facilitan la dispersión. Las esporas pueden surgir por reproducción asexual (como los conidios, o las esporangiosporas) o sexual. En este último caso, las células haploides de cepas compatibles se unen por un proceso de plasmogamia, cariogamia, y meiosis (Jawetz *et al.*, 2010).
- **Fibras textiles:** se pueden clasificar en sintéticas y naturales. Ambos tipos de fibras son polímeros, es decir, macromoléculas formadas por la unión sucesiva de moléculas pequeñas denominadas monómeros. Las fibras sintéticas (poliéster, nylon) se obtienen por síntesis química (reacción de polimerización) a partir de monómeros seleccionados por el hombre. Las fibras naturales de origen vegetal (algodón y lino) están compuestas por celulosa, un polisacárido que producen las plantas. En tanto que las fibras naturales de origen animal (lana, seda) están formadas por proteínas (DOV, 2007).
- **Hifas:** filamentos tubulares ramificados (2 a 10 μm de ancho) de los hongos; constituyen la forma de crecimiento de mohos. Muchas de las hifas están separadas por paredes porosas transversales o tabiques (septos), pero las hifas de cigomicetos de manera característica tienen pocos tabiques. Las hifas vegetativas o de substrato fijan la colonia y absorben nutrientes. Las hifas aéreas sobresalen de la colonia y poseen las estructuras reproductivas (Jawetz *et al.*, 2010).

- **Micelio:** Es aquella estructura característica de los hongos filamentosos conformada por una masa o conjunto de hifas, o colonia de mohos (Jawetz *et al.*, 2010).
- **Mordiente:** El término mordiente es aplicado a cualquier sustancia de origen natural o sintético que sirva para fijar el colorante a la fibra, de manera uniforme y estable al contacto con la luz y el agua (DOV, 2007).
- **Rizósfera:** En las raíces de las plantas existe una riqueza biológica que se sustenta en los nutrimentos de los exudados de las plantas, proveniente principalmente de la fotosíntesis. La rizósfera es el entorno influido bioquímica y biológicamente por las raíces de la planta, donde proliferan y compiten los microorganismos (Anaya *et al.*, 2001).
- **Suelo:** Material no consolidado compuesto por partículas inorgánicas, materia orgánica, agua, aire y organismos, que comprende desde la capa superior de la superficie terrestre hasta diferentes niveles de profundidad (MINAM, 2013).
- **Suelo agrícola:** Suelo dedicado a la producción de cultivos, forrajes y pastos cultivados. Es también aquel suelo con aptitud para el crecimiento de cultivos y el desarrollo de la ganadería. Esto incluye tierras clasificadas como agrícolas, que mantienen un hábitat para especies permanentes y transitorias, además de flora y fauna nativa, como es el caso de las áreas naturales protegidas (MINAM, 2013).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ÁMBITO DE ESTUDIO

Las muestras de suelo fueron colectadas del centro poblado de Jayllihuaya (Figura 1), que se encuentra ubicado a 3882 msnm, en latitud Sur $15^{\circ} 53' 3.5''$ S y longitud Oeste: $69^{\circ} 58' 4.5''$ W (Portal dePeru.com), en el distrito, provincia y región de Puno, la cual está localizada al sureste del país, con límites por el sur con la región Tacna, por el este con la República de Bolivia y por el oeste con las regiones Cusco, Arequipa y Moquegua.



Figura 1. Zona de muestreo en el centro Poblado de Jayllihuaya en de octubre del 2016.

3.2. MÉTODOS

3.2.1 Obtención de pigmentos fúngicos disueltos en los caldos de cultivo a partir del aislamiento de hongos filamentosos de los suelos del Altiplano peruano

3.2.1.1 Muestreo de suelo. El muestreo se realizó por el método al azar (también llamado método del zigzag) que consistió en recolectar muestras de suelo que luego fueron mezcladas para lograr una muestra compuesta (Ferraris, 2000).

Procedimiento (INTA, 2015). Se seleccionó el área característica o representativa de donde se tomó la muestra (100 m²), luego se utilizó un palín o pala pequeña para una recolección superficial (0 – 10 cm), se tomó de 10 a 20 submuestras por lugar de muestreo de un total de 3, (Figura 2), las cuales fueron juntadas y homogenizadas en un saco para obtener una muestra de 200 a 500 g, a continuación se depositó las muestras en una bolsa plástica nueva y se colocó la muestra en un sitio fresco para evitar pérdida de humedad y modificaciones de temperatura, seguidamente se llevó la muestra lo más pronto posible al laboratorio.



Figura 2. Toma de muestra de suelos de cultivo de papa en el centro Poblado de Jayllihuaya en octubre del 2016.

3.2.1.2 Aislamiento e identificación de hongos

La investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano – Puno.

- **Cultivo de hongos en placa.** El cultivo de microorganismos se basó en proporcionarles las condiciones físicas, químicas y nutritivas adecuadas para que puedan multiplicarse de forma controlada.

Procedimiento. La muestra de suelo fue diluida cinco veces (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5}) en 9 mL de suero fisiológico, de estas, se sembraron por superficie 0.1 mL de las últimas cuatro diluciones en placas de agar PDA (Figura 3) y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 – 20 días para posteriormente observar el crecimiento micelial de los hongos presentes en la muestra (Choque *et al.*, 2015).

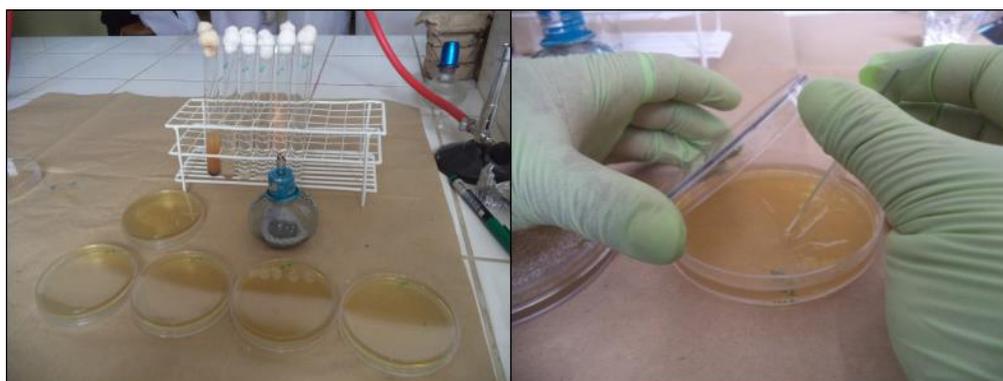


Figura 3. Diluciones de muestra de suelo y cultivo en Agar papa dextrosa en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano Puno en octubre y diciembre del 2016.

- **Microcultivo.** Permitted the identification of filamentous fungi from the observation of microscopic structures, in particular of the asexual spores, without altering them.

Procedimiento. Se cortó y dispuso un cubo de agar estéril sobre un portaobjetos. En los laterales del agar se sembró el hongo a estudiar, poniendo sobre el bloque de agar un cubreobjetos y se colocó todo ello en una placa Petri en cámara húmeda (Figura 4). Tras la incubación de unos días, se tomó el cubre

objetos que llevaba adheridos los filamentos fúngicos que se fueron formando y trepando y se puso sobre un porta objetos, en el que se depositó una gota de azul de lactofenol, para su observación microscópica (Prats, 2008).



Figura 4. Microcultivo de hongos y observación al microscopio en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano Puno en octubre y diciembre del 2016.

- **Claves taxonómicas.** Para la identificación de los hongos productores de pigmentos se utilizó diferentes claves taxonómicas, en las que se tomó en cuenta tanto las características macroscópicas como microscópicas y en especial las estructuras reproductivas, utilizando como referencia la literatura de los siguientes autores Alexopoulos (1996), Barnett et al. (1973) y Arias y Piñeros (2008).

3.2.1.3 Obtención de pigmentos fúngicos disueltos en los caldos de cultivo

- **Cultivo de hongos en caldo.** Los medios de cultivo en caldo o líquidos tienen las mismas propiedades de los medios semisólidos o sólidos, con la única diferencia de que estos no contienen agar, un agente gelificante. Este tipo de medios de cultivo son utilizados para obtener un mayor número de crecimiento microbiano.

Procedimiento. De los cultivos en placa se obtuvo discos de micelio de 10 mm de diámetro que fueron cultivados en un matraz con 50 mL de Caldo Papa Sacarosa (Figura 5), aforados a un volumen de 150 mL, e incubados a temperatura ambiente que osciló entre los 13 y 17 °C, por un periodo de 2

semanas en completa oscuridad, con el objetivo de aumentar en número y producir mayor cantidad de pigmentos fúngicos disueltos en los caldos de cultivo (Choque *et al.*, 2015).



Figura 5. Obtención de discos de micelio y cultivo de hongos en Caldo Papa Sacarosa en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano Puno en octubre y diciembre del 2016.

- Extracción etanólica del pigmento

Para la extracción del pigmento se procedió con la filtración de 45 mL de caldo de cultivo y de cada color de pigmento producido, a estos filtrados se les añadió etanol de 96° en una proporción de 40% de filtrado (solute) y 60% de etanol (solvente) respectivamente, dejando reposar la mezcla total de 30 ml por un periodo de 24 horas, a su término, la mezcla se centrifugó (centrífuga marca Hettinch modelo EBA 20) a 3700 RPM por 30 minutos (Figura 6) para poder descartar los restos fúngicos y obtener solo los pigmentos producidos.

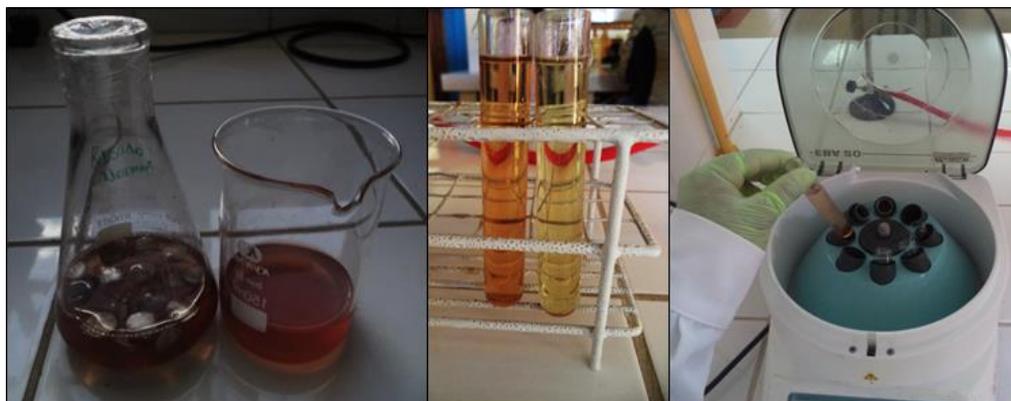


Figura 6. De izquierda a derecha: Filtrado de pigmento, mezcla de pigmentos fúngicos disueltos en los caldos de cultivo con etanol y centrifugado de pigmentos fúngicos disueltos en los caldos de cultivo en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano Puno en octubre y diciembre del 2016.

3.2.2 Evaluación de la afinidad de los pigmentos fúngicos en caldo de cultivo frente a fibras naturales:

Mordentado y teñido

En la mayoría de los casos, para lograr la unión del colorante a la fibra, se utilizan los mordientes. Es decir, sustancias de origen natural o sintético que capturan y fijan el color a las fibras o prendas, dando solidez al lavado y a la luz, de ahí su necesidad de uso durante este proceso (Cedano y Villaseñor, 2006).

Procedimiento. Se realizó un mordentado con 200 g de alumbre, 300 mL de jugo de limón, 100 g de sal por Kg de fibra utilizada (Melgar, 2011) y agua en proporción a la cantidad de fibra. La mezcla adicionada a la fibra natural fue sometida a hervor por un periodo de 10 minutos. Seguidamente se incorporó 1 g de la fibra natural de *Ovis orientalis* (oveja), *Lama glama* (llama) y *Vicugna pacos* (alpaca) en las soluciones con pigmentos fúngicos disueltos en los caldos de cultivo, extraídos por 24 horas (Figura 7), al término de este periodo se sometió la tela a secado y fijación con calor (Choque *et al.*, 2015).



Figura 7. De izquierda a derecha mordientes y mordentado y teñido de fibras naturales con los pigmentos fúngicos disueltos en los caldos de cultivo en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano Puno en octubre y diciembre del 2016.

3.2.3 Evaluación de la toxicidad de los pigmentos fúngicos disueltos en los caldos de cultivo producidos por hongos

Uno de los organismos más corrientemente usados en bioensayos acuáticos es la pulga de agua, un crustáceo cladóceros particularmente sensible a numerosos compuestos químicos. La pulga de agua (*Daphnia pulex*) pertenece al orden Cladóceros, que vive en las aguas dulces, es empleado como organismo de ensayo para llevar a cabo un método de referencia. Ésta es un componente importante de las comunidades acuáticas y es sensible a un amplio rango de contaminantes. Su pequeño tamaño, ciclo de vida corto y facilidad de cultivo, lo hacen un organismo de elección (Velandia, 2010).

Procedimiento. Para la prueba se recolectaron muestras de agua con pulgas de agua del puerto de la ciudad de Puno en el lago Titikaka (Anexos Figura A.2). Las muestras de agua con las pulgas, fueron aclimatadas en frascos de vidrio por un lapso de 10 días a temperatura ambiente que osciló entre los 13 y 17 °C durante el día, y durante la noche fueron conservadas en una caja de tecnopor para mantener la temperatura alrededor de los 13 °C, estos procedimientos se realizaron en el Gabinete de Zoología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNA – Puno.

Las hembras partenogénicas fueron reconocidas por su mayor tamaño (1 – 1.3 mm aproximadamente) que fueron de mayor tamaño que los neonatos (0.6 – 0.8 mm aproximadamente) (Gamez y Ramírez, 2008), seguidamente se prepararon concentraciones de 100%, 50%, 25%, 12.5% y 6.25% de pigmento de 30 mL cada una en vasos de prueba, para posteriormente determinar la concentración letal media (CL₅₀), mediante el método Probit (Sierra, 2011). Se transfirió 10 neonatos en cada uno de ellos (Figura 9) y se mantuvieron a temperatura ambiente por 48 horas, luz fluorescente blanca, y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad, a su término se registró el número de organismos muertos. Con esta información se estableció el intervalo de

concentración en el cual se podía esperar el 0 y el 100% de mortalidad. Para los cálculos se realizó el Análisis Weibull que midió la CL_{50} (concentración letal media) (Ramírez y Mendoza, 2008).



Figura 8. Inoculación y sometimiento de pulgas a diferentes concentraciones de pigmento en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano Puno en octubre y diciembre del 2016.

Para contrastar la toxicidad originada por las concentraciones de pigmento en organismos de pulgas de agua, se aplicó la prueba de Kruskal Wallis y su correspondiente prueba de contraste y así determinar entre que concentraciones hubo diferencias, se realizó con un nivel de confianza del 95%.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 PIGMENTOS FÚNGICOS DISUELTOS PRODUCIDOS POR HONGOS
FILAMENTOSOS DE LOS SUELOS DEL ALTIPLANO PERUANO

4.1.1 Aislamiento de hongos productores de pigmento

Los suelos del Altiplano Peruano, representado en esta investigación con los ubicados en el Centro Poblado (C. P.) de Jayllihuaya, distrito y provincia de Puno, presentaron un amplio número de hongos filamentosos (Anexos Figura A.1), llegando a un recuento total de 15×10^2 UFC/g de suelo evaluado. De todos los hongos filamentosos aislados, sólo dos hongos fueron capaces de producir pigmentos fúngicos disueltos en los caldos de cultivo, entre ellos con coloraciones amarilla y naranja (Figura 9).

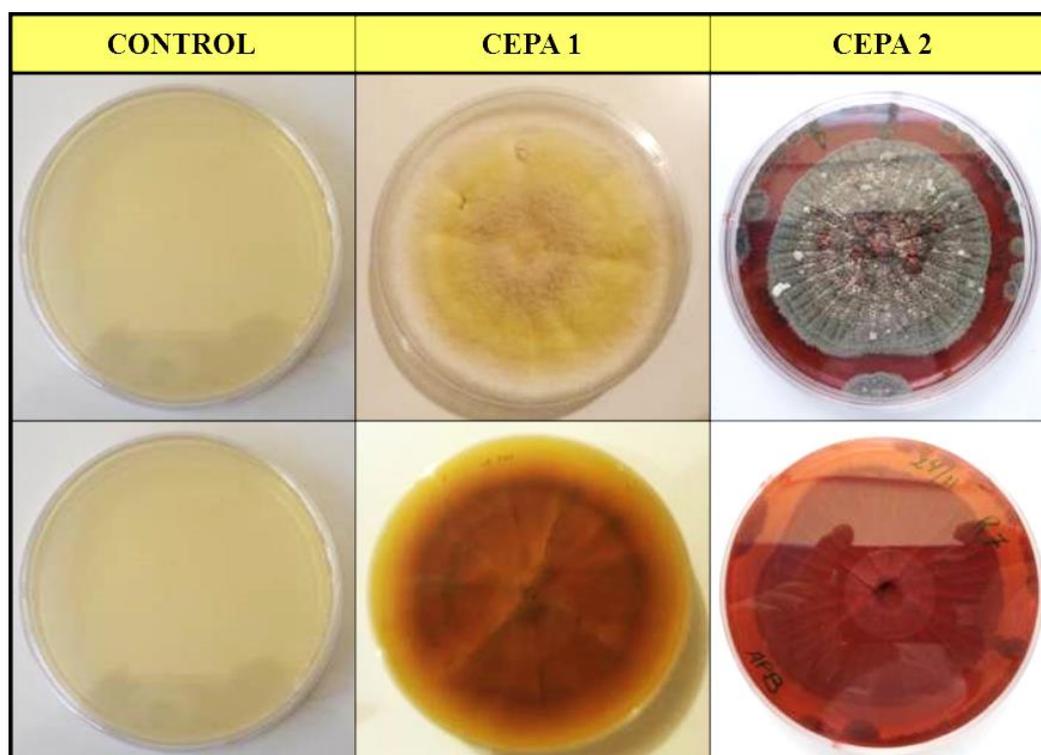


Figura 9. Medio de cultivo control y cepas puras de los hongos productores de pigmento (cepa 1 *Fusarium* sp y cepa 2 *Penicillium* sp) en agar papa dextrosa, en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano Puno en octubre y diciembre del 2016.

En esta investigación, se encontró un total de 15 géneros diferentes de hongos filamentosos, estos resultados fueron diferentes a los reportados por Villanueva *et al.* (2013), quienes reportan en tres localidades de México, alrededor de 50 hongos aislados, resultando diferente debido a que las zonas de muestreo presentaron mejores condiciones climatológicas ya que las localidades se ubicaron entre los 1061 y 3080 msnm, y el C. P. de Jayllihuaya se ubica sobre los 3809 msnm y como se sabe las diferencias climatológicas en temperatura ambiental, humedad y radiación, hace variar las condiciones favorables para la presencia de microorganismos. Asimismo, fue diferente a los reportados por Arias y Piñeros (2008), quienes aislaron e identificaron hongos filamentosos originarios de los Páramos de Guasca y Cruz Verde, con la finalidad de contribuir al conocimiento e investigación científica de la microflora colombiana, logrando aislar 129 aislamientos de hongos filamentosos, al igual que el anterior antecedente las condiciones climatológicas y las características físicas y químicas de los suelos hace que varíen las cargas microbianas.

En la región de Ica, Choque *et al.* (2015), registraron ocho especies de hongos productores de pigmentos, esta diferencia probablemente se deba a las mejores condiciones ambientales, como un clima más cálido en Ica llegando a oscilar entre 16.8 y 24.6 °C y en Puno entre 11.1 °C y 12.9 °C, así como también mayor humedad de 75 y 86% en Ica y 39 y 68% en Puno (MPG, 2015), por lo tanto existe mayor cantidad de vegetación y materia orgánica, y así un mayor número de microorganismos presentes en los suelos. Un suelo con mayor cantidad de vegetación traerá consigo variedad de exudados rizosféricos (proteínas, aminoácidos, azúcares, metabolitos secundarios e incluso gases (Walker *et al.*, 2003), que contribuyen generalmente a un incremento de las densidades poblacionales de los microorganismos (Primavesi, 1984; Marschner *et al.*, 2004; Reyes *et al.*, 2007).

De acuerdo a la literatura (Marschner, 1995), otro factor importante respecto al crecimiento de microorganismos fúngicos podría ser la disponibilidad de carbono, puesto que el 30 - 60 % del carbono neto fotosintetizado es conducido hacia la raíz, y de ese carbono, una proporción considerable es liberada como carbono orgánico a la zona rizosférica (Walker *et al*, 2003), siendo así la competencia por carbono la más importante con respecto al control de hongos debido a que ocasiona el fenómeno llamado fungiostasis, que consiste en la inhibición de la germinación de esporas de hongos en el suelo (Lindemann *et al.*, 1983). Las bacterias en comparación con otros microorganismos se caracterizan por su rápido crecimiento y habilidad de utilizar un amplio rango de sustratos como fuentes de carbono o nitrógeno (Glick, 1995), lo cual les da una ventaja frente a las poblaciones de hongos.

El antagonismo entre microorganismos diferentes también es una razón por la cual puede disminuir el número de hongos presentes en el suelo, puesto que la mayoría de bacterias que habitan este medio poseen características que les permiten actuar como antagonistas pues son capaces de suprimir el efecto de los patógenos del suelo que causan enfermedades por medio de la excreción de metabolitos antifúngicos (por ejemplo: terpenos y jasmonatos) que colaboran directa o indirectamente con el crecimiento de las plantas (Gupta *et al.*, 2000), ejemplos de este tipo de bacterias son *Azotobacter* y *Streptomyces* que actúan como antagonísticos frente a hongos del género *Fusarium* (Taechowisan, *et al.*, 2005), como también bacterias del género *Pseudomonas* y *Bacillus*, las cuales juegan un papel importante en el control biológico de enfermedades de plantas (Thomashow y Weller, 1995).

Así mismo, muchos autores atribuyen la solubilización de fosfato inorgánico insoluble por los microorganismos, a la producción de ácidos orgánicos y ácidos quelantes de azúcares, la producción de estos ácidos orgánicos resulta en la acidificación de la célula microbiana y el medio que la rodea (Yadav y Dadarwal, 1997). Por tanto, un

suelo pobre en contenido bacteriano será más alcalino, desfavoreciendo así el crecimiento de poblaciones de hongos que se desarrollan mejor en medios ácidos.

4.1.2 Identificación de hongos

Luego de realizar las técnicas de microcultivo y las tinciones con azul de lactofenol, y observando los órganos reproductores de los hongos filamentosos y compararlos con la guía de Barnett (1973), se identificó que los hongos aislados productores de pigmentos fúngicos disueltos en los caldos de cultivo, pertenecieron al género *Fusarium* sp (Figura 10) y al género *Penicillium* sp (Figura 11).

La investigación refiere de dos géneros micóticos *Fusarium* sp y *Penicillium* sp, estos son diferentes a los mencionados por Villanueva *et al.* (2013), quienes indican que los productores de pigmentos aislados pertenecieron a las especies *Phoma herbarum* y *Gibberella* sp; asimismo González *et al.* (2009), quienes indican de los hongos filamentosos *Monascus* spp, *Paecilomyces* spp, *Aspergillus* spp y *Penicillium* spp, éste último coincidente con esta investigación, como productores de pigmentos como son las melaninas, betalainas, quinonas, xantinas, flavonoides, curcuminoides, carotenoides, isocromos e iridoides, los cuales tienen especial interés industrial y alimenticio; por otro lado, Choque *et al.* (2015), reportan a los géneros *Penicillium* sp, *Aspergillus* sp, *Cladosporium* sp y *Fusarium* sp, dos de los géneros coincidentes con los reportados en la presente investigación.



Figura 10. Izquierda: Esquema de la estructura de hongos del género *Fusarium* según la guía de Barnett (1973). Derecha: Esquema que ilustra la estructura del hongo productor de pigmento amarillo al microscopio en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano Puno en octubre y diciembre del 2016.



Figura 11. Izquierda: Esquema de la estructura de hongos del género *Penicillium* según la guía de Barnett (1973). Derecha: Esquema que ilustra la estructura del hongo productor de pigmento naranja al microscopio en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano Puno en octubre y diciembre del 2016.

La capacidad que poseen los hongos filamentosos en la producción de pigmentos, radica en su actividad metabólica, produciendo así gran cantidad de metabolitos primarios como secundarios (entre ellos los pigmentos), además que poseen el potencial de producción extracelular, facilitando los procesos fermentativos y los altos rendimientos (Carvalho *et al.*, 2003).

Como la producción de pigmentos está relacionada con el metabolismo, este proceso fisiológico se atribuiría a la presencia de una fuente de carbono ya que Velmurugan (2011), reporta haber preparado el medio agar extracto de malta conteniendo sacarosa como fuente de carbono, y ello agrandó la producción de pigmentos amarillos en cinco distintas cepas productoras (*Monascus purpureus*, *Paecilomyces farinosus*, *Emericella nidulans*, *Fusarium moniliforme* y *Penicillium purpurogenum*), paralelamente se indica que la presencia de sacarosa induce a efectos positivos en la producción de pigmentos por hongos del género *Monascus* (Velázquez, 2013).

Benavente (2011) quien reportó la mayor producción de pigmentos amarillos por *Penicillium pinophilum* utilizando como fuente de carbono sacarosa. Lo cual coincide con lo realizado en esta investigación al haber preparado la producción de pigmentos en medios de cultivo líquido con sacarosa y papa, en el que la sacarosa es utilizada como fuente de carbono, por todo ello el medio de cultivo influye en la producción de pigmentos, ya que se reporta que, en medios de arroz, no se alcanzaron niveles de producción apreciables, así como también en el medio de agar Czapek con extracto de levadura (Velázquez, 2013).

En esta investigación se tuvo dificultades para cuantificar la producción de pigmentos fúngicos disueltos en los caldos de cultivo por los hongos aislados, pero tal cuantificación es posible a metodologías especializadas, es así que se registra que, de 9 hongos productores de pigmentos de tipo húmico, destacan a la especie *Eurotium echinulatum*, quien produce una elevada producción de 3 g/litro de medio de cultivo (Sáiz, 1975), por otro lado, Solano (2010), reporta producciones de pigmento de color morado dentro de los micelios de *Fusarium verticillioides* en cantidades de 50 g/litro

4.1.3 Obtención de pigmentos fúngicos disueltos en los caldos de cultivo

El cultivo de hongos filamentosos de los géneros *Penicillium* sp y *Fusarium* sp se realizó en el medio de cultivo líquido sacarosa papa (Figura 14), estos hongos, produjeron pigmentos fúngicos disueltos en los caldos de cultivo, de colores anaranjado y amarillo respectivamente. A diferencia de los resultados, Villanueva *et al.* (2013), indicaron hongos y colores diferentes, entre ellos mencionan a los géneros *Phoma herbarum* Westend. y *Gibberella* sp, quienes produjeron pigmentos de color rojo – púrpura; Méndez *et al.* (2007), produjeron pigmentos de color rojo usando la cepa xerofílica *Penicillium purpurogenum*. Asimismo, en la investigación se obtuvo que la producción de pigmentos a partir de los hongos, a partir del 15° día de incubación; en contraste se obtuvo que *Gibberella zeae*, obtuvo mayormente los pigmentos entre los 4 y 5 días de experimentación, esto debido probablemente a que las condiciones óptimas del crecimiento del hongo se determinaron a los 28 °C y a un pH de 6 unidades Villanueva *et al.* (2013).

Sin embargo, coincide con lo reportado por Choque *et al.* (2015), quienes no solo obtienen la producción de pigmento en este mismo tiempo, sino también reportan a los hongos de género *Fusarium* sp como hongos productores de pigmentos y producen una amplia gama de diferentes colores tales como el color púrpura, de color rojo (Malik *et al.*, 2012), y un violeta al morado intenso (Levic *et al.*, 1994), confirmando así la capacidad de este hongo de producir pigmentos como el amarillo encontrado en este estudio.

En esta investigación se cita a hongos filamentosos del género *Penicillium* sp, estos hongos son también reconocidos como hongos productores de pigmentos fúngicos disueltos en los caldos de cultivo y producen una amplia gama de diferentes colores, lo cual coincide con la investigación, como son Méndez *et al.* (2007) encontraron que

los hongos de este género, producían pigmentos de color rojo, Choque *et al.* (2015) encontraron que producen pigmentos de los colores marrón, amarillo, amarillo oscuro y rojo, por otro lado Poorniammal *et al.*, (2013) encontraron que producían pigmentos amarillos confirmando así la capacidad de este hongo de producir pigmentos como el naranja encontrado en este estudio.



Figura12. De izquierda a derecha: caldo control y cultivos en caldo sacarosa papa con producción de pigmentos fúngicos disueltos en los caldos de cultivo naranja y amarillo, en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano Puno en octubre y diciembre del 2016.

Al emplear microorganismos, particularmente los hongos filamentosos, su gran diversidad, versatilidad bioquímica y adaptación a condiciones no favorables de crecimiento los hacen excelentes substitutos en la obtención de colorantes por la vía de síntesis química (Méndez *et al.*, 2007) presentando ventajas sobre otros pigmentos (sintéticos) tales como, mayor estabilidad a la luz, al pH, a la temperatura, entre otras (Wani *et al.*, 2004). Los cambios de condiciones de crecimiento, como el someter a estrés a las cepas de hongos productores de pigmentos juega un papel importante; Babitha *et al.* (2007) en su estudio sobre el estrés en el crecimiento, la producción de pigmento y la morfología de *Monascus* sp. en cultivos sólidos, explica como las células fueron expuestas a alta temperatura, alta concentración de glicerol y sal, se observaron cambios significativos en la producción y el crecimiento del pigmento. La alta temperatura (>45 °C) indujo la producción de más pigmentos amarillos. La

concentración alta de conidio inducido por NaCl causó una disminución en la biomasa fúngica (hasta el 50%), pero la producción de pigmento rojo aumentó. Cuando se sometió a estrés con glicerol, se observó un aumento significativo en el micelio aéreo cuando se comparó con las condiciones de control.

El manejo genético se constituye en una alternativa en la producción de pigmentos, mediante el sometimiento a tratamientos físicos o químicos de mutación que podría alterar su genoma, logrando así incrementar la producción de un metabolito, aunque también pueden disminuirla o incluso suprimirla (Doran, 1998), con estas aplicaciones, es posible obtener hasta 500 veces más cantidad de un colorante natural, luego de descubrir las bases moleculares para la producción de uno de estos compuestos (Moya, 2014).

Respecto al tipo de pigmentos fúngicos disueltos en los caldos de cultivo producidos y su composición química no solo por hongos del género *Penicillium* y *Fusarium* sino también por la mayoría de hongo filamentosos productores de pigmentos, necesitan ser mejor estudiados, es así que Marín *et al.* (2015) lograron caracterizar parcialmente el pigmento amarillo fluorescente producido por *Penicillium* sp utilizando el análisis espectroscópico del extracto purificado, que les permitió sugerir la existencia de una mezcla de dos derivados de antraquinona (parietin y emodin) como componentes principales del pigmento producido por *Penicillium*. Se puede afirmar que, entre todos los pigmentos presentes en los organismos vivos, los carotenoides y las clorofilas son los más abundantes y se encuentran distribuidos tanto en tejidos fotosintéticos como no fotosintéticos (siendo responsables del color amarillo, naranja y rojo de la mayoría de frutos), en bacterias, algas, hongos y animales (Mínguez, 2005). En *Fusarium verticillioides*, los pigmentos se producen gracias a la presencia activa de la vitamina A, ya que los carotenoides pueden estar presentes pero inactivos (Miller, 1961).

Respecto a los tipos de pigmentos producidos por hongos que presentan afinidad hacia las fibras textiles, estos pueden ser diversos, entre ellos se menciona a las quinonas viopurpurina producidas por *Aspergillus sulphureus* que producen los colores negro y púrpura o las quinonas oxifrenolicina de *Streptomyces roseotulvus* que producen un color anaranjado (Cedano y Villaseñor, 2006).

De lo anteriormente señalado, se acepta la hipótesis planteada, puesto que los suelos del Altiplano peruano si poseen hongos filamentosos productores de pigmentos.

4.2 AFINIDAD DE LOS PIGMENTOS FÚNGICOS FRENTE A FIBRAS NATURALES

El teñido se logró en fibras hiladas de animales como *Ovis orientalis* (oveja) (Figura 13), *Lama glama* (llama) (Figura 14) y *Vicugna pacos* (alpaca) (Figura 15), tanto en forma suelta como en forma tejida, pasadas las 24 horas y secadas las fibras al calor, tornándose del color de los pigmentos. Estos resultados concuerdan con los reportados por Choque *et al.* (2015), quienes también lograron exitosamente con pigmentos fúngicos de *Cladosporium* sp (marrón oscuro), *Penicillium* sp (marrón, amarillo, amarillo oscuro y rojo), *Fusarium* sp (púrpura) y *Aspergillus* sp (anaranjado), en telas de algodón Pyma.

Asimismo, Velmurugan *et al.* (2011), aplicaron estos pigmentos en hilados de algodón obteniendo un máximo teñido con el pigmento rojo de *Monascus purpureus* seguido del pigmento amarillo de *Penicillium purpurogenum* (amarillo). Estos investigadores, indicaron que estos eventos de tinción, mucho tiene que ver el efecto del mordiente en el teñido, ya que así se obtienen fuertes variaciones en la sombra y la profundidad del color mediante un premordentado con alumbre y sulfato ferroso que les dio a los hilados de algodón mejores propiedades de solidez de lavado en comparación con el

postmordentado o sin un mordiente. *Thermomyces* sp., otro hongo productor de pigmento amarillo ha sido utilizado para procesos de teñido; la capacidad de teñido de sus pigmentos se evaluó en tejidos de algodón, seda y lana, en la que este tipo de pigmento mostró una alta afinidad con las telas de seda (Poorniammal *et al.*, 2013).



Figura 13. Teñido de fibras de *Ovis orientalis* con los pigmentos fúngicos disueltos en los caldos de cultivo. De izquierda a derecha: fibras en forma suelta y tejida teñidas con pigmento amarillo, fibras control en forma suelta y tejida y fibras en forma suelta y tejida teñidas con pigmento naranja en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano Puno en octubre y diciembre del 2016.



Figura 14. Teñido de fibras de *Lama glama* con los pigmentos fúngicos disueltos en los caldos de cultivo. De izquierda a derecha: fibras en forma suelta y tejida teñidas con pigmento amarillo, fibras control en forma suelta y tejida y fibras en forma suelta y tejida teñidas con pigmento naranja, en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano Puno en octubre y diciembre del 2016.



Figura 15. Teñido de fibras de *Vicugna alcos* con los pigmentos fúngicos disueltos en los caldos de cultivo. De izquierda a derecha: fibras en forma suelta y tejida teñidas con pigmento amarillo, fibras control en forma suelta y tejida y fibras en forma suelta y tejida teñidas con pigmento naranja en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano Puno en octubre y diciembre del 2016.

Roquero (1995), manifiesta que las fibras de origen animal conformadas por proteínas poseen un carácter ácido y básico, donde el carácter ácido hace que absorba los tintes básicos, pero que no es tan marcada como para provocar una atracción espontánea de las dos partes. A pesar de poseer esa capacidad, ciertos mordientes a base de sales metálicas refuerzan el teñido, coincidiendo con nuestros resultados, ya que en esta investigación se utilizó mordientes como alumbre, sal y limón, incrementando la fijación del colorante a la fibra, de manera uniforme y estable al contacto con la luz y el agua. Al colocarlo en el agua caliente, el mordiente se disuelve. En ese proceso, la sal se disocia, y el metal queda como catión metálico (ion positivo), entonces, el catión se une a la fibra textil, y forma un complejo con la molécula de colorante. El tipo de metal que forme parte del complejo determina la tonalidad del color. Es decir, para un mismo tipo de colorante y fibra, el agregado de distintos mordientes producirá diferentes tonos o colores (DOV, 2007).

Granillo *et al.* (2007), reafirman que el efecto de la adición de diferentes solventes y de micronutrientes como zinc, calcio y cobre, influyen en la producción de pigmento, ya

que obtuvieron como resultado que el pigmento amarillo es soluble en metanol, acetona además de agua y es parcialmente soluble en cloroformo. Respecto a la adición de calcio como micronutriente en el cultivo de los hongos, puede incrementar la producción del pigmento y disminuir ante la presencia de cobre en cantidades superiores a 0.15 g/L, pudiendo inhibir el crecimiento del hongo.

Según Sánchez (2015), afirma que los pigmentos naturales producidos por microorganismos tienen más ventajas, ya que los colorantes sintéticos originan muchas veces procesos alérgicos o de hiperactividad en niños, por lo que los pigmentos microbianos no traen consigo estas alteraciones. Más bien, el gran problema en la producción de pigmentos naturales (plantas y animales) es durante el escalamiento, ya que requiere de áreas de cultivo muy grandes para recuperar poca cantidad de pigmento vegetal, estos problemas podrían ser solucionados ya que los hongos producen pigmentos en espacios reducidos, en forma continua durante todo el año, a diferencia de las plantas que se realizaría en ciertos meses del año, debido a las necesidades de condiciones ambientales como las lluvias.

De lo anteriormente señalado, se acepta la hipótesis planteada, puesto que los pigmentos fúngicos disueltos en los caldos de cultivo producidos por hongos aislados de los suelos del Altiplano peruano si presentan potencial como colorantes textiles.

4.3 TOXICIDAD DE LOS PIGMENTOS EN MICROCRUSTÁCEOS DE *Daphnia pulex* (PULGA DE AGUA)

Los pigmentos fúngicos disueltos en los caldos de cultivo producidos por los dos hongos aislados, tanto *Penicillium* sp y *Fusarium* sp, resultaron ser tóxicos a las pulgas de agua (*Daphnia pulex*). A bajas concentraciones (6.25%), la mortalidad osciló entre 60 y 70%, a concentraciones de 12.50% se observó una mortalidad que varió entre 80

y 90%, a la concentración de 25%, un 90% de mortalidad y de 50 a 100%, la mortalidad fue del 100% (Tabla 1), por tanto, se afirma que, al incrementar la concentración, la mortalidad se incrementa. Los resultados de la prueba de Kruskal Wallis, hace que se infiera indicando que las mortalidades presentaron diferencia significativa ($H = 15.84$; $GL = 5$; $P = 0.0051$), y al realizar la prueba de contraste, se determinó que las concentraciones 6.25, 12.50 y 25.00 y las concentraciones 12.50, 25.00, 50.00 y 100.00% no presentaron diferencia significativa y entre los tratamientos 6.25 y 50.00 y 100.00% si presentaron diferencia estadística significativa (Figura 16). La concentración letal media de los pigmentos fúngicos disueltos en los caldos de cultivo producidos por *Penicillium* sp, fue de 6.56 %, y los pigmentos producidos por *Fusarium* sp fue de 8.14 %.

Tabla 1. Mortalidad de pulgas de aguas al contacto con el pigmento producido por hongos del género *Penicillium* sp, en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano Puno en octubre y diciembre del 2016.

Concentración del pigmento (mL)	Concentración (%)	Pulgas vivas	Pulgas muertas	Mortalidad (%)
0.00	0.00	9	1	10.00
0.00	0.00	9	1	10.00
0.00	0.00	9	1	10.00
1.88	6.25	4	6	60.00
1.88	6.25	3	7	70.00
1.88	6.25	4	6	60.00
3.75	12.50	2	8	80.00
3.75	12.50	2	8	80.00
3.75	12.50	1	9	90.00
7.50	25.00	1	9	90.00
7.50	25.00	1	9	90.00
7.50	25.00	1	9	90.00
15.00	50.00	0	10	100.00
15.00	50.00	0	10	100.00
15.00	50.00	0	10	100.00
30.00	100.00	0	10	100.00

30.00	100.00	0	10	100.00
30.00	100.00	0	10	100.00

Tabla 2. Mortalidad de pulgas de aguas al contacto con el pigmento producido por hongos del género *Fusarium* sp, en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano Puno en octubre y diciembre del 2016.

Concentración del pigmento (mL)	Concentración (%)	Pulgas vivas	Pulgas muertas	Mortalidad (%)
0.00	0.00	9	1	10.00
0.00	0.00	9	1	10.00
0.00	0.00	9	1	10.00
1.88	6.25	5	5	50.00
1.88	6.25	3	7	70.00
1.88	6.25	4	6	60.00
3.75	12.50	3	7	70.00
3.75	12.50	3	7	70.00
3.75	12.50	2	8	80.00
7.50	25.00	1	9	90.00
7.50	25.00	2	8	80.00
7.50	25.00	2	8	80.00
15.00	50.00	1	9	90.00
15.00	50.00	0	10	100.00
15.00	50.00	1	9	90.00
30.00	100.00	0	10	100.00
30.00	100.00	0	10	100.00
30.00	100.00	0	10	100.00

La concentración letal (CL_{50}) de los pigmentos producidos por hongos del género *Penicillium* sp, sobre individuos de pulgas de agua fue de 5.55% a las 48 horas; mientras que la CL_{50} de los pigmentos de hongos del género *Fusarium* sp fue de 8.64% (Figura 17). Estos resultados según lo indicado por Sierra (2011), los dos pigmentos estarían clasificados como muy tóxicos. Esta toxicidad se debería probablemente a presenta una actividad antimicrobiana, similar a la molécula 6 – pentil – α – pirona (6PP), producido por hongos del género *Trichoderma*, que posee cierta toxicidad en la membrana celular (Bonnarme *et al.*, 1997).

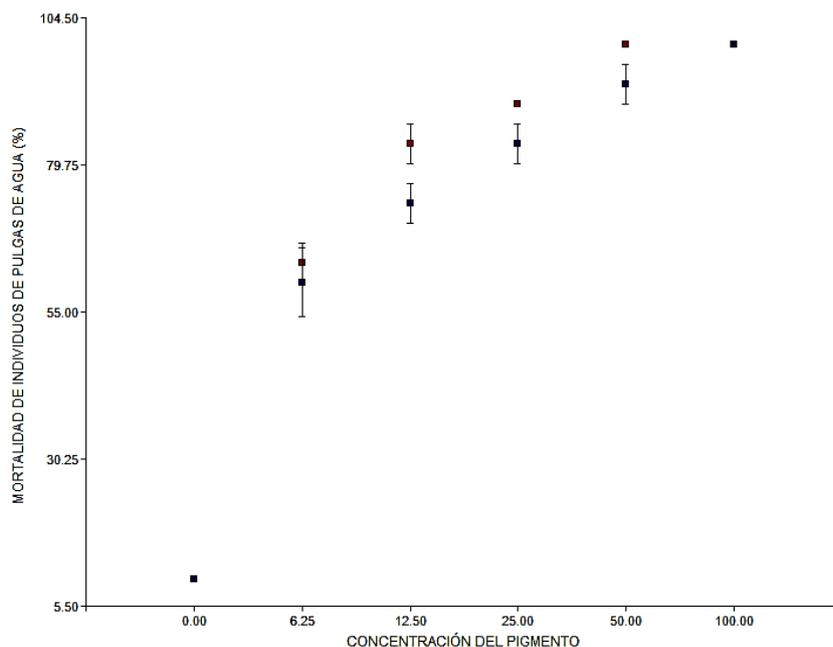


Figura 16. Mortalidad de pulgas de aguas en concentraciones crecientes del pigmento de los hongos *Penicillium* sp. (recuadros rojos) y *Fusarium* sp. (recuadros azules), en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano Puno en octubre y diciembre del 2016.

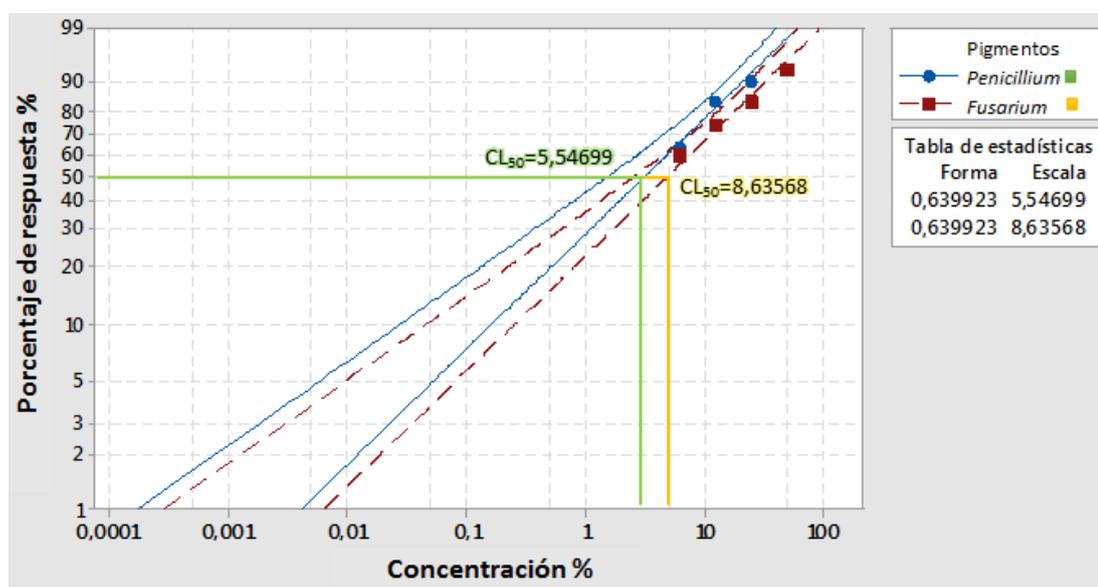


Figura 17. Gráfica de relación concentración - porcentaje de mortalidad del pigmento producido por *Penicillium* sp y *Fusarium* sp frente a pulgas de agua (*Daphnia pulex*), en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano Puno en octubre y diciembre del 2016.

Los hongos aislados en esta investigación (*Penicillium* sp y *Fusarium* sp), resultaron ser tóxicos a las pulgas de agua, esto se debería a que los hongos

sintetizan muchos productos derivados de su metabolismo secundario (Calvo *et al.*, 2002), entre ellos se mencionan ciertos antibióticos, enzimas y colorantes (Villanueva *et al.*, 2013), asimismo, puede deberse a que los hongos filamentosos producen como metabolitos secundarios no solo pigmentos sino también toxinas o antibióticos (Kuhn, 2003), no obstante, el uso de etanol en el experimento al tiempo de actuar como disolvente en la producción de pigmentos también puede actuar como antifúngico dándole así a las fibras la cualidad de poder ser utilizadas sin producir algún efecto adverso.

Algunas especies de *Fusarium* pueden presentar en medios de cultivo sintético, colonias blancas, cremas, naranjas, pardo, pardo rojizo, rojo carmín, rosa, púrpura, e incluso azuladas, lo que implica que sus pigmentos pueden estar dentro del micelio o liberarlo en el medio de cultivo en el cual crece el hongo, como el caso de *Fusarium graminearum*, quien posee el pigmento asociado con la síntesis de la toxina aurofusarina, una naftoquinona presente en granos forrajeros contaminados y asociado con el cambio de la yema de huevo de naranja amarillento a pardo oscuro. Algunos de los pigmentos fúngicos disueltos en los caldos de cultivo producidos por *Fusarium solani* pueden tener actividad antimicrobiana contra hongos y bacterias por lo que no se descarta que los pigmentos producidos por *F. graminearum* también lo tengan (Villanueva *et al.*, 2013), terminando en la mortalidad de las pulgas de agua, tal como se observó en la investigación.

Asimismo, desde hace mucho tiempo atrás se viene usando al hongo *Monascus* spp, como cultivo iniciador en la producción de cerveza de vino de arroz rojo, y los pigmentos fueron utilizados como colorante alimentario natural en el Este de Asia (Dufossé, 2006). En la investigación *Penicillium* sp produjo pigmentos fúngicos disueltos en los caldos de cultivo de color anaranjado y *Fusarium* sp amarillos, estos resultados fueron similares a los producidos por hongos del género *Monascus* ya que

entre los pigmentos se mencionan a seis compuestos importantes, incluyendo los amarillos de monascin (Chen *et al.*, 1971), ankaflavin (Manchand *et al.*, 1973), naranjas de monascorubrin (Hadfield *et al.*, 1967), rubropunctatin (Haws y Holker 1961), los rojos de monascorubramine (Hiroi *et al.*, 1975) y el rubropunctamine (Fowell *et al.* 1956); asimismo este hongo produce también una micotoxina denominada citrinina, lo cual ha limitado su aplicación en alimentos (Liu *et al.*, 2005). *Verticillium lecanii*, produce enzimas con actividad amilolítica, quitinolítica, lipolítica, proteolítica, corroborándose mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (Shimizu *et al.*, 1993). Estas y otras sustancias similares producidos por los hongos aislados en la investigación, serían las causantes de la muerte de las pulgas de agua.

En la búsqueda de pigmentos naturales para el uso alimentario y cosmético, los metabolitos microbianos son una fuente prometedora de compuestos. Actualmente, los pigmentos producidos por los microorganismos y utilizados comercialmente son la riboflavina (vitamina B2, un pigmento amarillo), las cuales son producidas por *Eremothecium ashbyii* y *Ashbya gossypii*. Los pigmentos de *Monascus purpureus* y *M. ruber*, produce carotenoides (pigmentos amarillos) (Jacobson, 1994). Morales (2011), reporta entre los pigmentos microbianos más comunes podemos citar a los carotenoides, flavonoides, pigmentos proteicos, azafilonas, antraquinonas, entre otros.

Según Acosta *et al.* (2010), los metabolitos primarios y secundarios producidos por hongos del género *Pycnoporus* son variados y dependerían de la especie y condiciones de cultivo a la cual son sometidos. El pigmento anaranjado producido por el hongo *Pycnoporus sanguineus* puede poseer aplicaciones importantes en las industrias alimentaria, farmacéutica o biotecnológica por su actividad biológica, tanto antiviral, antioxidante, antifúngica y antibacteriana, además de poseer su importancia en la industria de los biocolorantes obtenidos de fuentes biológicas.

Recientemente, se demostró que los pigmentos sintetizados por *Monascus* spp. presentan actividad antibacteriana, contra el cáncer, y agentes antioxidantes (Kim *et al.*, 2006), por lo que se debería de investigar estas potencialidades.

De lo anteriormente señalado, se rechaza la hipótesis planteada, puesto que los pigmentos fúngicos disueltos en los caldos de cultivo producidos por hongos aislados de los suelos del Altiplano peruano no presentan propiedades inocuas para seres vivos.

V. CONCLUSIONES

- Los géneros *Penicillium* sp y *Fusarium* sp produjeron pigmentos de color anaranjado y amarillo respectivamente.
- Los pigmentos fúngicos disueltos en los caldos de cultivo producidos por los hongos aislados presentaron afinidad frente a las fibras naturales, evidenciándose la afinidad en fibras de animales como *Vicugna pacos*, *Lama glama* y *Ovis orientalis*, siendo esta última la que mejor afinidad presentó en comparación a los otros dos tipos de fibra.
- Los pigmentos fúngicos disueltos en los caldos de cultivo producidos por hongos filamentosos aislados, originaron una CL_{50} de 5.54 para los pigmentos de *Penicillium* sp. y una CL_{50} de 8.63 para los pigmentos de *Fusarium* sp., originando mortalidades superiores al 50% en organismos de pulga de agua (*Daphnia pulex*).

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda identificar cada uno de estos pigmentos para que en un futuro puedan ser utilizados de forma estandarizada, de forma que si se sabe su composición podrían ser utilizados no solo en otros campos, sino también ver si estos actúan o no en contra de los sustratos que serán teñidos o si contienen o no tóxicos que podrían no ser favorables para los tejidos a una escala industrial.
- Se recomienda la experimentación de diferentes tipos de mordientes en busca de aquellos que favorezcan la afinidad de los pigmentos hacia las telas o fibras y poder aprovechar su cualidad como pigmentos naturales.
- Se recomienda realizar investigaciones en las que se someta a condiciones de estrés a los hongos filamentosos no solo para poder lograr una mayor producción de pigmentos, sino también conseguir pigmentos de diferentes matices.
- Se recomienda el uso de diferentes medios de cultivo como Agar Dextrosa Sabouraud, Agar extracto de Malta y Agar Extracto de Arroz para evaluar su influencia en la producción de pigmentos, ya que la composición de los medios de cultivo juega un rol muy importante en cuanto al desarrollo de los hongos.

VII. REFERENCIAS

- Acosta L., Alonso G., Rodríguez A., Adame M., Salgado D., Montiel M. *et al.* 2010. *Pycnoporus sanguineus*, un hongo con potencial biotecnológico In: Martínez-Carrera, D., N. Cuvetto, M. Sobal, P. Morales, y V. M. Mora (eds). Hacia un Desarrollo sustentable de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica. COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEMUPAEP-IMINAP. 531–562.
- Adeboye A., Iwuafor E. & Agbenin J. 2006. The effects of crop rotation and nitrogen fertilization on soil chemical and microbial properties in a Guinea Savanna Alfisol of Nigeria. *Plant Soil* 281: 97–107.
- Alexopoulos C., Mims C. & Blackwell M. 1996. *Introductory Micology*. John Wiley & Sons. Cuarta Edición. EUA.
- Anaya A., Espinosa F. & Cruz R. 2001. *Relaciones químicas entre organismos: aspectos básicos y perspectivas de su aplicación*. Editorial Plaza y Valdés S. A. México.
- Arias E. & Piñeros P. 2008. *Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de Guasca y Cruz Verde*. Tesis de licenciatura. Carrera de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá – Colombia.
- Atlas M. & Bartha R. 2002. *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Segunda Edición. Editorial Addison Wesley. Madrid – España. 217 – 218.
- ArgenBio (Consejo Argentino para la información y desarrollo de la biotecnología), 2007. *Los pigmentos en la naturaleza*. Argentina.
- Babitha S., Soccol C. & Pandey A. 2007. Effect of stress on growth, pigment production and morphology of *Monascus* sp. in solid cultures. *Journal of Basic Microbiology*. Volume 47, Issue 2. Pages 118–126.

- Barnett H. & Hunter B. 1972. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 3rd Edition, Burgess Publishing Co., Minneapolis, MN.
- Benavente J. 2011. Efecto de los factores nutricionales en la producción de pigmentos por *Penicillium pinophilum*. Tesis de Licenciatura Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila, México.
- Blanc J., Loret O. & Goma A. 2001. Control of the production of metabolites by *Monascus* in submerged culture. Tu04-2. 11th World Congress of Food Science and Technology. Seoul, Korea.
- Bonnarme P. Djian A., Latrasse A., Feron G., Ginies C., Durand A. *et al.* 1997. Production of 6-pentyl-alfapyrone by *Trichoderma* sp. from vegetable oils. Journal of Biotechnology 56: 143-150.
- Calvo P., Meneses L. & Zúñiga D. 2008. Estudio de las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.
- Carvalho C., Pandey A., Babitha S. & Soccol R. 2003. Production of *Monascus* biopigments: An overview. Agro FOOD industry hitech. Vol. 6: 37 – 42.
- Cedano M. & Villaseñor L. 2006. Colorantes orgánicos de hongos y líquenes. Revista científica Scientia CUCBA. México.
- Chen F., Manchand P. & Whelley W. 1971. The chemistry of fungi. Part XXIV. The structure of monascin. J Chem Soc:3577–3586, 10.1039/J39710003577
- Cho J., Park P., Hwang J., Kim W., Choi W. & Yun W. 2002. Production of red pigment by submerged culture of *Paecilomyces sinclairii*. Letters of Applied Microbiology 35, 195-202.
- Choque R., Casma R. & Salinas F. 2015. Aislamiento de hongos productores de pigmentos para su uso en la industria textil. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional San Luis Gonzaga, Ica.

- Cortazar A., Coronel Cl., Escalante A. & González C. 2010. Contaminación generada por colorantes de la industria textil. Universidad Autónoma del Estado de México. México.
- DOV, Dirección de Orientación Vocacional. 2007. Química y color en los textiles. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Argentina.
- Doran P. 1998. Principios de Ingeniería de los Bioprocesos. Editorial Acribia. Zaragoza, España. p. 289-291.
- Dufossé L. 2006. Microbial production of food grade pigments. Food Technol Biotechnol 44: 313–321
- Durán N., Teixeira F., De Conti R. & Espósito E. 2002. Ecological – Friendly Pigments From Fungi. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 42 (1), 53-66.
- Ferraris G. 2000. Muestreo y análisis de suelo. Facultad de Agronomía UBA. <http://www.fertilizando.com/articulos/Muestreo%20y%20Analisis%20de%20Suelo%20-%20Punto%20de%20Partida.asp> Fecha de revisión: 03 de enero del 2017.
- Fowell A., Robertson A. & Whelley W. 1956. Monascorubramine. J Chem Soc Spec Publ. 5: 27–34.
- Gamez C. & Ramírez E. 2008. Determinación de la concentración letal media (CL₅₀₋₄₈) del herbicida Roundup 747 sobre ecosistemas acuáticos mediante pruebas toxicológicas con *Daphnia magna*. Tesis de Ingeniero Ambiental y Sanitario. Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria, Universidad de la Salle. Bogotá – Colombia. 208 p.
- García V. 2004. Introducción a la Microbiología. 2° edición. Editorial Universidad Estatal a Distancia (EUNED). Costa Rica.
- Glick B. 1995. The enhancement of plant growth by free- living bacteria. Canadian Journal of Microbiology 41: 109-117.

- González G. 2012. Microbiología del agua. Conceptos y aplicaciones. Editorial Escuela Colombiana de Ingeniería. Colombia.
- González A., Méndez A., Rodríguez R. & Aguilar C. 2009. Pigmentos microbianos: ¿aditivos o nutraceuticos?. Ciencia cierta 5 (19).
- Granillo P., Abreu A., Arana A. & Gracida J. 2007. Biosíntesis y caracterización del pigmento amarillo secretado por *Hypocrea jecorina*. Universidad Politécnica de Pachuca. Pachuca, Hidalgo.
- Gupta A., Gopal K. & Tikal R. 2000. Mechanism of plant growth promotion by rhizobacteria. Indian Journal Experimental Biology 38: 856- 862
- Hadfield J., Holker J. & Stanway D. 1967. The biosynthesis of fungal metabolites. Part II. The β -oxo-lactone equipments in rubropunctatin and monascorubrin. J Chem Soc 19: 751–755
- Haws E. & Holker J. 1961. The chemistry of fungi. Part XXXVIII. J Chem Soc: 3820–3829, 10.1039/JR9610003820
- Hiroi T., Shima T., Isobe A. & Kimura S. 1975. Studies on the structure of two pigment obtained from *Monascus* sp. J Jpn Soc Food Nutr 28(9): 497–502
- Hosoe T., Mori N., Kamano K., Itabashi T., Yaquchi T. & Kawai K. 2011. A new antifungal yellow pigment from *Aspergillus nishimurae*. The Journal of Antibiotics 64:211-212. doi:10.1038/ja.2010.132
- Jacobson G., Wasileski J. 1994. In Bioprocess production of flavor, fragrance, and color ingredients 1st ed New York: John Wiley & Sons.
- Kuhn D. & Ghannoum M. 2003. Indoor mold, toxigenic fungi, and *Stachybotrys chartarum*: infectious disease perspective. Clinical Microbiology Reviews. 16 (1)144.
- Levic J., Halda L. & Penčič V. 1994. Reduced pigmentation and growth of *Fusarium* cultures caused by *Enterobacter cloacae* strains. Phytopathologia Mediterranea. 33(1): 71-77.

- Lindemann R., Moore L., Baker F. & Cooksey D. 1983. Strategies for detecting and characterizing systems for biological control of soilborne plant pathogens. *Plant Disease* 67: 1058-1064.
- Lopes F., Tichota D., Pereira J., Seqalin J., Rios A. & Brandelli A. 2013. Pigment production by filamentous fungi on agro-industrial byproducts: an eco-friendly alternative. *Appl Biochem Biotechnol.* 171: 616. doi: 10.1007/s12010-013-0392-y
- Liu H., Wu S., Su M., Chung C. & Yu F. 2005. Evaluation of citrinin occurrence and cytotoxicity in *Monascus* fermentation products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 170-175.
- Malik K., Tokkas J. & and Goyals S. 2012. Microbial Pigments: A review. *International Journal of Microbial Resource Technology.*
- Manchand P., Whelly W. & Chen F. 1973. Isolation and structure of ankaflavin. *Phytochemistry* 12: 2531–2538
- Marín M., Villalba L. & Arévalo C. 2015. Extracción y caracterización parcial de pigmentos de hongos biodeteriorantes aislados de patrimonio documental cartográfico. Biblioteca Nacional de Colombia. Colombia.
- Marina de Guerra del Perú (MPG), Dirección de Hidrografía y Navegación. 2015. Humedad relativa promedio, mínima y máxima anual por estación de medición 1988-2015, Temperatura del aire promedio, mínima y máxima anual por estación de medición, 1988-2015. Encontrado en: <https://www.inei.gob.pe/estadisticas/indice-tematico/climate/> Fecha de revisión: 24 de enero del 2017.
- Marschner H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. 2ª edition. Institute of Plant Nutrition University of Hohenheim. Alemania.
- Melgar D. 2011. Manual de teñido de paja toquilla con colorantes naturales. <http://www.perucam.com/presen/pdf/30.%20Manual%20de%20te%F1ido%20de>

%20paja%20toquilla%20con%20colorantes%20naturales.pdf Fecha de
revisión: 06 de enero del 2017.

Méndez A., Contreras J., Lara F., Rodríguez R. & Aguilar C. 2007. Producción fúngica de un pigmento rojo empleando la cepa xerofílica *Penicillium purpurogenum* GH-2. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 267-273.

Miller M. 1961. The Pfizer handbook of microbial metabolites. McG. Company, INC.USA. 792 p.

Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI). 2013. Papa, principales aspectos agroeconómicos. Lima, Perú.

Mínguez M., Pérez A. & Hornero D. 2005. Pigmentos carotenoides en frutas y vegetales: mucho más que simples “colorantes” naturales. Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación. Sevilla, España.

Ministerio del Ambiente (MINAM), 2013. Aprueban Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Suelo. Lima, Perú.

Morales L. 2011. Producción de pigmentos fúngicos por *Penicillium purpurogenum* GH2 utilizando un biorreactor airlift. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Coahuila.

Moya C. 2014. Pigmentos saludables procedentes de hongos. Fundación descubre. Granada, España. Encontrado en:
<https://fundaciondescubre.es/blog/2014/10/27/pigmentos-saludables-procedentes-de-hongos/> Fecha de revisión: 25 de enero del 2017.

Parra V. 2004. Estudio comparativo en el uso de colorantes naturales y sintéticos en alimentos, desde el punto de vista funcional y toxicológico. Tesis de Licenciatura. Escuela de Ingeniería de Alimentos, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile. Valdivia – Chile. 86 p.

Prats G. 2008. Microbiología Clínica. Madrid: Médica Panamericana.

Primavesi A. 1984. Manejo Ecológico del Suelo. Editorial El Ateneo. Buenos Aires.

- Poorniammal R., Parthiban M., Gunasekaran S., Murugesan R. & Thilagavathi G. 2013. Natural dye production from *Thermomyces* sp fungi for textile application. India.
- PortaldePeru.com. Jayllihuaya en Puno. Encontrado en: [www.deperu.com/centros - poblados/jayllihuaya-107182](http://www.deperu.com/centros-poblados/jayllihuaya-107182). Fecha de revisión: 5 de setiembre del 2016.
- Ramírez P. & Mendoza A. 2008. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo, La experiencia en México. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat). México.
- Reyes I., Valery A. & Valdúz Z. 2007. Phosphate-solubilizing microorganisms isolated from rhizospheric and bulk soil of colonizer plants at abandoned rock phosphate mine. *Plant Soil*. 287: 69-75.
- Roquero A. 1995. Colores y colorantes de América. *Anales del Museo de América*.
- Sáiz C. 1975. Caracterización del pigmento de *Eurotium echinolatum* Delacr. II. Método físicos. *An. Edafol. Agrobiol.* 34: 943 – 957.
- Sánchez F. 2015. Ingeniería química: pigmentos naturales a partir de microorganismos. Agencia informativa del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Encontrado en: <http://www.conacytprensa.mx/index.php/ciencia/quimica/4297-u-a-de-c-desarrolla-procesos-de-produccion-de-pigmentos-naturales-a-partir-de-microorganismos> Fecha de revisión: 19 de enero de 2017.
- Serrano R. 2003. Introducción al análisis de datos experimentales: tratamiento de datos en bioensayos. Castelló, España.
- Shimizu S., Tsuchitani Y. & Matsumoto T. 1993. Production of an extracellular protease by *B. bassiana* in the haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Letters in Applied Microbiology*. 16: 291 - 294.
- Sierra C. 2011. Calidad del agua, evaluación y diagnóstico. Primera Edición. Ediciones de la U. Universidad de Medellín. Digiprint Editores. Bogotá – Colombia. 457 p.

- Solano A. 2010. Pigmentación de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) como factor de virulencia en plántulas de maíz en México. Tesis de Maestra en Ciencias. Postgrado en Fitosanidad – Fitopatología, Colegio de PostGraduados. Montecillo – México. 63 p.
- Taechowisan T., Lu Ch., Shen Y. & Lumyong S. 2005. Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc 130 and their antifungal activity. *Microbiology* 151: 1691-1695
- Teppei A., Koganei K., Umemura S., Kojima R., Kato J., Kasumi T. & Ogihara J. 2013. Importance of the ammonia assimilation by *Penicillium purpurogenum* in amino derivative *Monascus* pigment, PP-V, production. *AMB Express* 3:19.
- Thomashow L. & Weller, D. 1995. Concept in the use of introduced bacteria for biological disease control. In “Plant Microbes Interaction” (Stacey, G. & Keen, N. Eds.). Chapman & Hall, New York, USA. pp. 187–235
- Tortora G. Fuke B. & Case C. 2007. Introducción a la microbiología. 9ª edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España.
- Velázquez M. 2013. Producción de pigmentos fúngicos (*Monascus purpureus* 2955) en residuos agroindustriales por fermentación sólida. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- Velmurugan P., Hyun H., Vellingri B., Seralathan L., Sang L., Jong C. *et al.* 2011. *Monascus* pigment production by solid-state fermentation with corn cob substrate. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 112: 590-594.
- Villanueva R., Aguilar A., Gómez M., Valencia G., Piña B. & Bautista S. 2013. Control de bacterias patógenas y hongos de postcosecha con extractos del pigmento de *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*). *Revista Agrociencia*. Vol. 47: 691 – 705.
- Walker S., Bais P., Grotewold E. & Vivanco M. 2003. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol*. 132:44:51.

Wani S., Naphade S., Chaudhari L. & Chincholkar B. 2004. Pigment Production. In:
Concise Encyclopedia of Bioresource Technology. Pandey, A. The Haworth
Reference Press, Inc. India. 645-652.

ANEXOS

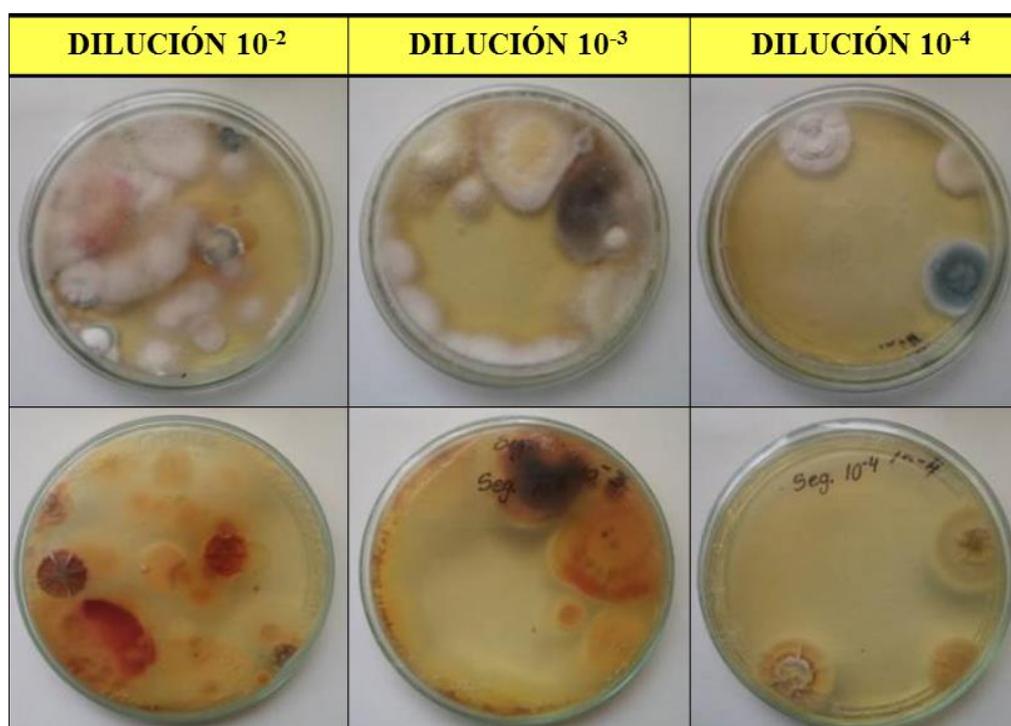


Figura A.1. Crecimiento de hongos en placas Petri de frente (fotos superiores) y al reverso de las placas (fotos inferiores), aislados de suelos del C. P. de Jayllihuaya, en la Univerisdad Nacional del Altiplano Puno en octubre a diciembre del año 2016.



Figura A.2. Toma de muestras de aguas del lago Titikaka de la provincia de Puno para el bioensayo con pulgas de agua en de diciembre del 2016.