

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



**“AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE BASIDIOMICETOS CON
CAPACIDAD DE DECOLORACIÓN DE TINTES AZOICOS”**

Presentado por:

Luis Miguel Cerrón Alván

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Lima - Perú

2014

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS

**“AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE BASIDIOMICETOS CON
CAPACIDAD DE DECOLORACIÓN DE TINTES AZOICOS”**

Presentado por:

Luis Miguel Cerrón Alván

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Sustentada y aprobada por el siguiente Jurado:

Dra. Doris Zúñiga Dávila
PRESIDENTE

Dr. Víctor Meza Contreras
MIEMBRO

Mg. Sc. Carmen Rodríguez Best
MIEMBRO

Ph. D. Gretty Villena Chávez
PATROCINADORA

Ph. D. Gabriel Marcel Gutiérrez Correa
CO - PATROCINADOR

DEDICATORIA

A mis queridísimos padres, que con infinito amor me inculcaron los valores de perseverancia y responsabilidad para nunca rendirme, seguir abrazando mis sueños y enfrentar mis más grandes temores.

A mis amados hermanos que estuvieron a mi lado demostrándome siempre su confianza y paciencia en los buenos y difíciles momentos que hemos vividos juntos.

A mis amigos, que con desinteresado cariño me aconsejaron, apoyaron y demostraron que la amistad es uno de los tesoros que la vida nos regala.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Agraria La Molina, por formarme en la carrera de Biología y a al Vicerrectorado de Investigación por considerar a esta tesis como una de las ganadoras del tercer concurso de tesis 2013.

Al Laboratorio de Micología y Biotecnología, por su asesoría y por brindarme la oportunidad de realizar la presente tesis en sus instalaciones.

Al proyecto N°110 FINCyT- FIDECOM- PIPEA 2012, en cuyo marco se desarrolló el presente trabajo.

A la empresa QUÍMICA NAVA S.A.C. por proveer los tintes azoicos empleados en los experimentos de esta tesis.

Al Ph.D. Marcel Gutiérrez-Correa y a Ph.D. Gretty Villena Chávez, por haberme acogido en el Laboratorio de Micología y Biotecnología y por guiarme a lo largo de este trabajo con sus conocimientos y ejemplo.

A mis padres Juan y María, por su amor y paciencia a lo largo de mis estudios y por ser mi mayor motivación y razón principal para salir adelante día a día.

A mis hermanos Juan Carlos y Jorge, por ser ejemplos de constancia y compromiso, y por sus sabios consejos durante toda mi vida.

A mis amigos M.Sc Yvette Ludeña Hinojosa, Karin Vega Rivera, David Romerzo Suárez, Angel Zhang Xu e Hiraída Pérez Palomares por su incondicional apoyo y ayuda desinteresada a largo de este camino. Así mismo, al Ph.D. Sujay Paul, a M.Sc. Víctor Sarmiento Casavilca, a M.Sc. Nadia Vera Munárriz y a María Pasmíño Pezo por su colaboración en algunos experimentos desarrollados en este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 Tinte azoicos	5
2.2 Decoloración microbiana	6
2.3 Basidiomicetos decoloradores	7
2.3.1 Basidiomicetos ligninolíticos	7
2.3.2 Enzimas ligninolíticas	8
2.3.3 Aislamiento de basidiomicetos ligninolíticos	9
2.3.4 Tamizado de basidiomicetos decoloradores	12
2.4 Efluentes textiles	13
2.5 Biopelículas microbianas	14
2.5.1 Definición y ventajas de las biopelículas	14
2.5.2 Adhesión a superficie e hidrofobicidad	14
2.5.3 Biopelículas para el tratamiento de compuestos xenobióticos	16
2.6 Identificación molecular	17
III. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1 Materiales	19
3.1.1 Material descartable	19

3.1.2 Instrumentos	19
3.1.3 Medios de cultivo	20
3.1.4 Soluciones	21
3.1.5 Reactivos de Biología Molecular	21
3.1.6 Equipos	21
3.1.7 Material biológico	22
3.1.8 Efluente textil real	22
3.2 Métodos	23
3.2.1 Aislamiento y reactivación de basidiomicetos	23
3.2.2 Tamizado de basidiomicetos con actividad decoloradora	24
3.2.3 Pruebas de hidrofobicidad de las cepas decoloradoras	25
3.2.3.1 Prueba de hidrofobicidad con detergentes y agua destilada	25
3.2.3.2 Prueba de hidrofobicidad con soluciones de alcohol	25
3.2.4 Estandarización de protocolo de formación de biopelículas de basidiomicetos	26
3.2.4.1 Número y tamaño de perlas para formación de inóculo	26
3.2.4.2 Inóculo de biopelícula	27
3.2.4.3 Protocolo de formación de biopelículas de basidiomicetos	27
3.2.5 Cinética de crecimiento de biopelícula	28
3.2.6 Cinética de decoloración de biopelículas de basidiomicetos	29

3.2.6.1 Estandarización de medio líquido para pruebas de decoloración	29
3.2.6.2 Cinética de decoloración de tintes azoicos	31
3.2.6.3 Medición de decoloración	32
3.2.7 Efluentes simulados y reales	33
3.2.7.1 Preparación de efluentes simulados	33
3.2.7.2 Efluente real	34
3.2.7.3 Protocolo de cinética de decoloración en efluentes	34
3.2.7.4 Protocolo de medición de decoloración de efluentes	35
3.2.7.4.1 Efluentes simulados	35
3.2.7.4.2 Efluentes reales	36
3.2.8 Análisis Molecular	36
3.2.8.1 Extracción de ADN	37
3.2.8.2 PCR	38
3.2.8.3 Secuenciamiento y análisis de secuencias de ADN	39
3.2.9 Análisis estadístico	39
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
4.1 Aislamiento y reactivación de basidiomicetos	41
4.2 Tamizado de basidiomicetos decoloradores	43
4.3 Pruebas de hidrofobicidad de las cepas decoloradoras de basidiomicetos	46

4.4 Estandarización de protocolo de formación de biopelículas decoloradoras	49
4.5 Cinética de crecimiento de biopelículas	52
4.6 Estandarización del medio de decoloración para pruebas de decoloración	54
4.7 Cinética de decoloración de tintes azoicos	57
4.8 Efluentes simulados y reales	64
4.9 Análisis molecular para identificación de las cepas seleccionadas	67
V. CONCLUSIONES	69
VI. RECOMENDACIONES	71
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Relación de cepas aisladas de basidiomicetos de diferentes localidades de la selva y UNALM, y las correspondientes al cepario LMB	42
Tabla 2. Tamizado de cepas de basidiomicetos de reacción guaiacol positiva	44
Tabla 3. Prueba de hidrofobicidad de micelio de cepas de basidiomicetos decoloradores de tintes azoicos	46
Tabla 4. Tratamientos realizados para fragmentación de micelio mediante uso de esferas de vidrio	50
Tabla 5. Biopelículas de LMBTM1 y LMBTM5 a las 48 y 72 horas de crecimiento sobre tela de poliéster	51
Tabla 6. Porcentaje de biomasa adherida durante la cinética de crecimiento de biopelícula de LMBTM1 y LMBTM5	53
Tabla 7. Biomasa inicial y final del proceso de decoloración de LMBTM1 y LMBTM5 en los Medios 1, 2 y 3	56
Tabla 8. Biomasa de biopelículas al final del proceso de decoloración de tintes azoicos	63
Tabla 9. Biomasa de biopelículas al final del proceso de decoloración de tintes azoicos	66
Tabla 10. Alineamiento de secuencias ITS mediante análisis BLAST	68

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Principales partes de un cuerpo fructífero de basidiomicetos	10
Figura 2. Diagrama de la formación de fíbulas en basidiomicetos	12
Figura 3. Posición de los genes de ARNr y <i>primers</i> en hongos	17
Figura 4. Cinética de crecimiento en medio líquido de biopelículas de LMBTM1 y LMBTM5 desarrollados en los soportes de tela de poliéster y malla de metal	53
Figura 5. Cinética de decoloración de biopelículas de LMBTM1 y LMBTM5 en Medio 1, Medio 2 y Medio 3 conteniendo Azul Brillante y Synozol Turquesa	56
Figura 6. Cinética de decoloración de medio con Azul Brillante por biopelículas de LMBTM1 y LMBTM5 con 48 y 72 horas de horas de crecimiento	60
Figura 7. Cinética de decoloración de medio con Levafix Amarillo por biopelículas de LMBTM1 y LMBTM5 con 48 y 72 horas de horas de crecimiento	60
Figura 8. Cinética de decoloración de medio con Remazol Rojo por biopelículas de LMBTM1 y LMBTM5 con 48 y 72 horas de horas de crecimiento	61
Figura 9. Cinética de decoloración de medio con Remazol Rojo por biopelículas de LMBTM1 y LMBTM5 con 48 y 72 horas de horas de crecimiento	61
Figura 10. Cinética de decoloración de medio con Synozol Amarillo por biopelículas de LMBTM1 y LMBTM5 con 48 y 72 horas de horas de crecimiento	62
Figura 11. Cinética de decoloración de medio con Synozol Turquesa por biopelículas de LMBTM1 y LMBTM5 con 48 y 72 horas de horas de crecimiento	62
Figura 12. Cinética de decoloración de efluentes simulados por biopelículas de LMBTM1 y LMBTM5	65

Figura 13. Cinética de decoloración de efluente real por biopelículas de LMBTM1 y LMBTM5 66

Figura 14. Amplificación de productos de PCR 67

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1: Aislamiento y reactivación de basidiomicetos	86
Anexo 2: Microfotografías de basidiomicetos	95
Anexo 3: Tamizado de cepas para actividad decoloradora	103
Anexo 4: Estandarización de protocolo de formación de biopelículas de basidiomicetos	117
Anexo 5: Estandarización de medio de decoloración	118
Anexo 6: Cinética de decoloración de tintes	122
Anexo 7: Cinética de decoloración de efluentes	133
Anexo 8: Espectros de absorción de estandarización de medio de decoloración	137
Anexo 9: Espectros de absorción de cinética de decoloración de tintes azoicos	141
Anexo 10: Espectros de absorción de cinética de decoloración de efluentes	151
Anexo 11: Fotografías de muestreo de efluentes	154
Anexo 12: Análisis estadístico	155
Anexo 12.1 Biopelículas de LMBTM1 y LMBTM5 en dos soportes sólidos	155
Anexo 12.2 Estandarización de medio de decoloración	159
Anexo 12.3 Cinética de decoloración de tintes azoicos	165
Anexo 12.4 Cinética de decoloración de efluentes reales y simulados	175

RESUMEN

Miles de toneladas de tintes textiles son descargados anualmente en efluentes por la ineficiencia de los procesos de teñido ocasionando un severo problema ambiental. Estos tintes son potencialmente carcinogénicos, tóxicos, inhiben procesos biológicos y ocasionan cambios físicos y químicos perjudiciales en los cuerpos de agua. Debido a que son de alta estabilidad química, encontrar un tratamiento efectivo y barato es un inmenso desafío por lo que decoloración biológica se presenta como la alternativa más adecuada. En el presente trabajo se propuso el empleo de basidiomicetos, por ser los principales organismos decoloradores, y el uso sistema de biopelículas por ofrecer resistencia al estrés, mayor sobrevivencia y cooperación metabólica. Se aislaron basidiomicetos a partir de cuerpos fructíferos y se seleccionaron los dos mejores a partir de un tamizado en medio sólido con colorante y pruebas de hidrofobicidad para llevar a cabo los procesos de decoloración en medio líquido. Las cepas elegidas fueron "LMBTM1" y "LMBTM5" que mediante identificación molecular corresponden a los basidiomicetos ligninolíticos *Ceriporia lacerata* y *Trametes polyzona* respectivamente. Ocho tintes azoicos fueron evaluados en un medio de decoloración de condiciones limitantes previamente seleccionado con 400 ppm de tinte azoico. Remazol Negro presentó una decoloración espontánea atípica y Levafix Rojo cambios químicos que requieren estudios más complejos y no se consideraron para experimentos de cinética de decoloración. Respecto a los otros tintes, los mayores porcentajes de decoloración se dieron en Azul Brillante y Synozol Turquesa principalmente y evidenciaron además cambios notorios en los espectros de absorción. En todos los experimentos de decoloración LMBTM5 resultó ser superior a LMBTM1, y las biopelículas de 72 horas de crecimiento resultaron ser mejores decoloradoras que las de 48 horas en ambas cepas. Finalmente se evaluó la decoloración en efluentes simulados a distintos pHs y efluentes reales, alcanzando los mayores porcentajes con biopelículas de LMBTM5.

Palabras claves: biopelículas, basidiomicetos, decoloración, tintes azoicos.

ABSTRACT

Thousands of tons of textile dyes are discharged annually through effluents because of inefficiency of dyeing process causing a severe environmental problem. These dyes are potentially carcinogenic, toxic, inhibit biologic process and cause chemical and physical changes in water bodies. Due to their stability, finding an efficient and low cost treatment is a huge challenge and this is why biologic decolorization is the most adequate alternative. The present work proposed the use of basidiomycetes, because they are the most important decolorizing organism, and the use of biofilms for offering resistance to stress, higher surviving, and metabolic cooperation. Basidiomycetes was isolated from fruit bodies and the two best strains was selected, taking into account results of screenings and hydrophobicity experiments, to carry out decolorization experiment in liquid media. Selected strains "LMBTM1" and "LMBTM5" were *Ceriporia lacerata* and *Trametes polyzona* respectively according to molecular analysis. Eight azo dyes were evaluated in a previously selected decolorization media with 400 ppm of dye. Remazol Black presented spontaneous decolorization and Levafix Red evidenced chemical changes which both require deeper and more complex studies and were not considered for kinetic decolorization experiments. Respect to other dyes, higher decolorization percentage was performed mainly in Brilliant Blue and Synozol Turquoise and both evidenced visible changes on their absorption spectrum. LMBTM5 was superior among all the experiments and biofilms of 72 hours of growth were better than biofilms of 48 hours of growth. Finally, decolorization in simulated effluent to different pHs and in real effluents were evaluated, performing higher decolorization percentages in biofilms of LMBTM5.

Key words: biofilms, basidiomycetes, decolorization, azo dyes.

I. INTRODUCCIÓN

La industria textil se ha convertido en una preocupación cada vez más alarmante debido a los problemas ambientales que ésta genera (Solís et al. 2012; Rodríguez-Couto 2013). Esto es debido a que alrededor de 10 a 15 por ciento de los tintes sintéticos, que se emplean en procesos de teñidos, se pierden y se liberan como efluentes (Wesenberg et al. 2003; Zaharia y Suteu 2010). Se calcula que a nivel mundial 280 000 toneladas de tintes textiles son descargadas anualmente (Solís et al. 2012; Pereira y Alves 2012; Ali et al. 2013). Los tintes azoicos son los más usados en la industria textil y representan el 60% de los tintes totales con una significativa diversidad estructural (Stolz 2001).

Estos efluentes textiles tienen impactos adversos en términos de carbono orgánico total (COT), demanda biológica de oxígeno (DBO), demanda química de oxígeno (DQO), sólidos suspendidos, salinidad, color, rango de pH y concentración de metales pesados y de componentes orgánicos recalcitrantes, como los tintes azoicos (Rybicki et al. 2004; Chacko y Subramaniam 2011; Ratna y Padhi 2012; Solís et al. 2012; Pereira y Alves 2012). Estos aspectos traen consigo efectos perjudiciales como inhibición de fotosíntesis de algas y plantas acuáticas, problemas de reoxigenación del agua, toxicidad para la flora, la fauna y los seres humanos (Zaharia et al. 2009; Zaharia y Suteu 2010; Solís et al. 2012; Pereira y Alves 2012). Además, si los tintes se descomponen anaeróbicamente y ocurre una ruptura de los enlaces azo se generan aminas aromáticas que son muy tóxicas, carcinogénicas y mutagénicas como por la bencidina, naftaleno y otros compuestos aromáticos (Wesenberg et al. 2003; Chacko y Subramaniam 2011; Zaharia y Suteu 2010; Schneider et al. 2004). Esto ha sido confirmado mediante estudios en especies útiles para evidenciar mutaciones como *Allium cepa*, en donde se han confirmado aberraciones cromosómicas ante la presencia de efluentes textiles (Caritá y Marin-Morales 2008; Ratna y Padhi 2012).

Debido a que estos tintes sintéticos han sido mejorados para proporcionar un alto grado de estabilidad son resistentes a la degradación por luz, agua, jabón, agentes químicos que incluyen agentes oxidantes, y agentes biológicos como la actividad microbiana (Robinson et al. 2001; Keharia y Madamwar 2003).

Por esa razón se han propuesto distintos métodos físico-químicos y biológicos para la remoción de los tintes a escala industrial (Solís et al. 2012; Bagewadi et al. 2011). La selección del método más apropiado se basa en ventajas a nivel de economía, viabilidad y eficiencia del mismo (Robinson 2001; Ratna y Padhi 2012). A pesar de que muchos de los tratamientos físicos y químicos empleados son efectivos, resultan demasiado costosos y dejan residuos, creando la necesidad de una disposición final de los mismos y costos adicionales de operación (Ghoreishi 2003; Crini 2006; Chacko y Subramaniam 2011; Solís et al. 2012; Ratna y Padhi 2012; Rodríguez-Couto 2013). Frente a esto, la degradación biológica de los mismos es una alternativa amigable con el ambiente. Las bacterias poseen azoreductasas para degradar los tintes. Sin embargo los productos finales resultan ser tóxicos y se requiere etapas adicionales para culminar el tratamiento (Puvaneswari et al. 2006). Ante ello se han hecho evidentes las ventajas ofrecidas de los hongos que llevan a cabo una degradación aeróbica oxidativa (Martins et al. 2003).

De los hongos en general, los basidiomicetos de madera caída de pudrición blanca son los microorganismos más eficientes a la degradación de tintes debido a que producen varias isoformas de oxidasas extracelulares no específicas incluyendo lacasas, peroxisadas dependiente de Mn y lignina peroxidasa, las cuales están involucradas en la degradación de lignina (Selvam et. al. 2003; Wesenberg 2003; Rodríguez-Couto y Toca 2006; Rodríguez-Couto 2013). Este sistema ligninolítico está directamente involucrado en la degradación de varios componentes xenobióticos y tintes similares a la estructura de lignina (Wesenberg et al. 2003; Mendonça et al. 2010; Rodríguez-Couto 2013).

Es por todo lo anteriormente mencionado que el tratamiento de efluentes textiles se ha convertido en un desafío enorme desde décadas pasadas, y hasta la actualidad se busca un tratamiento y método mucho más eficiente, económicamente atractivo y

ambientalmente amigable (Solís et al. 2012). Surge así la necesidad de continuar la búsqueda de nuevas cepas y especies de hongos ligninolíticos aprovechando la gran biodiversidad existente en el Perú, así como desarrollar un proceso de fermentación mediante el cual se pueda optimizar la habilidad de estos hongos en beneficio del ambiente.

Se plantea el uso de biopelículas de basidiomicetos, como estrategia de tratamiento de decoloración de tintes azoicos, que tiene como propósito aprovechar las ventajas presentes en éstas (Ramage et al. 2012) para establecer un proceso innovador aún no probado en el país.

OBJETIVOS

Objetivo general

Aislar y seleccionar una cepa de basidiomiceto capaz de decolorar tintes azoicos y formar biopelículas sobre un soporte sólido.

Objetivos específicos

- Aislar basidiomicetos a partir de basidiocarpos obtenidos de distintas localidades de la Selva.
- Realizar tamizado de basidiomicetos para evaluar la actividad decoloradora de tintes azoicos.
- Desarrollar un protocolo de formación de biopelículas de basidiomicetos.
- Establecer cinéticas de decoloración de medios coloreados.
- Identificar molecularmente las cepas seleccionadas.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 TINTES AZOICOS

Los tintes son compuestos orgánicos sintéticos que se adhieren a un sustrato dado y que son usados en muchas industrias, especialmente en las textiles (Zollinger 2003; Pereira y Alves 2012). Desde hace varias décadas se han comercializado con nombres que se componen de tres partes. La primera es el nombre que indica la clase de tinte y su manufactura. La segunda es el color, por ejemplo rojo, azul o amarillo. La tercera parte pueden ser letras que indican tonalidad, cualidades especiales o números en porcentaje que indican intensidad (Giles et al. 1989; Christie 2001).

De todos los tintes, los azoicos conforman la clase de colorantes orgánicos más importantes. Su importancia radica en que son capaces de proveer una alta intensidad de color respecto a otros tintes y una gran variedad de tonalidades. Asimismo, por el método de síntesis con el que se obtienen, resultan los más efectivos en términos de costos. Es por ello que son los más empleados en aplicaciones. Como su nombre lo sugiere, éstos contienen una estructura común de enlace azo ($-N=N-$) y pueden contener un solo grupo azo o muchos más (Christie 2001).

La recalcitrancia y alta estabilidad química de estos tintes frente a agentes externos puede explicarse por la característica de generar una deficiencia de electrones, lo que hace el compuesto menos susceptible al catabolismo oxidativo (Øllgaard et al. 1998). Por ello, sin un adecuado tratamiento, estos tintes pueden permanecer en el ambiente por un largo periodo de tiempo (Zaharia y Suteu 2010; Rodríguez-Couto 2013).

2.2 DECOLORACIÓN MICROBIANA

La biorremediación es el uso de técnicas microbianas para enfrentar la polución. Ésta propone la decoloración microbiana como la alternativa más amigable con el ambiente y relativamente menos costosa (Saratale et al. 2011; Solís et al. 2012) como alternativa de solución frente al contexto actual en el que la contaminación ambiental es un problema global urgente (Wu et al. 2012). Este proceso de decoloración puede ocurrir mediante dos vías principales que juegan roles muy importantes: biosorción o degradación enzimática, o la combinación de ambas (O'Neill 2000; Fu y Viraraghavan 2001; Ali et al. 2010; Solís et al. 2012; Khan et al. 2012).

La biosorción es la adsorción que ocurre en biomateriales (Khan et al. 2012) y puede ser definida como un proceso en el que sólidos de origen natural son empleados para el secuestro o separación de sólidos de efluentes (Bagewadi et al. 2011).

La biomasa de algas, levaduras, hongos filamentos y bacterias han sido usadas para remover tintes por biosorción. La capacidad de la biosorción se atribuye a los heteropolisacáridos y componentes lipídicos de las paredes de la célula, los cuales contienen diferentes grupos funcionales que incluyen grupos amino, carboxilo, hidroxilo, fosfato y otros grupos cargados causando fuerte atracción entre los tintes azoicos y las paredes celulares (Solís et al. 2012).

Por otro lado, la biodegradación es el cambio químico de materiales orgánicos por microorganismos u otros agentes biológicos que ocurre por biotransformación enzimática (Saratale et al. 2011; Khan et al. 2012).

La capacidad de los hongos de adaptarse a fuentes variadas de carbono y nitrógeno, que es importante para su sobrevivencia, se debe a que poseen enzimas capaces de degradar complejas estructuras químicas. El sistema enzimático encargado de llevar a cabo la biodegradación de tintes azoicos es el sistema ligninolítico. (Saratale et al. 2011).

Ambos procesos, biosorción y biodegradación, pueden ocurrir acoplados permitiendo alcanzar grandes eficiencias de decoloración por actividad microbiana (Seyis y Subasioglu 2008). Se ha reportado que estos procesos se dan en etapas iniciadas con la biosorción de los tintes hasta alcanzar un equilibrio y continuando con la degradación de los mismos por varios días (Fu y Viraraghavan 2001; Ali et al. 2010). Este es un mecanismo evidenciado en actinomicetos, ascomicetos y en hongos de pudrición blanca (Fu y Viraraghavan 2001; Bagewadi et al. 2011). Así mismo, los materiales orgánicos adsorbidos y depositados en agregados microbianos son frecuentemente fuentes de nutrientes que son convertidas en materiales celulares (Wu et al. 2012).

Los factores que influyen en las eficiencias de decoloración son la cepa seleccionada (Khan et al. 2012; Saratale et al. 2011) y la presencia de los mismos tintes, la salinidad, las variaciones de pH y el contenido de componentes orgánicos (Osma 2010; Solís et al. 2012).

2.3 BASIDIOMICETOS DECOLORADORES

2.3.1 Basidiomicetos ligninolíticos

Los basidiomicetos son hongos filamentosos que forman cuerpos fructíferos. Durante la mayor parte de su existencia viven como simple micelio, creciendo en el suelo, en los desechos de hojas o en los troncos y desarrollan cuerpos fructíferos, llamados basidiocarpos, cuando las condiciones del medio son favorables (Madigan et al. 2010). Ellos poseen la habilidad de adaptarse a condiciones adversas en el entorno actuando como degradadores de lignocelulosa naturalmente (Mendonça et al. 2010).

Los basidiomicetos incluyen grupos ecológicos muy diferentes entre los que destacan los hongos de pudrición de madera, también llamados hongos del decaimiento, que son los principales descomponedores de la madera por su capacidad de degradar paredes de células lignificadas. Salvo ciertos ascomicetos, todos los hongos que atacan la madera son basidiomicetos que pertenecen principalmente a *Agaricales*, *Hymenochaetales*, *Polyporales*

y *Russulales* (Gherbawy y Voigt 2008). Debido a su sistema enzimático se les divide como hongos de pudrición blanca, de la pudrición parda y los hongos de hojarasca (Mendonça et al. 2010).

La importancia de los basidiomicetos de decaimiento de madera radica en que son degradadores de lignina o ligninolíticos y poseen enzimas de baja especificidad (Mendonça et al. 2010) por lo que pueden utilizarse en la degradación de tintes azoicos y de una variedad de compuestos aromáticos refractarios (Ruiz-dueñas y Martínez 2009). Por esta razón, estos hongos son capaces de llevar a cabo la biodegradación de compuestos orgánicos recalcitrantes, lignina y otros compuestos aromáticos (Pércz et al. 2002).

La degradación de lignina descrita ha sido ampliamente reportada por los hongos de pudrición blanca por varias décadas, a tal punto de poder alcanzar la despolimerización e incluso la mineralización de lignina a dióxido de carbono y agua (Ten Have y Teunissen 2001; Shah y Nerud 2002; Radha et al. 2005). La especie *Phanerochaete chrysosporium* es la que ha sido más estudiada por su sistema ligninolítico bajo condiciones limitantes de nitrógeno y carbono (Singh y Chen 2008; Fu y Viraraghavan 2001). Por tal razón, muchos estudios se han encaminado a utilizar medios de cultivo que cumplan con estas condiciones. Así mismo, la búsqueda de nuevos hongos de pudrición blanca con sistemas ligninolíticos eficiente continúa (Tekere et al. 2001) y han sido reportados diversos estudios entre los que destacan *Bjerkandera adusta* (Lebrun et al. 2011), *Pycnoporus sanguineus* (Eugenio et al. 2009), especies de *Trametes* (Levin y Forchiassin 2001; Takamiya et al. 2008; Lebrun et al. 2011) y diversas especies de *Pleurotus* (Martínez 2001; Santoyo et al. 2008).

Los basidiomicetos que causan el decaimiento de madera de pudrición parda pueden también descomponer la lignina (Ali et al. 2010). Ellos degradan la celulosa y hemicelulosa en la madera, dejando un residuo oscuro de lignina típicamente pardo que les da el nombre (Espejo et al. 1990; Schilling et al. 2013). Por lo tanto, son capaces de degradar tintes, ofreciendo otra alternativa para el tratamiento de colorantes (Gomaa et al. 2009).

2.3.2 Enzimas ligninolíticas

Tres tipos de enzimas extracelulares pueden encontrarse en el sistema ligninolítico de basidiomicetos: polifenoloxidasas, peroxidasas y una oxidasa generadora de H₂O₂. Dentro de estos grupos, las principales enzimas son las lacasas, lignina-peroxidasa y peroxidasas dependientes de Mn.

Las lacasas pertenecen a la familia de las oxidasas. Catalizan la oxidación de varios sustratos con la reducción simultánea de oxígeno molecular a agua (Mendonça et al. 2010). Son generalmente las primeras enzimas ligninolíticas secretadas por el hongo que normalmente oxidan sólo los compuestos de lignina con un grupo fenólico libre, formando radicales fenoxi de bajo peso molecular como mediadores (Rodríguez Couto y Toca 2006). Por otro lado, las lignina peroxidasas pertenecen a la familias de las oxidorreductasas (Martínez et al. 2005). Son dependientes de H₂O₂ y capaces de oxidar una variedad de sustratos reductores, incluyendo sustratos poliméricos (Mendonça et al. 2010). Por último, las peroxidasas dependiente de Mn, que pertenecen también a las oxidorreductasas, están presentes en la mayoría de los hongos de pudrición de madera (Hofrichter 1999; Martínez et al. 2005).

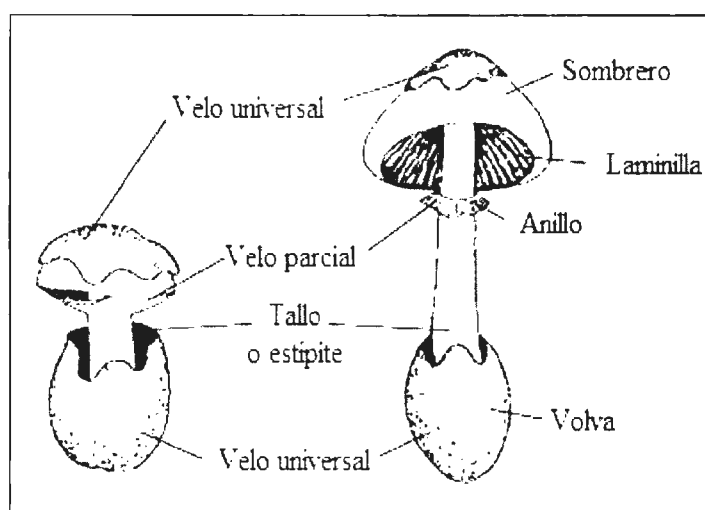
Muchas especies de hongos ligninolíticos sólo producen dos de ellas, siendo lo más usual la combinación de las actividades de lacasa y peroxidasa dependiente de Mn (Rojas et al. 2010; Rodríguez et al. 1999).

2.3.3 Aislamiento de basidiomicetos ligninolíticos

El aislamiento de basidiomicetos ha sido siempre uno de los mayores desafíos, ya que difícilmente crecen en medio sintético pues dependen de factores muchas veces inexplicables (Labeda 1990; Adam y Samson 2011). Éste puede ser llevado a cabo a partir del suelo con la posibilidad de encontrar estructuras miceliales, basidiosporas o partes del cuerpo fructífero (Booth 1971; Fries 1987; Thorn et al. 1996).

La colección de muestras de basidiomicetos debe considerar varios puntos. Por ejemplo, de ser posible se debe coleccionar varios estadios de desarrollo de los cuerpos fructíferos, desde botones hasta basidiocarpos maduros completos en la medida de lo posible. Dependiendo del cuerpo fructífero, puede usarse un cuchillo muy fuerte para hongos de madera y tubos o frascos para guardar los especímenes más débiles. Incluso debe conservarse en la medida de lo posible la parte basal para no destruir las estructuras (Booth 1971; Aneja 2003).

Figura 1. Principales partes de un cuerpo fructífero de basidiomicetos (Huffman et al 2008).



Respecto al aislamiento por cuerpo fructífero, éste debe ser cortado en pequeños trozos con ayuda de un bisturí bajo las condiciones más estériles posibles. Si el basidiomiceto proviene de la madera es recomendable retirar la piel externa previamente. Respecto a los basidiomicetos acuosos, es muy probable que contengan bacterias a pesar de emplear similares métodos, ya que están presentes internamente y crecen masivamente en el medio de cultivo (Zhinqiang 2005)

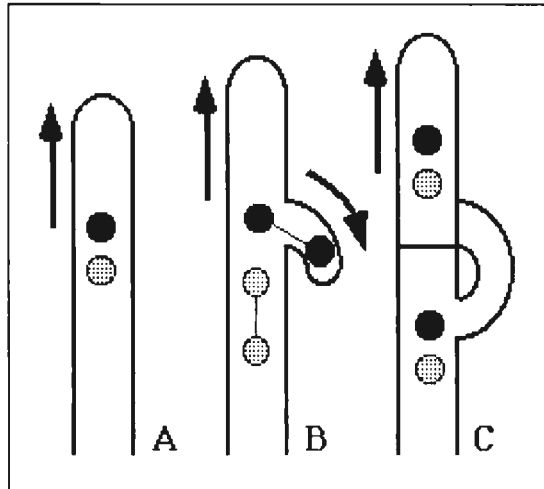
Se debe cultivar las zonas fisiológicamente más activas. Un ejemplo son las estructuras formadoras de basidiosporas (Booth 1971). Otra zona activa son los ápices del tallo o estípote del basidiocarpo pues al estar conectado con la parte superior del cuerpo fructífero

o en la base, ya que pueden estar más activas por el transporte de nutrientes (Aneja 2003; Zhinqiang 2005).

El medio de aislamiento empleado para el aislamiento de basidiomicetos es un medio selectivo que evita el crecimiento de organismos no deseados. Para ello, el empleo de benomil es necesario y ha sido ampliamente utilizado. Éste, inhibe el crecimiento de ascomicetos como *Penicillium*, *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Rhizopus*, *Cladosporium* (Thorn et al. 1996). Adicionalmente se emplea lignina alcalina como compuesto que promueva el crecimiento de organismos ligninolíticos y guaiaicol, que actúa como indicador colorimétrico de las enzimas que actúan sobre la lignina como las peroxidasas y las lacasas produciendo un color marrón rojizo (Mueller et al. 2004; Barrasa et al. 2009; Patrick et al. 2008; Theerachat et al. 2012; Hwang 2008). Se ha reportado incluso que el guaiaicol puede inducir la producción de las enzimas ligninolíticas en *Trametes versicolor* y *Pleurotus sajor-caju* (Patrick et al. 2008). Así mismo se pueden usar antibióticos para evitar la proliferación de bacterias (Dietrich y Lamar 1990). Otro inductor de estas enzimas es el etanol (Malarczyk, 2003).

Si se logra el desarrollo de micelio en medio sintético y se desea corroborar la presencia de basidiomicetos se puede considerar caracteres diagnósticos como la presencia de hifas septadas o de fibulas (Hood 2006). Las fibulas se generan cuando células dicarióticas experimentan divisiones conjugadas y alcanzan un micelio dicariótico (Karnataka 2001). Sin embargo, estas estructuras no están siempre presentes y los caracteres diagnósticos no son fiables siempre por lo que la manera más segura de identificar un basidiomiceto es mediante análisis moleculares (Hood 2006).

Figura 2. Diagrama de la formación de fibulas en basidiomicetos (Swann 1999)



2.3.4 Tamizado de basidiomicetos decoloradores

Un aspecto importante es desarrollar procedimientos para evidenciar características metabólicas mediadas por enzimas. Uno de estos procesos es conocido como tamizado o “*screening*” (Crueger y Crueger 1990).

Por décadas los métodos de selección de microorganismos degradadores de colorantes eran cultivos líquidos (Rojas et al. 2010). Luego, se implementó un método rápido y eficiente: la decoloración en placa como método de selección primaria. Este mecanismo permite elegir hongos capaces de degradar colorantes textiles, e incluso aquellos que se encuentren en el suelo (Novotny et al.2001). Sin embargo, existen diferencias en la decoloración, tiempo y capacidad, las cuales son dependientes de la estructura de colorantes, la especie de hongos y medios de cultivo utilizados (Rojas et al. 2010).

2.4 EFLUENTES TEXTILES

Los efluentes textiles representan un serio problema que preocupa a grandes partes del mundo (Osma et al. 2010). Su composición está determinada por los tipos de procesos industriales involucrados, el tipo de fibra textil y los químicos usados. Los efluentes contienen generalmente un gran número de componentes como demostró en un reporte en el que se determinó la presencia de 304 componentes, 94 estructuras parciales y 107 componentes desconocidos (Alaimo et al. 1990). Los principales contaminantes son compuestos aromáticos, hidrocarburos halogenados y metales. Así mismo, se pueden encontrar efluentes de distintos pHs que pueden ir desde pH 4 hasta pH 12, y de distinta concentración de sólidos suspendidos, desde 30 ppm a 400 ppm y casos extremos poco comunes de 1000 ppm (O'Neill et al. 1999).

Los tratamientos físico o químicos e incluso tratamientos biológicos convencionales han resultado ineficientes en la remoción de tintes de los efluentes por lo que, se han estudiado muchos hongos que pueden decolorar y/o biosorber diversos tintes (Fu y Viraraghavan 2001). Sin embargo, se ha reportado que la estabilidad y la capacidad catalítica de las enzimas pueden decrecer considerablemente debido a una amplia variedad de condiciones ambientales de los efluentes (Osma et al. 2010) lo cual hace necesario proponer nuevas técnicas (Moilanen et al. 2010).

A nivel de laboratorio se han planteado el uso de efluentes simulados. El uso de éstos facilita el análisis de los tratamientos sin interferencia de las mayores fluctuaciones de los efluentes reales y considerando los principales componentes. Muchos científicos los han usado para investigar nuevas tecnologías de tratamiento (O'Neill et al. 1999). Éstos son formulados teniendo en cuenta especificaciones de las empresas textiles (Osma et al. 2010) o considerando los componentes más comunes como tintes azoicos hidrolizado, almidón modificado, ácido acético, sales traza y nutrientes (O'Neill et al. 2000; Martins et al. 2003).

2.5 BIOPELÍCULAS MICROBIANAS

2.5.1 Definición y ventajas de las biopelícula

Las biopelículas son definidas como comunidades de microorganismos adheridos a una superficie biótica o abiótica con características fenotípicas distintas al estado planctónico, que incluyen interacciones complejas de procesos físicos y biológicos (O'Toole et al. 2000; Donlan 2002; Gutiérrez-Correa y Villena 2003).

Las ventajas de las biopelículas incluyen protección del ambiente, resistencia a estrés químico y físico y cooperación metabólica así como capacidad de sobrevivencia frente a condiciones adversas (Jabra-Rizk 2004; Ramage et al. 2012). Pueden también establecer un mejor contacto con el medio circundante, capturar eficientemente los nutrientes y evitar el excesivo crecimiento de biomasa. Además, se han reportado características fisiológicas especiales en las biopelículas asociadas a una mayor actividad metabólica y mejor comunicación célula-célula. (Villena y Gutiérrez-Correa 2003; Prewitt et al. 2008; Villena et al. 2010; Gutiérrez-Correa et al. 2012).

Los hongos filamentosos son por ejemplo microorganismos naturalmente adaptados al crecimiento en superficies y en estas condiciones ellos muestran un comportamiento fisiológico respecto al cultivo sumergido (Gutiérrez-Correa y Villena 2003).

2.5.2 Adhesión a superficie e hidrofobicidad

La formación de biopelículas incluyen pasos que como la adhesión de células microbianas a una superficie sólida conocida como soporte (Lens et al. 2003; Villena y Gutiérrez-Correa 2007). Las propiedades físicas del soporte como hidrofobicidad, carga electrostática y rugosidad son importantes en los pasos iniciales de adhesión para formar biopelículas de bacterias, levaduras y hongos filamentosos (Gutiérrez-Correa y Villena 2003).

La hidrofobicidad de los microorganismos es igual de importante que la del soporte para la formación de biopelículas (Shunmugaperumal 2010). En hongos filamentosos, la adhesión es mediada principalmente por una clase de proteínas anfipáticas pequeñas llamadas hidrofobinas que son producidas por ascomicetos, basidiomicetos y eventualmente por zigomicetos. Adicionalmente se ha reportado que adhesivos que participan en la adhesión a superficies (Gutiérrez-Correa y Villena 2003; Siqueira y Lima 2013). Con este aspecto es importante determinar la hidrofobicidad de superficies fúngicas para seleccionar cepas formadoras de biopelículas (Borghi et al. 2011).

La hidrofobicidad ha sido medida de diversas formas pero muchas han estado sujetas a críticas. Un ejemplo es el “método del ángulo de contacto” que ha sido ampliamente usado y que expresa la hidrofobicidad en términos de ángulo de contacto formado por una gota de agua pura sobre una superficie. Sin embargo, es difícil establecer resultados reproducibles y por lo tanto muchas veces se recurre a otras técnicas que permitan expresar hidrofobicidad (Lens et al. 2003).

Otro método es “el tiempo de penetración de la gota de agua” que es una medida de la persistencia de la hidrofobicidad y que toma en cuenta el tiempo que toma una gota en penetrar o esparcirse sobre una superficie (Letey et al. 2000).

Un método alternativo fue usado por Stringer y Timberlake (1995) en el que las gotas empleadas eran de detergentes. Partiendo de este método, la hidrofobicidad en *Aspergillus niger* y *Trichoderma reesei* fue analizada por Villena et al. (2001) para evaluar ambas cepas como formadoras de biopelículas y productoras de enzimas. Estos métodos se basan en la resistencia que presentan las hifas del micelio a la expansión de la gota y que da una medida cualitativa de hidrofobicidad.

Un método reciente para determinar hidrofobicidad en hongos es el “test del porcentaje de alcohol”. Éste se basa en que teóricamente cuando una gota penetra o moja una superficie quiere decir que la tensión superficial de ésta es menor que la de la superficie. Caso contrario, si la tensión superficial de la gota es mayor entonces se mantendrá en la

superficie. Por lo tanto, si una serie de soluciones que proveen diferentes tensiones superficiales se preparan y se ponen en una superficie, aquellas con mayor tensión superficial tenderán a mantenerse y contribuir a un mayor grado de hidrofobicidad, mientras que las soluciones de menor tensión superficial tenderán a penetrar o esparcirse en la superficie por el bajo grado de hidrofobicidad. Bajo esta premisa el “test de porcentaje de alcohol” se desarrolló teniendo en cuenta que el alcohol tiene menor tensión superficial (0.0219 N/m) que el agua (0.0719 N/m) y que al colocar mezclas de estas soluciones con diferentes concentraciones, se podría determinar aquella de concentración más baja de etanol que penetra o que moja la superficie y considerarla como indicador de hidrofobicidad. A mayor concentración de etanol que nopenetre la superficie, habrá un mayor grado de hidrofobicidad (Letey et al. 2000; Chau et al. 2010).

2.5.3 Biopelículas para el tratamiento de compuestos xenobióticos

Recientemente las biopelículas han generado un gran interés para el tratamiento de compuestos xenobióticos. Éstas dan soporte a la gran densidad de biomasa microbiana lo que facilita los procesos de mineralización gracias al mantenimiento de pH, la concentración de soluto localizada y el potencial redox de las células (Nilanjana 2012).

La remoción de tintes de los efluentes es hoy en día una de las mayores preocupaciones ambientales. Comparado a otros contaminantes, sólo hay pocos reportes disponibles en la remediación de tintes sintéticos usando biopelículas. Por ejemplo, en 1994 Jiang y Bishop emplearon biopelículas para la degradación aeróbica de tres tintes azoicos. En 1995, Zhang et al. emplearon la bacteria *Methylosinus trichosporium* para tintes sintéticos usando un reactor de biopelícula rotatorio.

Respecto a biopelículas de basidiomicetos, en 1992, se cultivó *Phanerochaete chrysosporium* en sistema de biopelícula (Venkatradi e Irvine 1993), obteniendo una mayor actividad enzimática de lignina peroxidasa en este sistema que en un reactor tanque convencional. En otros estudios se empleó a *Coriolus versicolor* en un reactor de biodisco rotario para decoloración de colorantes textiles (Kapdan y Kargi 2001). Recientemente

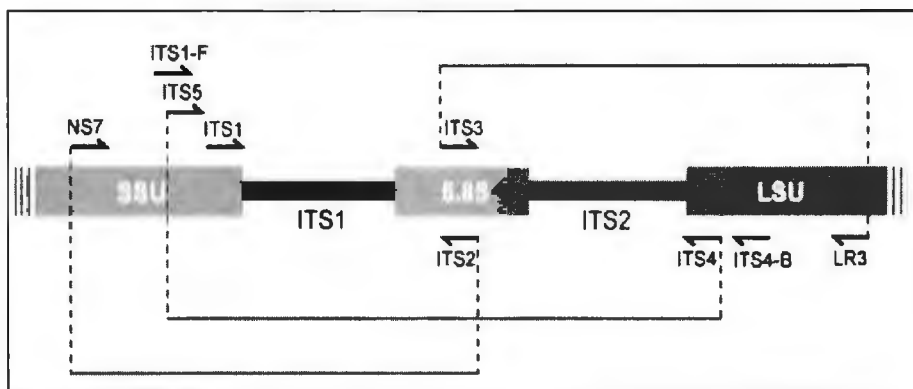
Pesciaroli et al. (2013) reportaron la formación de biopelículas de *Pleurotus ostreatus* en distintos soportes y midieron actividades enzimáticas de lacasas y peroxidasas dependientes de Mn.

2.6 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

La extracción de ADN unida a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha mejorado significativamente el proceso de identificación de hongos. Esta técnica permite la amplificación *in vitro* de un fragmento o región de ADN específico a través de sucesivos ciclos. Este proceso envuelve tres fases: desnaturalización, alineación y extensión. Esto permite la amplificación exponencial de una secuencia de ADN específica (Nautiyal y Dion 2008; Gherbawy y Voigt 2008).

Generalmente esta región es el operón ribosomal (ARNr). Cada unidad contiene genes de ARNr altamente conservados como 18S, 5.8 S, 28 y 5S (en algunos taxos) y regiones espaciadoras variables o regiones no codificantes (ITS: internal transcribed spacer region, e IGS: intergenic spacer regions) permitiendo la comparación y discriminación de hongos a distintos niveles taxonómicos (Prewitt et al. 2008).

Figura 3. Posición de los genes de ARNr y *primers* en hongos (Bellemain,2010).



El 28S (unidad grande) y 18S (unidad pequeña) del gen ARNr permiten la identificación a niveles de género y familia. La contraparte de éste último en bacterias (16S) es ampliamente usada pero el gen 18S en hongos tiene menos dominios hipervariables (Schoch et al. 2012).

ITS e IGS, por su parte, son más variables que otras regiones del ARNr, presentando pocas o nada de homologías entre genomas divergentes. Los polimorfismos de la región ITS permiten la identificación entre especies. Además la amplia data que existe corresponde lo obtenido mediante estas regiones. En algunas especies, la región IGS es más variable y es usado para identificar polimorfismos intraespecíficos para otros tipos de estudios (Nautiyal y Dion 2008).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Material descartable

- Algodón.
- Bolsas de muestreo.
- Cinta de embalaje.
- Gorras.
- Guantes de látex.
- Guantes de nitrilo.
- Mascarilla.
- Microtubos de 1.5 mL.
- Papel filtro de paso rápido.
- Parafilm.
- Placas Petri descartables.
- Puntas de micropipeta de 1-10 μ L, 10-200 μ L, 100-1000 μ L.
- Cubetas de espectrofómeto
- Tubos de centrifuga cónicos de 50 y 15 mL.

3.1.2 Instrumentos

- Asa de siembra.
- Crioviales.
- Cronómetro.

- Embudo *Bushner*.
- Matraces de 250 mL.
- Micropipetas.
- Mortero y pilón.
- Papel toalla.
- Perlas de vidrio de 3 y 12 mm de diámetro.
- Perlas de vidrio.
- Pipetas de 10 mL.
- Placas de vidrio de 10 cm x 15 cm.
- Portatubos *ependorf* de 1.5 mL
- Probetas de 50, 100, 500 y 1000 mL.
- Rack de policarbonato.
- Racks para tips
- Rotuladores y etiqueta.
- Sacabocados de 5 y 10 mm de diámetro.
- Tela de poliéster.
- Termómetro
- Tubos de ensayo 25 x 250 mm.
- Vasos de precipitado.
- Pinzas.
- Bisturí.
- Beakers.
- Hoja de bisturí.

3.1.3 Medios de cultivo

- Agar Czapek Plus Modificado.
- Agar extracto de Malta.
- Medio de aislamiento de basidiomicetos.
- Medio de formación de inóculo o biopelícula

3.1.4 Soluciones

- Alcohol al 70% y al 96%.
- Solución de tintes azoicos al 4%.
- Suero fisiológico 0.85%.
- Tetraciclina 10 mg/ml.

3.1.5 Reactivos de Biología Molecular

- Agarosa.
- Agua DEPC Libre de Nucleasas.
- Alcohol Isoamílico
- *Buffer* de corrida de ADN para electroforesis.
- Cebadores 18S rARN.
- Cloroformo
- Dinucleotidos Trifosfatados (dNTPS).
- GoTaq Polimerasa.
- Marcador de corrida.
- Nitrógeno Líquido.
- RNAsa
- Tampón de reacción GoTaq.
- β -mercapto-etanol

3.1.6 Equipos

- Agitador mecánico orbital DRAGON LAB.
- Autoclave.
- Balanza analítica OHAUS.
- Balanza de platillo.
- Baño María
- Cámara de flujo laminar.
- Cámara fotográfica digital SONY.

- Cámara fotográfica MOTIC de microscopio.
- Cámara y peines de electroforesis.
- Congeladora de -20°C.
- Congeladora de -80°C.
- Equipo de Baño María.
- Espectrofotómetro HP.
- Fotodocumentador BIORAD.
- Horno de secado.
- Horno microondas.
- Incubadora de 28°C.
- Microcentrífuga.
- Micropipetas DRAGONLAB.
- Microscopio binocular NITLAB.
- Potenciómetro.
- Refrigeradora.
- Shaker.
- Termociclador BIORAD.
- Vórtex.

3.1.7 Material Biológico

- Cuerpos fructíferos colectados de localidades de Tingo María, Pucallpa y UNALM.

3.1.8 Efluente Textil Real

El efluente textil fue muestreado en el Río Huaycoloro ubicado en el distrito de San Juan de Lurigancho. Este efluente proviene de una empresa textil que se encarga del teñido y lavado de prendas. Se colectaron de un tubo de descarga cuyas coordenadas geográficas son 12° 00'29"S y 76° 55'52"O.

3.2 MÉTODOS

Todos los experimentos fueron realizados en asepsia y esterilidad. Los materiales e instrumentos autoclavables, así como los medios de cultivo, fueron esterilizados mediante autoclavado por 20 minutos a 121 °C y 15 libras de presión. Los ingredientes que son agregados posteriormente al autoclavado, se especifican en cada experimento.

Las fotos presentadas en los anexos de los siguientes experimentos fueron tomadas con la cámara digital SONY empleando la opción de colores reales.

3.2.1 Aislamiento y reactivación de basidiomicetos

Se colectaron basidiocarpos de Tingo María, Pucallpa y UNALM. Éstos fueron desinfectados con lejía diluida en agua destilada en una proporción 1:1 durante 10 minutos. Posteriormente, fueron lavados cada 10 minutos con agua estéril hasta retirar toda la lejía residual. Se cortaron fragmentos pequeños de basidiocarpos y se sembraron en un medio de aislamiento cuya composición por litro fue la siguiente: extracto de malta 20 g, benomil 0.004 g, etanol 20 mL, tetraciclina 0.1 g y guayacol 0.4 mL. Se autoclavó el benomil independientemente a 115° por 5 minutos. Éste, al igual que etanol, la tetraciclina y guayacol se agregaron previamente al plaqueo.

Asimismo, los basidiomicetos pertenecientes al cepario del Laboratorio de Micología y Biotecnología fueron reactivados empleando el mismo medio de cultivo.

Del total de basidiomicetos aislados, cuyos basidiocarpos lograron desarrollar micelio, y de los que fueron reactivados, se seleccionaron aquellos que formaron un halo marrón-rojizo en el medio de cultivo (reacción guaiacol-positiva) para efectuar un posterior tamizado de actividad decoloradora.

Estos experimentos fueron realizados por triplicado.

Finalmente se tomaron microfotografías de los basidiomicetos aislados con una cámara MOTIC conectada a microscopio a un aumento de 40X del lente objetivo. El tiempo de cultivo de las cepas utilizadas fue de cuatro días.

3.2.2 Tamizado de basidiomicetos con actividad decoloradora

Se prepararon soluciones stock de tintes azoicos a 4 % (p/v) en agua estéril. Los tintes empleados fueron Azul Brillante, Levafix Amarillo, Levafix Rojo, Remazol Negro, Remazol Rojo, Rojo Profundo, Synozol Amarillo y Synozol Turquesa.

Se siguieron los siguientes pasos por cada cepa de reacción guaiacol-positiva y por cada colorante:

- a) La cepa se cultivó en agar extracto de malta cuya composición por litro fue: extracto de malta 30 g, peptona de harina de soya 3 g, agar-agar 15 g. Se agregó tetraciclina previamente al plaqueo a una concentración de 0.1g/L.
- b) Al cabo de 96 horas de crecimiento, con ayuda de un sacabocado de 5 mm de diámetro, se tomó un disco de agar con colonia y se colocó en el centro de un placa petri (de 8 cm de diámetro) con medio de tamizado Agar Czapek Plus modificado cuya composición por litro fue: glucosa 10 g, $(\text{NH}_4)\text{SO}_2$ 0.9429 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, K_2HPO_4 0.5 g, KCl 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, agar-agar 15 g; tinte azoico 0.4 g. Se agregó el tinte a este medio a partir de la solución stock y en el momento previo al plaqueo.
- c) Las placas sembradas fueron incubadas a 28 °C para basidiomicetos. La evaluación se realizó cada dos días a partir de las 24 horas.

Estos experimentos de tamizado se realizaron por triplicado.

3.2.3 Pruebas de hidrofobicidad de las cepas decoloradoras

Esta prueba permitió evaluar el grado de hidrofobicidad de las cepas que presentaron decoloración en el tamizado para evaluarlas como potenciales formadoras de biopelículas. El experimento se llevó a cabo con colonias crecidas en medio agar extracto de malta. Con ayuda del sacabocado fueron sembradas en medio agar extracto de malta en el centro de una placa Petri, y la prueba de hidrofobicidad llevó a cabo a cabo el día en el que la cepa alcanzó el diámetro total de la placa (8 cm), o en su defecto, el día en el que llegó al límite de su crecimiento. Este criterio tuvo como propósito que la colonia tuviese un desarrollo suficiente tal que permita evaluar la diferencia entre una zona de micelio joven (bordes de la placa) y micelio de más tiempo de cultivo (interior de la placa).

Cada experimento fue realizado por triplicado.

3.2.3.1 Prueba de hidrofobicidad con detergentes y agua destilada

Se basó en el método empleado por Villena et al. (2001) y se emplearon los detergentes Tween 80 al 0.1 %, NaEDTA 50 mM, SDS al 0.2%, una combinación de NaEDTA 50 mM/SDS al 0.2% y agua destilada con el propósito de evaluar la hidrofobicidad del micelio.

El experimento consistió en colocar una gota de 4 μ L de estas soluciones en la colonia crecida y observar el tiempo en que demora en ser absorbida por el micelio dentro de un intervalo de diez minutos. Se consideró como cepa hidrofóbicas cuando el tiempo fue mayor a cinco minutos. Se tuvieron en cuenta la zona central y los bordes de la placa.

3.2.3.2 Prueba de hidrofobicidad con soluciones de alcohol

Se basó en el método utilizado por Chau et al. (2010) y se emplearon soluciones de alcohol que iban de 0 a 100% (v/v) con incrementos de 5 % entre solución y solución. El

experimento consistió en colocar una gota de 4 μ L de todas las soluciones y observar en la colonia crecida y observar si dentro del intervalo de cinco a diez segundos la gota se mantenía o no. Se determinó la concentración máxima de alcohol a la que la gota se seguía manteniendo dentro de este intervalo de tiempo.

Finalmente, para todos los experimentos posteriores se seleccionaron las dos cepas que presentaron mayor eficiencia de decoloración en el tamizado (punto 3.2.2) y que resultaron hidrofóbicas según los protocolos detallados.

3.2.4 Estandarización de protocolo de formación de biopelículas de basidiomicetos

El protocolo de formación de biopelícula se basó en el protocolo empleado por Villena y Gutiérrez-Correa (2003) para formación de biopelícula de *Aspergillus niger*, con modificaciones en la formación de inóculo pues, a diferencia de éste donde se emplearon esporas, se empleó micelio fragmentado y homogenizado (Karapinar Kapdan y Kargi 2002; Pesciaroli et al. 2013) debido a que los basidiomicetos casi nunca forman esporas en medio sintético (Homolka 2013, Croan 2001, Adam y Samson 2011).

3.2.4.1 Número y tamaño de perlas para formación de inóculo

Los basidiomicetos seleccionados se cultivaron por 96 horas a 28°C en medio agar extracto de agar malta.

Con ayuda del sacabocado, de 10 mm de diámetro, se extrajeron tres discos de agar extracto de malta con la colonia crecida de los bordes de la placa y se incorporaron en 30 mL de medio líquido (en matraces de 250 mL) cuya composición por litro fue de: glucosa 7 g, peptona 3, extracto de levadura 2 g, extracto malta 2 g.

Se realizaron cuatro tratamientos respecto al tamaño de perlas empleadas y el número de las mismas usadas para fragmentar y disgregar la biomasa con el fin de formar propágulos. El primer tratamiento contenía diez perlas de 5 mm de diámetro, el segundo veinte perlas de 5mm de diámetro, el tercero tres perlas de 12 mm de diámetro y el cuarto seis perlas de 12 mm de diámetro. Se llevó a agitación a 175 rpm. por 72 horas a 28°C. Se escogió el tratamiento que generó mayor disgregación para generar el inóculo a usarse.

Estos experimentos se realizaron por triplicado.

3.2.4.2 Inóculo de biopelícula

Se realizaron los siguientes pasos:

- a) La biomasa formada, a partir de la biomasa disgregada con perlas, se colectó en un tubo de centrifuga de 50 mL y se centrifugó a 4000 r.p.m. por 12 minutos. Se descartó el sobrenadante completamente y se conservó el pellet de biomasa obtenido cuyo volumen fue determinado.
- b) Se agregó un volumen determinado de suero fisiológico (0.85% NaCl en agua destilada) al tubo de centrifuga en una relación 2:1 respecto al volumen del pellet de biomasa.
- c) De igual forma, se añadió un volumen de perlas de 3mm de diámetro en relación a de 1:2 respecto al volumen de este mismo pellet.
- d) Se llevó el tubo de centrifuga a vórtex por minuto y medio, tiempo en el que el pellet fue resuspendido en el suero con ayuda de las perlas de 3 mm de diámetro. Se obtuvo finalmente una mezcla homogénea de biomasa resuspendida y disgregada en suero fisiológico. Esto se consideró como inóculo.

3.2.4.3 Protocolo de formación de biopelículas de basidiomicetos

Se emplearon dos soportes sólidos: tela de poliéster y malla de metal.

El protocolo consistió en los siguientes pasos para cada soporte:

- a) Se retiraron 2.5 mL del inóculo y fueron incorporados en matraces de 250 mL que contenían 50 mL de agua destilada y un cuadrado de 2.6 cm de lado como soporte para biopelícula para mantener una relación $0.27 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$ respecto al medio (Villena 2006). Se llevó a agitación a 175 r.p.m. a 28°C durante treinta minutos (tiempo de contacto), con el propósito de generar interacciones entre los propágulos del inóculo y el soporte sólido empleado.
- b) Posteriormente se retiró los 50 mL de agua con propágulos no adheridos y se agregaron 50 mL de agua destilada al matraz. Se llevó nuevamente a agitación a 175 rpm durante 15 minutos a la misma temperatura con el propósito de lavar propágulos remanentes que no hayan sido adheridos al soporte sólido.
- c) Este lavado se repitió una vez más por 15 minutos en las mismas condiciones.
- d) Finalmente se descartó el agua destilada y se transfirió el soporte inoculado a un medio líquido para formación de biopelícula cuya composición por litro fue la misma que la del medio de formación de inóculo.
- e) Se incubaron los matraces a 175 rpm y a 28°C hasta 72 horas para evaluar el crecimiento de biopelícula.

3.2.5 Cinética de crecimiento de biopelícula.

Se colectaron matraces de biopelículas a 8, 16, 24, 36, 48, 60 y 72 horas en los cuales se determinó la biomasa adherida, biomasa no adherida, e inóculo empleado en el protocolo tanto en la formación de biopelículas en soporte de poliéster como en soporte de metal.

Para determinar biomasa de la biopelícula, se realizaron dos lavados de 50 mL con agua destilada para retirar todos los restos de medio y se llevó al horno a 105°C hasta peso constante.

Para determinar la biomasa no adherida se filtró el medio de formación de biopelícula en papel filtro de paso rápido pre-pesado, se enjuagó con agua destilada empleando la bomba de vacío y se mandó a secar. Para determinar el inóculo empleado, se agregó 2.5 mL del mismo a un tubo pre-pesados y se colocó en horno a 105°C hasta peso constante.

Se evaluó el porcentaje de adherencia considerando la biomasa de la biopelícula (biomasa adherida) y la no adherida a partir de la siguiente fórmula.

$$\text{Porcentaje de adherencia (\%)} = \frac{\text{Biomasa adherida (g/L)} \times 100 \text{ \%}}{\text{Biomasa adherida (g/L)} + \text{biomasa no adherida (g/L)}}$$

Cada experimento se realizó por triplicado.

3.2.6. Cinética de decoloración de biopelículas de basidiomicetos

3.2.6.1 Estandarización de medio líquido para pruebas de decoloración

A partir del protocolo de formación (punto 3.2.4.3) se obtuvieron biopelículas de 72 horas de crecimiento de las dos cepas seleccionadas y empleado el soporte sólido más conveniente según resultados previos (punto 3.2.5).

Para cada biopelícula, el medio de formación de biopelícula fue retirado y se agregaron 50 mL de suero fisiológico, con el propósito de retirar el medio remanente. Se llevó a agitación a 175 r.p.m. a 28°C por 30 minutos. Posteriormente se realizó un nuevo lavado a las mismas condiciones y por el mismo tiempo. Luego, el suero fisiológico fue descartado completamente y se transfirió la biopelícula al respectivo medio de decoloración.

Se efectuaron tres tratamientos empleando tres medios distintos que tuvieron como propósito evaluar qué cuál de estos medio sería el más adecuado para cada cepa seleccionada. La diferencia entre los medios fue la cantidad de glucosa y de extracto de

levadura. Las sales se basaron en el medio reportado por Moreira et al. (2013). Las formulaciones fueron las siguientes:

- Medio 1: glucosa 0.1g, extracto de levadura 0.1 g, KH_2PO_4 , 0.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.016 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.013 g.
- Medio 2: glucosa 2.5 g, extracto de levadura 1.25 g, KH_2PO_4 , 0.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.016 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.013 g.
- Medio 3: 5 g, extracto de levadura 2.5 g, KH_2PO_4 , 0.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.016 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.013 g.

Se ajustaron los tres medios a pH 6 y se les agregó una mezcla de tintes azoicos a una concentración de 0.4 g/L. La mezcla de tintes azoicos consistió en una mezcla 1:1 de los dos tintes que evidenciaron mayor decoloración en el tamizado en sólido de las dos cepas seleccionadas: Azul Brillante y Synozol turquesa. Los matraces se llevaron a agitación a 175 r.p.m. a 28°C.

Para determinar la biomasa inicial dos biopelículas fueron lavadas a las cero horas de decoloración.

Se retiraron alícuotas de 400 μL cada 24 horas durante el tiempo de 96 horas, para posteriores mediciones en espectrofotómetro. El control de experimento sólo contuvo el soporte sólido y el medio de decoloración con la mezcla de tintes.

Al cabo de las 96 horas, se colectó el medio de decoloración pasándolo por papel filtro pre-pesado para determinar cualquier resto de biomasa circundante. Este papel filtro fue lavado y llevado al horno a 105°C hasta peso constante para determinar peso seco. Por último, la biopelícula fue lavada dos veces con 50 mL de agua destilada y llevado al horno para determinar la biomasa al final de la decoloración.

La medición de la decoloración se realizó siguiente el protocolo descrito en el punto 3.2.6.3. Finalmente se optó por el medio que presentó más ventajas.

Cada experimento se realizó por duplicado.

3.2.6.2 Cinética de decoloración de tintes azoicos

A partir del protocolo de formación (punto 3.3.4.3) se obtuvieron biopelículas de 48 y 72 horas de crecimiento de las cepas seleccionadas.

Se siguieron los siguientes pasos para cada biopelícula:

- a) Se descartó el medio de formación de biopelícula y se agregaron 50 mL de suero fisiológico, con el propósito de lavar el medio de formación remanente. Se llevó a agitación a 175 r.p.m. a 28°C por 30 minutos.
- b) Se realizó un nuevo lavado, retirando los 50 mL de suero fisiológico anteriores y agregando otros nuevos 50 mL. Se llevó a 175 rpm por el mismo tiempo.
- c) El suero fisiológico fue descartado completamente y se transfirió la biopelícula al medio de decoloración cuya concentración por litro fue: glucosa 0.1g, extracto de levadura 0.1g, KH_2PO_4 0.2g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.05g; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.016g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.013 g, tinte azoico 0.4 g. El pH fue ajustado a 6. El tinte fue agregado al medio autoclavado, previo a la transferencia de la biopelícula.
- d) Se llevó a agitación a 175 r.p.m. a 28°C.
- e) Para determinar la biomasa inicial dos biopelículas fueron lavadas a las cero horas de decoloración y llevadas a hora a 85°C hasta peso constante.
- f) Se retiraron alícuotas de 400 μL de los medio de decoloración cada 24 horas durante el tiempo 96 horas, para posteriores mediciones en espectrofotómetro. El control de experimento sólo contuvo el soporte sólido y el medio de decoloración con el tinte azoico.

- g) Al cabo de las 96 horas, se colectó el medio de decoloración pasándolo por papel filtro pre-pesado para determinar cualquier resto de biomasa circundante. Este papel filtro es lavado llevado al horno para determinar peso seco. Por último, la biopelícula fue lavada con 50 mL de agua destilada dos veces antes de llevar a horno a 85°C hasta peso constante horas para determinar el peso seco de la misma al final de la decoloración.

Cada experimento se realizó por duplicado.

3.2.6.3 Medición de decoloración

Las alícuotas extraídas cada 24 horas, durante las 96 horas de la cinética de decoloración, tanto de los controles (que en vez de biopelícula contenían sólo el soporte de tela de poliéster) como de las muestras de medio de decoloración con biopelículas, fueron medidas por espectrofotometría y analizadas siguiendo los siguientes pasos:

- a) Se realizó un espectro de absorción entre 190 y 820 nm para determinar la longitud de onda de máxima absorción de los tintes o, en el caso de la estandarización del medio de decoloración, la longitud máxima de la mezcla de tintes que se encuentren dentro de la región visible (380 -780 nm). Esta longitud de onda máxima se empleó para determinar concentraciones de tintes. La absorbancia en el tiempo de cero horas de decoloración correspondió al cien por ciento de la concentración de tinte inicial.
- b) Para cada alícuota (tanto de los matraces controles como de los matraces con biopelículas) se realizaron diluciones con el fin de obtener lecturas medibles y confiables. El espectro fue calibrado a cero de absorbancia con el medio de decoloración sin colorante.

- c) Se determinó la concentración del medio de decoloración empleando una curva estándar absorbancia versus concentración y multiplicando por la respectiva dilución como basándose en procedimientos de trabajos anteriormente reportados (Işık y Sponza 2003; Chen et al.2003; Mitrovic et al. 2012; Perumal et al. 2012).
- d) Para estimar el porcentaje de decoloración se empleó la siguiente fórmula basado en la reportada por Tripathi y Srivastava (2011) y Praveen y Bhat (2012):

$$\text{Porcentaje de decoloración (\%)} = \frac{(C_0 - C_t) \times 100\%}{C_0}$$

- C_t : Concentración de tinte de la muestra a unas horas específica.
 - C_0 : Concentración de tinte del control a las mismas horas que la muestra.
- e) Finalmente se elaboró una curva de porcentaje de decoloración respecto al tiempo.

3.2.7 Efluentes simulados y reales

3.2.7.1 Preparación de efluentes simulados

Se elaboraron efluentes simulados a partir de la metodología reportada por Manu y Chaudhari (2001) y por O'Neill et al (2000) y considerando la misma cantidad de nutrientes y sales empleados en el medio de decoloración.

Los componentes por litro fueron: almidón previamente tratado 1 g, NaCl 0.15 g, NaHCO₃ 0.15 g, ácido acético 0.53 g, glucosa, 0.1 g extracto de levadura 0.1 g, KH₂PO₄ 0.2g, MgSO₄·7H₂O 0.05g, CuSO₄·5H₂O 0.05g, MnSO₄·H₂O 0.016g, CaCl₂·2H₂O 0.013, mezcla de tintes previamente tratada a una concentración de 0.4 g/L de cada tinte azoico.

El pH fue ajustado a 6, 7.7 y 9.4 para simular 3 casos distintos de efluentes. El primer pH corresponde al empleado en las cinéticas de decoloración, el pH 9.4 corresponde al empleado por O'Neill et al (1999) en un tratamiento de efluente simulado. El pH 7.7 corresponde a un punto intermedio entre estos dos pHs.

Se empleó 6 soluciones stock de tintes (40g/L) mezclándolos en iguales proporciones que fueron: Azul Brillante, Levafix Amarillo, Remazol Rojo, Rojo Profundo, Synozol Amarillo y Synozol Turquesa. Esta mezcla fue tratada ajustando a pH 12 con NaOH 1 M y calentándolo a 80°C por 2 h para simular la forma en la que se encuentran los tintes normalmente un efluente industrial. Asimismo, el almidón fue hidrolizado para similares razones mezclando una solución de 100 g/L con una solución de NaOH 1M y dejándolo a temperatura ambiente por toda una noche.

3.2.7.2 Efluente real

Al efluente muestreado de la empresa textil de San Juan de Lurigancho se le añadieron los nutrientes y sales empleados en el medio de decoloración. Por litro se agregó: glucosa 0.1 g, extracto de levadura 0.1 g, KH_2PO_4 0.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.016 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.013. El pH inicial fue 7.

El efluente era de color azul/turquesa y contenía partículas no solubles de color azul intenso, provenientes de la actividad industrial de la empresa.

3.2.7.3 Protocolo de cinética de decoloración en efluentes

- a) Se obtuvo una biopelícula de basidiomiceto de 72 horas a partir del protocolo de formación.
- b) El medio de formación de biopelícula se retiró y se lavó la biopelícula con 50 mL de suero fisiológico dos veces a 175 r.p.m. a 28°C por 30 minutos.
- c) Se transfirió la biopelícula a un matraz con 50 mL del efluente.

- d) Se lleva a agitación a 175 r.p.m. a 28°C.
- e) Para determinar la biomasa inicial dos biopelículas fueron lavadas a las cero horas de decoloración y llevadas a hora a 85°C hasta peso constante.
- f) Se retiraron alícuotas de 400 µL cada 24 horas durante 96 horas de los efluentes para posteriores mediciones en espectrofotómetro. El control de experimento tiene sólo el soporte sólido y el efluente.
- g) Al cabo de las 96 horas, se colectó el efluente pasándolo por papel filtro pre-pesado para determinar cualquier resto de biomasa no adherida. Este papel filtro fue llevado al horno a 105°C para determinar peso seco.
- h) La biopelícula fue lavada con 50 mL de agua destilada dos veces antes de llevar a horno a 105°C para determinar el peso seco de la misma al final de la decoloración.

Cada experimento se realizó por duplicado.

3.2.7.4 Protocolo de medición de decoloración en efluentes

3.2.7.4.1 Efluentes simulados

Las alícuotas extraídas cada 24 horas, durante las 96 horas de la cinética de decoloración de los efluentes, tanto de los controles así como como de las muestras de efluentes con biopelículas fueron medidas por espectrofotometría y el porcentaje de decoloración fue medido según el protocolo establecido en el punto 3.2.6.3. La longitud máxima de absorción correspondió a la mezcla de tintes en el efluente como indica el protocolo de Adonsinda et al. (2003). El blanco muestra empleado fue el efluente simulado sin el tinte añadido.

3.2.7.4.2 Efluentes reales

Para el caso del efluente real, no fue posible elaborar una curva estándar de absorbancia vs concentración por lo que se empleó un método alternativo para determinar el porcentaje de decoloración.

Debido a que los efluentes presentaban partículas sólidas directas de la actividad de la industria textil, tanto las alícuotas del control como de las muestras fueron centrifugadas para emplear el sobrenadante en medición en espectrofotómetro. Se empleó agua destilada como blanco.

Se determinó la longitud de onda de máxima absorción (dentro del espectro visible) del control mediante un escaneo a distintas longitudes de onda para realizar todas las mediciones. El porcentaje de decoloración se halló directamente partir de la siguiente fórmula basándose en la reportada por Tripathi y Srivastava (2011) y Praveen y Bhat (2012):

$$\text{Porcentaje de decoloración (\%)} = \frac{(A_0 - A_t) \times 100\%}{(A_0)}$$

- A_t : Absorbancia de la muestra a una hora específica
- A_0 : Absorbancia de la muestra en tiempo cero.

Finalmente se elaboró una cinética de porcentaje de decoloración respecto al tiempo.

3.2.8 Análisis Molecular

3.2.8.1 Extracción de ADN

Se cultivaron las cepas en agar extracto de malta por 96 horas. De estas placas, con ayuda del sacabocado de 10 mm de diámetro, se extrajeron tres discos de agar que fueron inoculados en 50 mL de medio de cultivo líquido, cuyos componentes fueron los mismos del medio de formación de inóculo por generar una cantidad considerable de biomasa. Este medio contenía además seis perlas de 12 mm para disgregar la biomasa. Se llevó a agitación a 175 rpm a 28°C por 72 horas para todas las cepas, excepto para LMBU6 y BAS1 para las que se consideró 120 horas por su lento crecimiento. Esta biomasa fue centrifugada en tubos cónicos de 50 mL y fue lavada resuspendiéndola con 40 mL de agua destilada y centrifugando nuevamente. Este lavado se repitió tres veces más. El pellet de biomasa fue molido con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo muy fino y se llevó a cabo la extracción adaptando el protocolo de Prabha et al. (2013) incluyendo además el empleo de β -mercaptoetanol.

A partir de 350 mg de biomasa molida colocada en un microtubo de 1.5 mL se siguió el siguiente protocolo de extracción.

- a) Se Agregaron a cada tubo 600 μ L de *buffer* de extracción cuya composición fue: TrisHCl 50 mM (pH 7.2), EDTA 50 mM, SDS 3% (p/v), β -mercaptoetanol 1% (v/v). El 2-mercaptoetanol fue agregado previamente a la extracción.
- b) Se agitó con vórtex por 10 minutos y se incubó a 65° por 60 minutos.
- c) Se agregó a cada tubo 600 μ L de CHCl₃/alcohol isoamílico (24:1), se mezcló por inversión y se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos. Se recuperó el sobrenadante.
- d) Se agregaron 0.5 volúmenes de 3M acetato de sodio (pH 5.8), se mezcló por inversión y se refrigeró por 30 minutos.
- e) Se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos. Se recuperó el sobrenadante de cada tubo.

- f) Se agregaron a cada tubo 2 volúmenes de etanol absoluto y se mezcló por inversión y se refrigeró a -20°C por toda una noche.
- g) Se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos y se descartó el sobrenadante.
- h) Se agregó 300 μL de etanol al 70% al pellet obtenido, se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos y se descartó el sobrenadante.
- i) Se secó el pellet a temperatura ambiente y, una vez seco, se eluyó en 40 μL de agua DECP.
- j) Se agregó 2.5 μL de RNasa 10 μM a cada tubo y se incubó a 37°C por 15 minutos.
- k) Finalmente, mediante espectrofotometría se determinó la concentración del ADN a 260 nm, y se empleó las relaciones de absorbancias $\text{Abs}_{260\text{nm}} / \text{Abs}_{230\text{nm}}$ y $\text{Abs}_{260\text{nm}} / \text{Abs}_{280\text{nm}}$ como indicadores de pureza de ADN extraído para compuestos fenólicos y proteínas respectivamente (THERMO SCIENTIFIC 2014). Valores en el rango de 2.0-2.2 y valores de alrededor de 1.8 para las respectivas relaciones indican un alto grado de pureza de ADN. La calidad del ADN fue determinada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (80 v, por 45 minutos).

3.2.8.2 PCR

Las secuencias ITS “Internal Transcribed Spacer” fueron amplificadas mediante el empleo de los *primers* ITS 1 (5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG'-3') e ITS 4 (5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC'-3) reportados inicialmente por White et al. 1990 para genes de ARN ribosomal por tener una remarcable robustez y funcionar en una amplia diversidad de hongos (Seifert 2009).

Las reacciones de amplificación (PCR), se realizaron en tubos de PCR de 200 μL y en un termociclador BIORAD. Por cada 50 μL del volumen total de reacción PCR contuvo lo siguiente: 10 μL de *buffer* PCR al 5X, 5 μL de MgCl_2 25 mM, 3 μL de dNTPs 10 mM, 1 μL de *primer forward* y 1 μL de *primer reverse*, 0.4 μL de GoTaq polimerasa de 5u/ μl y 3 μL de ADN de 50ng/ μl y agua DEPC hasta completar 50 μL .

Los ciclos de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos; 25 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 minuto, alineamiento a 57°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 2 minutos y una extensión final a 72°C por 5 minutos.

Los productos de amplificación se evaluaron mediante electroforesis, cargando 3 µL del amplificado en gel de agarosa al 1.0 % en *buffer* Tris-Acetato-EDTA (TAE) con bromuro de etidio 1X a 80 voltios durante 1 hora. Los productos de la amplificación fueron mezclados con 0.8 µL con el *buffer* de carga para electroforesis 6X Loading Dye Solution. Un marcador Lambda DNA/HindIII fue incluido como referencia de pesos moleculares y cargado al extremo izquierdo del gel. Posteriormente los geles fueron observados bajo luz ultravioleta en un fotodocumentador de geles BIORAD, e inmediatamente fotografiados.

3.2.8.3 Secuenciamiento y análisis de secuencias de ADN

La purificación de los productos de PCR y el secuenciamiento fue realizado por Macrogen Inc., Seoul, Korea del Sur (<http://www.macrogen.com>).

El ensamblaje y el análisis computacional de las secuencias de ADN se realizaron utilizando el programa BioEdit. V7. 2.5.

Las similitudes de las secuencias ARNr ITS fueron comparadas con las secuencias de la base de datos del NCBI Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando la búsqueda BLAST y se consideró sólo aquellos con un 98% similitud como mínimo.

3.2.9 Análisis estadístico

Todos los análisis fueron llevados a cabo con el programa STATGRAPHICS.

Para los análisis estadísticos se consideró lo siguiente:

- Se empleó un nivel de confianza de 95% ($\alpha=0.05$).
- Se rechazó la hipótesis nula si el p-valor obtenido es menor a 0.05.
- Se verificaron los supuestos necesarios antes de realizar las pruebas empleadas.
- Para analizar dos muestras independientes se empleó la prueba de T de Student.
- En caso de comparar más de tres tratamientos se empleó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar la presencia o no de diferencias significativas entre los mismos. De existir diferencias significativas se procedió a usar la prueba de diferencias múltiples de Duncan.
- Las variables respuestas para comparar biomásas fueron los “g/L” en experimentos de cinética de crecimiento, y para las comparaciones en cinéticas de decoloración la variable respuesta fue el “porcentaje de decoloración” para estandarización del medio, tintes azoicos, efluentes simulados y efluentes reales.

IV- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 AISLAMIENTO Y REACTIVACIÓN DE BASIDIOMICETOS

Se colectaron 75 cuerpos fructíferos de diferentes localidades de la Selva (Tingo María y Pucallpa) y de UNALM, sin embargo diez lograron desarrollar micelio en el medio aislamiento. Por otro lado, el cepario de basidiomicetos del laboratorio de Micología y Biotecnología contaba con cinco cepas de basidiomicetos (anexo 1). Se verificó los caracteres diagnósticos de las cepas como presencia de fíbulas e hifas septadas mediante microscopía propios de los basidiomicetos (las microfotografías se muestran en el anexo 2). El tabla 1 resume los resultados hallados.

Del total de basidiocarpos desinfectados sólo el 17.3 por ciento lograron desarrollar micelio en el medio de aislamiento. Además, muchos de los basidiocarpos tenían células activas pues presentaron actividad guaiacol (reacción guaiacol positiva en el medio de aislamiento) pero no crecieron. Por lo tanto, todo esto evidenció que los basidiomicetos son muchas veces difíciles o imposibles de cultivar en medio sintético como ha sido ampliamente reportado (Kenji et al. 1998, Adam y Samson 2011, Zambonelli y Bonito 2012).

Tabla 1. Relación de cepas aisladas de basidiomicetos de diferentes localidades de la selva y UNALM, y las correspondientes al cepario LMB

Cepa	Procedencia	Reacción Guaiacol	Días para alcanzar crecimiento máximo de colonia
LMBTM1	Basidiocarpó de Tingo María	Positiva	5 días, crecimiento completó toda la placa
LMBTM2	Basidiocarpó de Tingo María	Positiva	6 días, crecimiento completó toda la placa
LMBTM3	Basidiocarpó de Tingo María	Positiva	7 días, crecimiento completó toda la placa
LMBTM4	Basidiocarpó de Tingo María	Positiva	6 días, crecimiento completó toda la placa
LMBTM5	Basidiocarpó de Tingo María	Positiva	4 días, crecimiento completó toda la placa
LMBU6	Basidiocarpó de UNALM	Positiva	12 días, crecimiento completó toda la placa
LMBTM7	Basidiocarpó de Tingo María	Positiva	17 días, crecimiento completó toda la placa
LMBTM8	Basidiocarpó de Tingo María	Positiva	15 días, crecimiento completó toda la placa
LMBTM9	Basidiocarpó de Tingo María	Positiva	21 días, crecimiento completó toda la placa
LMBTM10	Basidiocarpó de Tingo María	Positiva	10 días, crecimiento no completó toda la placa
BAS1	Cepario LMB- Pucallpa	Positiva	7 días, crecimiento completó toda la placa

BAS6	Cepario LMB- Pucallpa	Negativa	17 días, crecimiento no completó toda la placa
BAS7	Cepario LMB- Pucallpa	Negativa	4 días, crecimiento completó toda la placa
BASH1A	Cepario LMB- Pucallpa	Positiva	11 días, crecimiento no completó toda la placa
BASH1C	Cepario LMB- Pucallpa	Positiva	17 días, crecimiento no completó toda la placa

El hecho de que casi la totalidad de cepas aisladas sea guaicaol-positiva se debe a que la colección de cuerpos fructíferos, incluyendo los del cepario del LMB, se enfocó principalmente en aquello que crecían en madera y que son conocidos por poseer sistema ligninolítico (Solís et al. 2012).

4.2 TAMIZADO DE BASIDIOMICETOS DECOLORADORES DE TINTES AZOICOS

Del total de trece cepas de reacción guaiacol positivas sólo siete resultaron decoloradoras: LMBTM1, LMBTM2, LMBTM3, LMBTM4, LMBTM5 LMBU6 y BAS1 (las fotografías se muestran en el anexo 3). Esto evidenció que a pesar de poseer enzimas ligninolíticas la capacidad de decoloración depende además de la cepa seleccionada y del tinte empleado (Osma 2010) En la siguiente tabla se resumen los resultados:

Tabla 2. Tamizado de cepas de basidiomicetos de reacción guaiacol positiva

Nombre	Tintes azoicos decolorados	Tiempo de inicio de decoloración (horas)	Tiempo final de decoloración (horas)	Extensión del halo de decoloración por el diámetro de placa
LMBTM1	Azul Brillante	72	168	Totalidad de la placa
	Levafix Rojo	120	312	Totalidad de la placa
	Remazol Negro	72	312	Totalidad de la placa
	Remazol Rojo	360	552	Totalidad de la placa
	Rojo Profundo	120	312	Totalidad de la placa
	Synozol Turquesa	24	312	Totalidad de la placa
LMBTM2	Azul Brillante	72	216	Totalidad de la placa
	Remazol Negro	264	552	Totalidad de la placa
	Rojo Profundo	216	408	Parcial, bordes gruesos sin degradar
	Synozol Turquesa	360	648	Parcial, bordes gruesos sin degradar
LMBTM3	Azul Brillante	120	360	Totalidad de la placa
LMBTM4	Azul Brillante	24	504	Totalidad de la placa, excepto bordes
	Levafix Rojo	24	408	Totalidad de la placa, excepto bordes
	Remazol Negro	72	452	Totalidad de la placa, excepto bordes
	Rojo Profundo	216	408	Totalidad de la placa, excepto bordes

	Synozol Turquesa	120	360	Totalidad de la placa, excepto bordes
LMBTM5	Azul Brillante	24	216	Totalidad de la placa
	Levafix Rojo	72	264	Totalidad de la placa
	Remazol Negro	24	216	Totalidad de la placa
	Remazol Rojo	120	408	Totalidad de la placa
	Rojo Profundo	72	264	Totalidad de la placa, excepto bordes
	Synozol Turquesa	24	264	Totalidad de la placa, excepto bordes
LMBU6	Azul Brillante	216	408	Parcial, pequeña extensión
BAS1	Azul brillante	120	504	Totalidad de la placa
	Levafix Rojo	264	648	Totalidad de la placa, excepto bordes
	Remazol Negro	312	456	Parcial, pequeña extensión
	Rojo Profundo	456	648	Parcial, bordes gruesos sin degradar
	Synozol Turquesa	168	408	Parcial, pequeña extensión

Se concluyó que las cepas menos eficientes fueron LMBTM3 y LMBU6 ya que sólo decoloraron Azul Brillante en un tiempo incluso relativamente mayor que las otras cepas. La cepa LMBTM2 decoloró cuatro tintes pero en dos casos fueron sólo decoloraciones parciales por lo que se le consideró poco eficiente. Así mismo, BAS1 y LMBTM4 decoloraron cinco tintes. Sin embargo BAS1 sólo presentó decoloraciones parciales y con

tiempos relativamente altos. Por otro lado, LMBTM4 presentó una decoloración limitada pues en la mayoría de los tintes no pudo decolorar los bordes y en tiempos medianamente altos. Por último, LMBTM1 y LMBTM5 decoloraron seis tintes correspondientes al máximo número de tintes decolorados en el presente tamizado. De otro lado, LMBTM1 fue la única cepa que presentó decoloración en la totalidad de la placa en los seis tintes, y los tiempos de decoloración menores. Por su parte, LMBTM5 generó decoloración total de placa salvo en Rojo profundo y Synozol turquesa y, aunque los tiempos que demoraron en alcanzar la máxima decoloración fueron casi iguales a los de LMBTM1, la actividad decoloradora en la mayoría se evidenció más tempranamente.

Por lo tanto, mediante este tamizado inicial las cepas LMBTM1 y LMBTM5 presentaron una mayor capacidad de decoloración en medios sólidos.

4.3 PRUEBAS DE HIDROFOBICIDAD DE LAS CEPAS DECOLORADORAS DE BASIDIOMICETOS

Dicha prueba corresponde a colonias de basidiomicetos con los días de cultivo necesarios para alcanzar crecimiento máximo en placa.

Tabla 3. Prueba de hidrofobicidad de micelio de cepas de basidiomicetos decoloradores de tintes azoicos

Cepa	Zona de la placa	(1) Prueba de hidrofobicidad con detergentes y agua					(2) Prueba de porcentaje de alcohol
		Tween 80	NaEDTA 50 mM	SDS 0.2%	SDS 0.2%/ NaEDTA 50 mM	Agua destilada	
LMBTM1	Bordes	> 6 min	> 10 min	> 10 min	> 10 min	> 10 min	55%
	Interior	> 6 min	> 10 min	> 10 min	> 10 min	> 10 min	55%
LMBTM2	Bordes	2 min	6 min	4.3 min	5 min	< 9 min	42.5%
	Interior	> 10 min	> 10 min	> 10 min	> 10 min	> 10 min	45%
LMBTM3	Bordes	2.7 min	> 10 min	> 10 min	> 10 min	> 10 min	40%

	Interior	4 min	> 10 min	> 10 min	> 10 min	> 10 min	50%
LMBTM4	Bordes	> 10 min	> 10 min	> 10 min	> 10 min	> 10 min	50%
	Interior	> 10 min	> 10 min	> 10 min	> 10 min	> 10 min	60%
LMBTM5	Bordes	> 10 min	> 10 min	> 10 min	> 10 min	> 10 min	55%
	Interior	> 10 min	> 10 min	> 10 min	> 10 min	> 10 min	65%
LMBU6	Bordes	4 min	> 10 min	> 10 min	> 10 min	> 10 min	40%
	Interior	> 10 min	> 10 min	> 10 min	> 10 min	> 10 min	45%
BAS1	Bordes	0 min	0 min	0 min	0 min	0 min	42.5%
	Interior	0,3 min	1 min	0,3 min	0,3 min	1,5 min	45%

(1) Se consideró como cepa hidrofóbicas cuando el tiempo fue mayor a cinco minutos (Villena et al. 2001).

(2) Porcentaje mínimo del alcohol en el cual una gota penetró en la superficie de la colonia del hongo.

Se pudo observar que hay diferencias en la hidrofobicidad presente entre las zonas del borde y el centro de colonia. En todas las cepas el centro, es decir la zona con más días de edad, resultó más hidrofóbica salvo en LMBTM1 cuyas zonas central y externa de la colonia no evidenciaron diferencias. Eso concuerda con la literatura que afirma que las hidrofobinas van decreciendo desde el punto de inoculación hacia el exterior (bordes de colonia). Las diferencias entre las zonas de crecimiento pueden deberse a que las zonas internas de una colonia poseen menos nutrientes ya que éstos son consumidos más rápidamente, por lo que ocurre un metabolismo secundario en el que las hidrofobinas aparecen (Smits et. al 2003). Otra explicación es que a pesar de que los hongos tienden a adquirir sus nutrientes mediante medios hidrofílicos, la ausencia de nutrientes produce la formación de estructuras hidrofóbicas para adquirirlos (Chau et al. 2010)

De todas las cepas, BAS1 resultó ser la menos hidrofóbica según ambas pruebas. Por otro lado, LMBTM2 no logró superar los cinco minutos en el caso del Tween 80 establecidos según la prueba de hidrofobicidad de detergentes y agua para considerársele hidrofóbica. Por lo tanto esta cepa se consideró de hidrofobicidad relativamente baja. Por su parte, las cepas LMBTM2 y LMBU6 pudieron superar los cinco minutos de no penetración de gota en el interior de sus colonias pero no en los bordes. Así mismo, en las cuatro cepas mencionadas, la prueba del porcentaje de alcohol reportó valores de 40% a 50% que son inferiores a lo de las cepas restantes coincidiendo los resultados evidenciados en el primer ensayo.

Las cepas LMBTM1, LMBTM4, LMBTM5 superaron un intervalo de tiempo de 10 minutos de persistencia de gota en todas las pruebas con detergentes y agua, por lo que se consideraron hidrofóbicas tanto en las zonas internas de la colonia como en las zonas externas. A partir de este experimento se pudo inferir que estas últimas tres cepas serían buenas formadoras de biopelículas ya que la adherencia de los propágulos dependen las interacciones hidrofóbicas con el soporte (Gutiérrez-Correa y Villena 2003; Shunmugaperumal 2010).

Finalmente, teniendo en cuenta que en el tamizado con colorantes destacaron las cepas LMBTM1 y LMBTM5 como decoloradores y considerando que los ensayos de hidrofobicidad calificaron a estas dos cepas como potenciales formadoras de biopelículas, ambas cepas fueron seleccionadas para los experimentos posteriores que tuvieron como objetivo la decoloración de tintes azoicos mediante biopelículas de basidiomicetos.

4.4 ESTANDARIZACIÓN DE PROTOCOLO DE FORMACIÓN DEBIOPELÍCULAS DE BASIDIOMICETOS

Según trabajos anteriores (Karapinar Kapdan y Kargi 2002; Pesciaroli et al. 2013) los sistemas de fermentación como biopelículas de basidiomicetos usan micelio trozado y homogenizado como inóculo. Por lo tanto esta etapa tuvo como objetivo encontrar un agente disgregador efectivo de biomasa y se propuso el empleo de perlas para tal propósito.

Se compararon los siguientes tratamientos: el primer tratamiento contenía diez perlas de 5 mm de diámetro, el segundo veinte perlas de 5mm de diámetro, el tercero tres perlas de 12 mm de diámetro y el cuarto seis perlas de 12 mm de diámetro.

Respecto al número y tamaño de perlas para formación de inóculo, el único tratamiento donde se encontró micelio disgregado y pequeño fue aquel donde se emplearon seis perlas de 12 mm. En los otros tratamientos se formaron grandes agregados de biomasa de distintos tamaños (Tabla 4). Posteriormente, el micelio se homogenizó mediante vórtex con perlas de 3mm. El micelio fragmentado y homogenizado de basidiomicetos puede utilizarse como inóculo para la formación de biopelículas.

Los propágulos fueron empleados siguiendo un protocolo de formación de biopelículas que fue adaptado a partir del protocolo propuesto por Villena y Gutiérrez-Correa (2003). Se obtuvieron exitosamente biopelículas de LMBTM1 y LMBTM5 en telas de poliéster y en mallas de metal por lo que el protocolo de formación propuesto fue adecuado.

Tabla 4. Tratamientos realizados para fragmentación de micelio mediante uso de esferas de vidrio







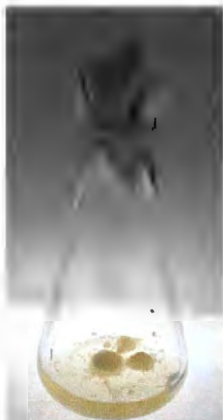



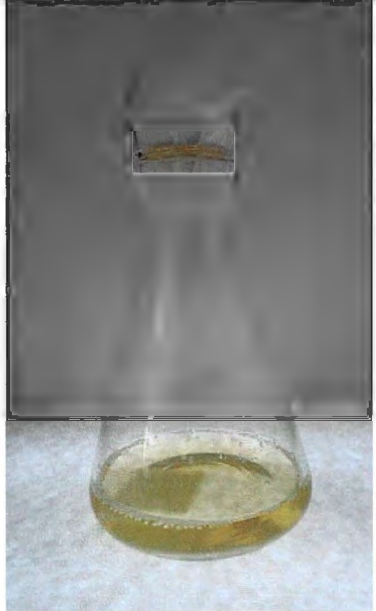

Cepa LMTBMI			
Tratamiento 1 3 perlas de 12 mm de diámetro	Tratamiento 2 6 perlas de 12 mm de diámetro	Tratamiento 3 10 perlas de 5 mm de diámetro	Tratamiento 4 20 perlas de 5 mm de diámetro
			
Cepa LMBTMS			
Tratamiento 1 3 perlas de 12 mm de diámetro	Tratamiento 2 6 perlas de 12 mm de diámetro	Tratamiento 3 10 perlas de 5 mm de diámetro	Tratamiento 4 20 perlas de 5 mm de diámetro
			

Tabla 5. Biopelículas de LMBTM1 y LMBTM5 a las 48 y 72 horas de crecimiento sobre tela de poliéster

LMBTM1, 48 horas de crecimiento	LMBTM1, 72 horas de crecimiento
 A petri dish containing a yellowish liquid medium. A small, rectangular, light-colored biofilm is visible on the surface of the medium. The background is a dark, slightly textured surface.	 A petri dish containing a yellowish liquid medium. A larger, more irregular, light-colored biofilm is visible on the surface of the medium. The background is a dark, slightly textured surface.
LMBTM5, 48 horas de crecimiento	LMBTM5, 72 horas de crecimiento
 A petri dish containing a yellowish liquid medium. A small, rectangular, light-colored biofilm is visible on the surface of the medium. The background is a dark, slightly textured surface.	 A petri dish containing a yellowish liquid medium. A larger, more irregular, light-colored biofilm is visible on the surface of the medium. The background is a dark, slightly textured surface.

4.5 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE BIOPELÍCULAS

Se realizó la cinética de crecimiento de biopelículas durante 72 horas. Para realizar las comparaciones respectivas entre biopelículas formadas en soportes de tela de poliéster o malla de metal se consideraron las 48 y 72 horas. Esto debido a que los posteriores experimentos propusieron el empleo de biopelículas con estas horas de crecimiento.

La cinética de crecimiento de biopelícula reveló que tanto la cepa LMBTM1 como en el caso de la cepa LMBTM5 no se presentan diferencias significativas en biomasa adherida al usar el soporte de metal respecto a las formadas en tela de poliéster a las 48 y 72 horas (anexo 12.1.1).

Además se analizó las diferencias de biomasa adherida en ambos soportes y se concluyó que no existieron diferencias significativas.

Se concluyó por lo tanto que para LMBTM1 o LMBTM5 el empleo de uno u otro soporte no presenta diferencias en términos de biomasa adherida y de porcentaje de adherencia. Por lo tanto la selección del soporte más conveniente se basó en la disponibilidad y costo del soporte. La tela de poliéster fue escogida por estas razones.

Dado que los inóculos empleados fueron similares en estos experimentos no presentaron diferencias tanto para LMBTM1 como para LMBTM5, lo que asegura que el experimento fue llevado adecuadamente sin fuentes de variación adicionales (anexo 4, tabla A2).

Figura 4. Cinética de crecimiento en medio líquido de biopelículas de LMBTM1 y LMBTM 5 desarrollados en los soportes de tela de poliéster y malla de metal

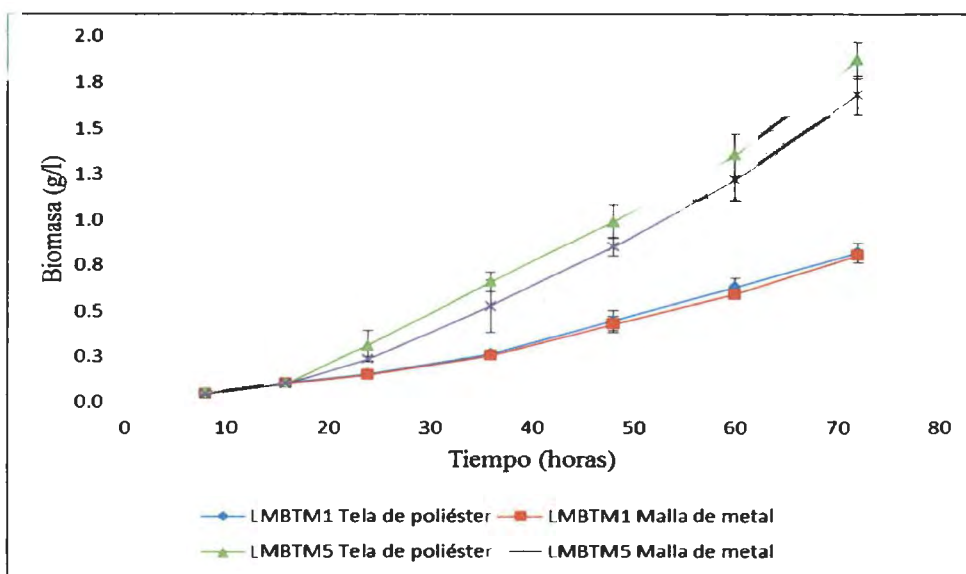


Tabla 6. Porcentaje de biomasa adherida durante la cinética de crecimiento de biopelícula de LMBTM1 y LMBTM5

Cepa	Soporte	Porcentaje de biomasa adherida a biopelícula (%)						
		8 horas	16 horas	24 horas	36 horas	48 horas	60 horas	72 horas
LMBTM1	Tela de Poliéster	92.67 ±3.78	88.35 ±1.12	89.92 ±2.47	89.89 ±0.23	88.47 ±1.88	91.21 ±1.06	89.93 ±2.26
	Malla de Metal	87.02 ±4.86	88.15 ±0.58	92.23 ±0.85	91.00 ±2.00	90.54 ±0.57	93.45 ±1.43	89.98 ±3.46
LMBTM5	Tela de Poliéster	97.61 ±1.38	89.51 ±6.79	89.51 ±4.80	96.16 ±1.10	96.58 ±1.27	96.15 ±1.39	97.72 ±0.81
	Malla de Metal	77.89 ±7.40	84.66 ±4.34	88.90 ±3.14	90.06 ±4.47	93.67 ±0.21	94.81 ±1.34	95.60 ±0.97

4.6 ESTANDARIZACIÓN DEL MEDIO DE LÍQUIDO PARA PRUEBAS DE DECOLORACIÓN

Se evaluaron 3 medios de decoloración LMBTM1 y LMBTM5 a las 24, 48, 72 y 96 horas de cultivo.

Respecto a LMBTM1, no se evidenciaron diferencias en la cinética de decoloración respecto a los medios 1, 2 y 3 (los resultados se muestran en anexo 5, figura A40). Esto significó que el empleo de uno u otro medio de decoloración conllevarían a resultados similares en términos de porcentaje de decoloración. En base a ellos se escogió el medio 1 para los posteriores experimentos debido a que al poseer menos nutrientes en su formulación resultaría muy ventajoso a nivel de costos. Además se ha reportado que los medios con menos nutrientes pueden inducir la capacidad de decoloración en basidiomicetos (D'Agostini et al. 2011).

De otro lado, en el caso de la cepa LMBTM5 a las 24 horas de decoloración se presentaron diferencias significativas entre los tres medios (anexo 12.2.5). Según los datos mostrados en la figura 5 se presentó mayor decoloración en el medio 1 el cual contenía menor cantidad de nutrientes. Ni a las 48 ni a las 72 horas hubo diferencias entre los tres medio de decoloración (anexos 12.2.6 y 12.2.7). Por último, a 96 horas no hubo diferencias entre los medios 1 y 2 pero sí en el medio 3, que a pesar de haber sido el que presentó menor decoloración en un inicio, terminó presentando la mayor eficiencia a estas horas (anexo 12.2.8).

La actividad decoloradora de la biopelícula de LMBTM5 fue superior en el medio 1 a las 24 horas, representando una ventaja favorable en un periodo de tiempo relativamente rápido, y no presentó diferencias significativas hasta las 72 horas con el medio 3 y hasta las 96 horas con el medio 2 a pesar de poseer menos nutrientes. Estos resultados son comparados con otros estudios por la literatura que reportan que a menor cantidad de nutrientes o en ausencia de fuentes de nitrógeno y glucosa hay una mayor actividad decoloradora (menor inhibición) y/o actividad enzimática ligninolítica relacionada a la

decoloración en *Trametes versicolor* (Staszczak 2006; Staszczak 2008; Wang et al. 2009), *Trametes villosa* (Yamanaka 2008), *Pleurotus saju*, *Lentinula edodes* y *Agaricus Blazei* en otros sistemas de fermentación (Buswell et al. 1995, Fu et al. 1997, D'Agostini et al. 2011).

A pesar de que el medio 3 presentó mayor porcentaje de decoloración a las 96 horas, ésta eficiencia se fue superior en un periodo tardío que podría ser poco beneficioso en un futuro sistema de mayor escala. Por otro lado, los costos de elaboración del medio 3 respecto al medio 1 son mucho mayores mientras que la diferencia entre la decoloración a 96 horas fue de solo 15.99%. Así mismo, se pudo observar que hubo formación excesiva de biomasa en el medio 3 (tabla 7; anexo 5, figura A38) lo que representaría problemas operacionales.

Por lo tanto, considerando una actividad decoloradora diferencial y temprana a las 24 horas se escogió el medio 1 para establecer cinéticas de decoloración de biopelículas de LMBTM5.

Cabe resaltar que las diferencias entre los porcentajes de decoloración de LMBTM1 en cualquiera de los tres medios fueron siempre menores en cualquier tiempo respecto a los porcentajes de decoloración de LMBTM5. lo que sugirió evidentes ventajas en la decoloración de las biopelículas de ésta última (figura 5).

Figura 5. Cinética de decoloración de biopelículas de LMBTM1 y LMBTM5 en Medio 1, Medio 2 y Medio 3 conteniendo Azul Brillante y Synozol Turquesa

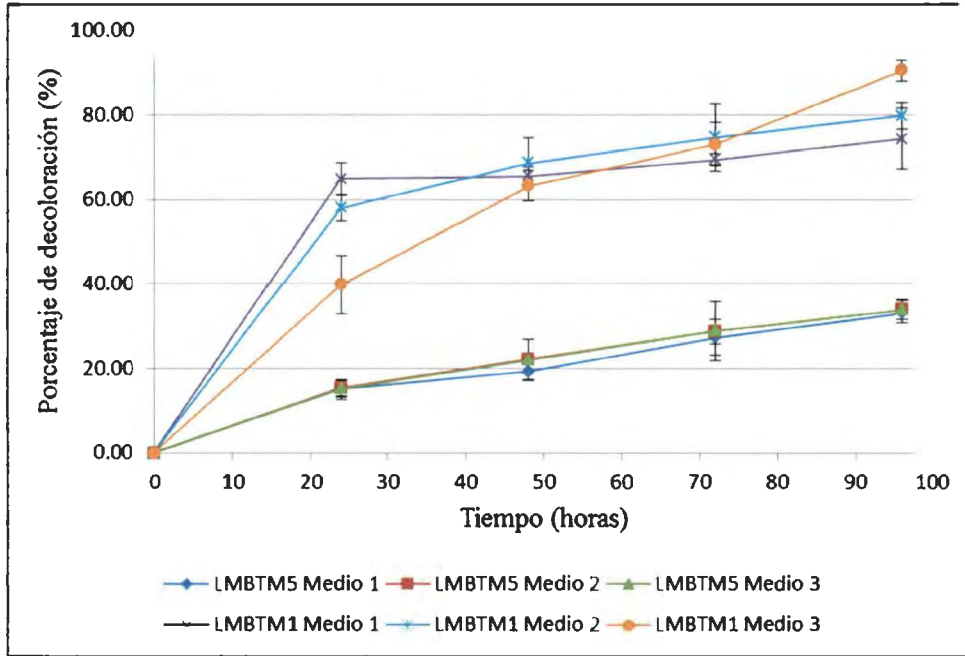


Tabla 7. Biomasa inicial y final del proceso de decoloración de LMBTM1 y LMBTM5 en los Medios 1, 2 y 3

Medio	Biopelícula (g/)			
	LMBTM1		LMBTM5	
	Inicial	Final	Inicial	Final
Medio 0,1g		0.550 ± 0.025		1.140 ± 0.192
Medio 2,5 g	0.804 ± 0.045	1.626 ± 0.065	1.801 ± 0.030	2.598 ± 0.218
Medio 5 g		2.320 ± 0.122		3.671 ± 0.279

4.7 CINÉTICA DE DECOLORACIÓN DE TINTES AZOICOS

Se evaluó la decoloración con biopelículas de LMBTM1 y LMBTM5. Se trabajó con biopelículas de 48 y 72 horas; ya que existieron diferencias significativas de biomasa entre estos tiempos (anexo 12.5.1)

Los máximos picos de absorción dentro de la región visible de cada colorante fueron para 592 nm para Azul Brillante, 402 nm para Levafix Amarillo, 512 nm para Levafix Rojo, 600 nm para Remazol Negro, 540 para Remazol Rojo, 538 nm para Rojo Profundo, 428 para Synozol Amarillo y 660 nm para Synozol Turquesa (anexo 8, figura A47).

Los controles de la cinética de decoloración evidenciaron estabilidad a lo largo del proceso salvo en el caso de Remazol Negro. Este tinte mantuvo su coloración en los controles del tamizado en sólido, sin embargo presentó una decoloración líquida espontánea en el medio de decoloración en ausencia de biopelículas (anexo 6, figura A42) por lo que este caso en particular contradice las características de los tintes azoicos (Robinson et al. 2001; Keharia y Madamwar 2003). Por lo tanto no fue considerado en los posteriores experimentos de cinética de decoloración.

Cabe resaltar que el inóculo empleado en todas las biopelículas estuvieron dentro del rango de 0.0227 g a 0.0303 g. Así mismo, la biomasa inicial de biopelícula de la cinética de decoloración de LMBTM1 a 48 horas fue de 0.426 ± 0.026 y a 72 horas de 0.798 ± 0.030 , mientras que la biomasa de biopelícula de LMBTM5 a 48 horas fue de 1.038 ± 0.057 y a 72 horas de 1.821 ± 0.074 .

Para el caso del medio con colorante Levafix Rojo no se obtuvo el mismo resultado del tamizado inicial en sólido (anexo 3). En el medio líquido de decoloración se presentó un incremento de la absorbancia en la longitud de onda máxima absorción (anexo 9, figura A53) que sugiere un cambio producido por las biopelículas de ambas cepas (anexo 6). Este es un evento poco común pero ha sido reportado en un basidiomiceto de pudrición blanca ligninolítico (Jayasinghe I et al. 2008). Estudios más específicos con técnicas analíticas que permitan dilucidar estructuras químicas.

Los análisis de decoloración se realizaron independientemente por cada tinte y a nivel global. De modo general los tintes Azul Brillante y Synozol Turquesa fueron lo más decolorados (12.3.7) a lo largo de la cinética de decoloración.

En Azul Brillante se alcanzaron altos porcentajes de decoloración de LMBTM5 desde las 24 horas, tanto con biopelículas de 48 como de 72 horas de crecimiento sin diferencias significativas mayores a 5.83%. Así mismo, no hubo diferencias significativas en el último punto de 96 horas de decoloración entre estas biopelículas por lo que se puede afirmar de modo general que en este tinte las diferentes horas de crecimiento de LMBTM5 no tuvieron efectos significativos. Por otro lado, la cepa LMBTM1 presentó significativamente menor decoloración a todas las horas de cinética respecto a LMBTM5, y las biopelículas de 72 horas presentaron mayor decoloración que las biopelículas de 48 horas, por lo que emplear biopelículas de 72 horas resultaron eficientes (figura 6; anexo 12.3.1).

Respecto a Synozol Turquesa, las diferencias entre LMBTM1 y LMBTM5 fueron significativas y el empleo de biopelículas de 48 y 72 horas de crecimiento fue conveniente en ambas cepas a lo largo de toda la cinética de decoloración (figura 11; anexo 12.3.6).

Los espectros de absorción de Azul Brillante y Synozol Turquesa evidenciaron los cambios más notorios. En Azul Brillante se pudo observar la disminución drástica del pico de longitud de onda de máxima absorción por la cepa LMBTM1 y la desaparición de este pico por la cepa LMBTM5 (figura A51). En Synozol Turquesa el cambio se evidenció por la disminución de la absorbancia y desplazamiento del pico de máxima absorción inicial de 660nm a 624 nm (figura A57). Este comportamiento en la forma del espectro y la disminución de absorbancia en la región del visible sugieren que hubo cambios químicos en ambos tintes por la actividad decoloradora, lo que involucran además rompimiento de estructuras cromóforas de éstos (Chen et al. 2003, Zhang et al. 2011, Mitrovic et al. 2012).

El tercer tinte más decolorado fue Rojo Profundo. Respecto a LMBTM1, hubo diferencias significativas en la decoloración de biopelículas de distintas horas de crecimiento a 48 y 96 horas de la cinética de decoloración. Respecto a LMBTM5, las biopelículas de 72 horas

fueron superiores en porcentaje de decoloración que las de 48 horas durante toda la cinética (Figura 9, Anexo 12.3.4) por lo que se consideró que usar biopelículas de 72 horas fue beneficioso en el caso de Rojo Profundo. Así mismo, aunque las biopelículas de 72 horas de LMBTM1 no presentaron diferencias significativas con biopelículas de LMBTM5 de 48 horas a las 24 y 48 horas de decoloración, sólo confirmó que el empleo de LMBTM5 es más ventajoso.

Para los tintes Levafix Amarillo, Remazol Rojo y Synozol Amarillo las biopelículas de 72 horas de LMBTM5 fueron superiores a cualquier otra biopelícula (figura 7, 8 y 10). En el caso de Levafix Amarillo esto se evidencia a partir de las 72 horas, mientras que en los otros dos tintes se puede observar a lo largo de toda la cinética de decoloración (anexos 12.3.2; 12.3.3; 12.3.5)

Del análisis global se desprende que la decoloración es dependiente del tipo de cepa, tiempo de crecimiento y tipo de tinte (anexo 12.3.7). Esta prueba concluyó que efectivamente la cepa LMBTM5 fue superior a LMBTM1, como se pudo observar individualmente en las cinéticas de decoloración de cada tinte según lo anteriormente expuesto aunque en el tamizado sólido las diferencias en la eficiencia de decoloración de ambas cepas no fuesen tan evidentes. Así mismo, emplear una biopelícula de 72 horas de crecimiento fue mejor que una de 48 horas de modo general, aunque la única excepción ocurrió en la decoloración de Azul Brillante por biopelículas de LMBTM5. Por último, las diferencias presentadas por tintes establecieron que hay tintes más susceptibles de ser decolorados que otros. Todo esto coincide con la bibliografía que indica que son estos factores mencionados, así como otros más, los que afectan directamente a la decoloración de tintes (Khan et al. 2012; Saratale et al. 2011)

Figura 6. Cinética de decoloración de medio con Azul Brillante por biopelículas de LMBTM1 y LMBTM5 con 48 y 72 horas de horas de crecimiento

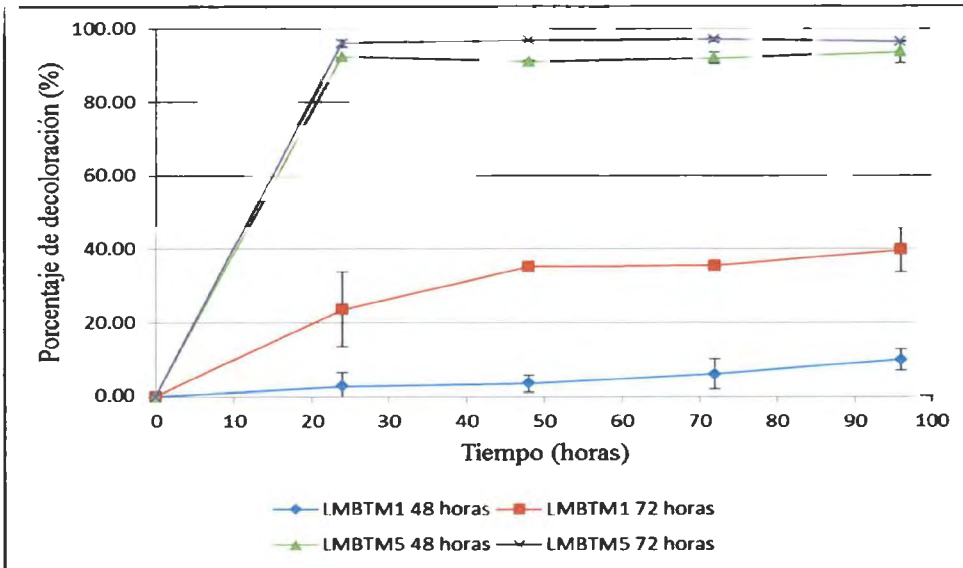


Figura 7. Cinética de decoloración de medio con Levafix Amarillo por biopelículas de LMBTM1 y LMBTM5 con 48 y 72 horas de horas de crecimiento

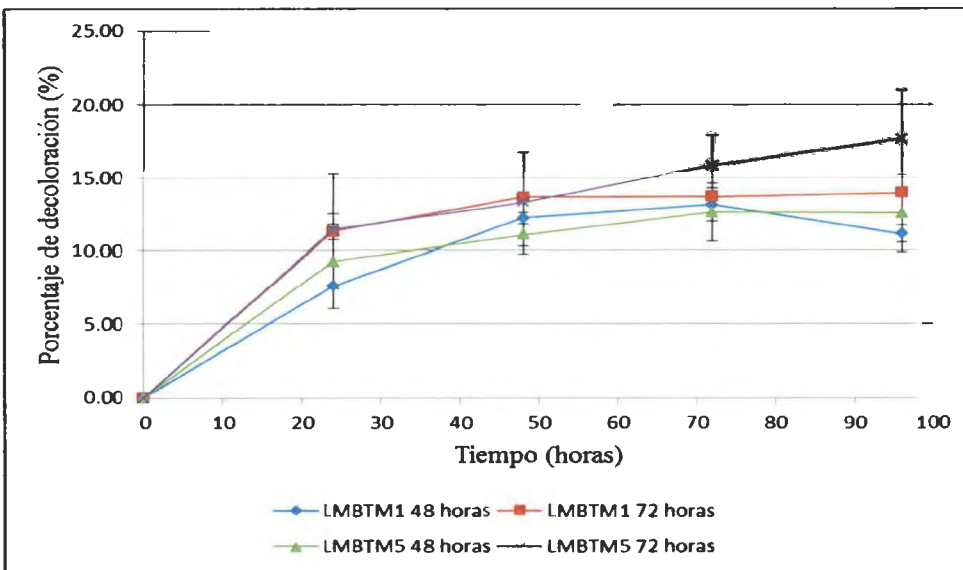


Figura 8. Cinética de decoloración de medio con Remazol Rojo por biopelículas de LMBTM1 y LMBTM5 con 48 y 72 horas de horas de crecimiento

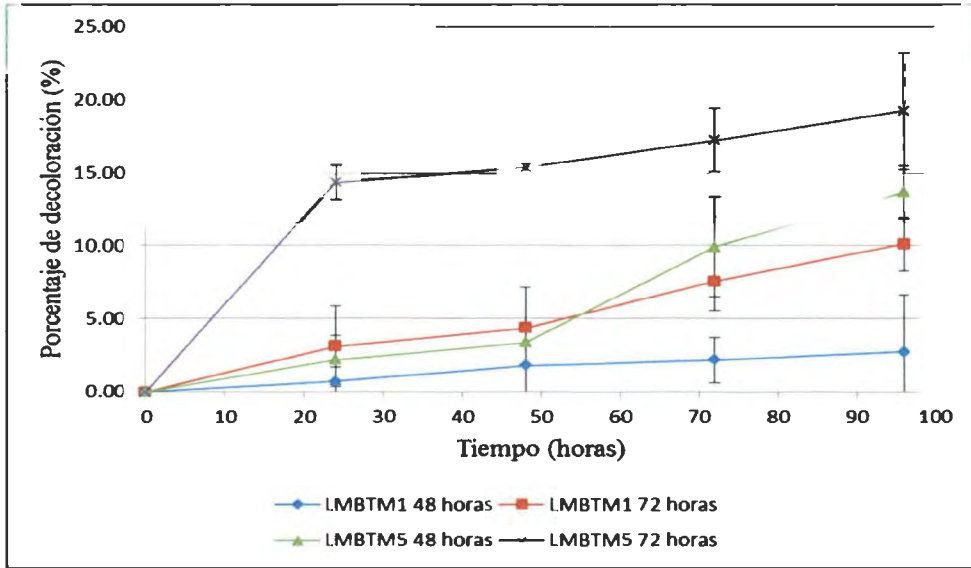


Figura 9. Cinética de decoloración de medio con Rojo Profundo por biopelículas de LMBTM1 y LMBTM5 con 48 y 72 horas de horas de crecimiento

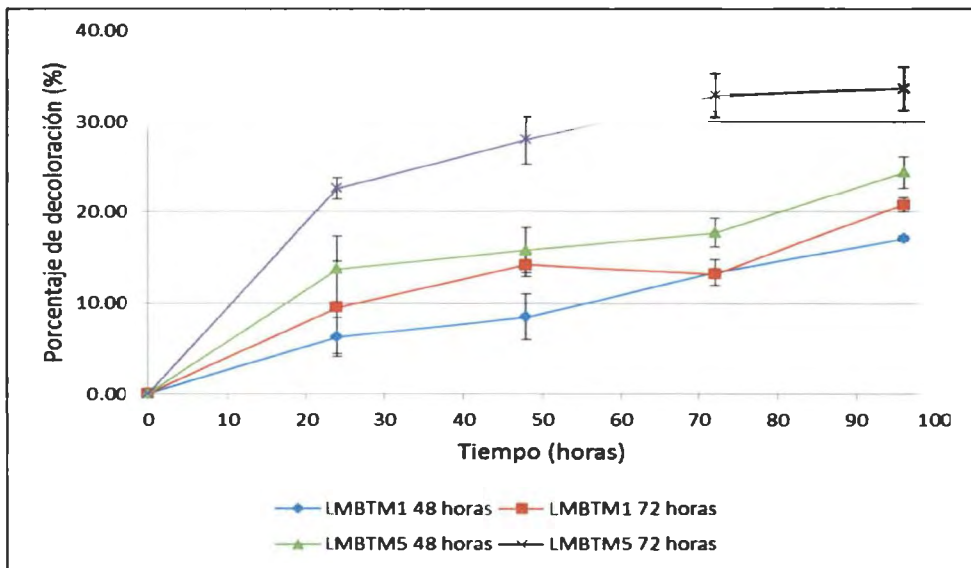


Figura 10. Cinética de decoloración de medio con Synzozol Amarillo por biopelículas de LMBTM1 y LMBTM5 con 48 y 72 horas de horas de crecimiento

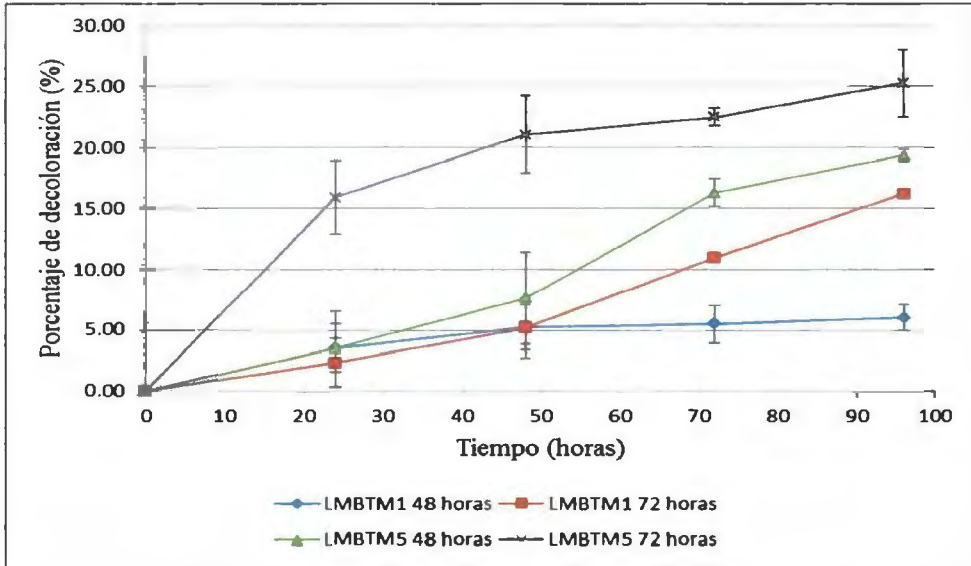
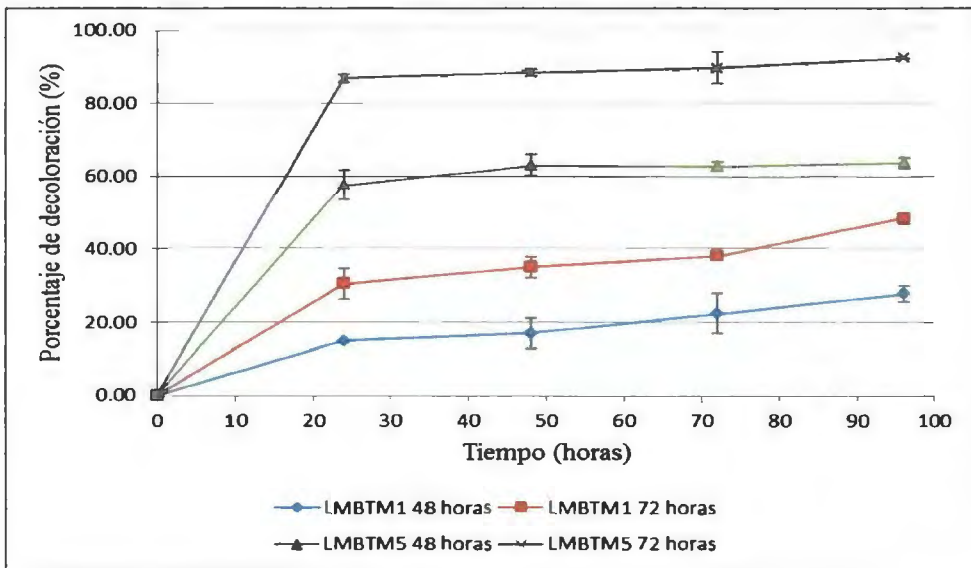


Figura 11. Cinética de decoloración de medio con Synzozol Turquesa por biopelículas de LMBTM1 y LMBTM5 con 48 y 72 horas de horas de crecimiento



Las biomásas finales de las cinéticas de decoloración fueron significativamente menores a las biomásas iniciales (tabla 8, anexo 12.5.2). Esto sugiere aunque las condiciones limitantes del medio I son necesarias para una mayor actividad decoloradora como se explicó anteriormente, esto obliga a las cepas al consumo de su propia biomasa.

Tabla 8. Biomasa de biopelículas al final del proceso de decoloración de tintes azoicos

Tinte azoico	Biopelícula (g/l)			
	LMBTM1 de 48 horas	LMBTM1 de 72 horas	LMBTM5 de 48 horas	LMBTM5 de 72 horas
Azul Brillante	0.194 ± 0.037	0.560 ± 0.062	0.475 ± 0.013	1.245 ± 0.177
Levafix Amarillo	0.227 ± 0.018	0.569 ± 0.095	0.430 ± 0.068	0.859 ± 0.047
Levafix Rojo	0.288 ± 0.023	0.640 ± 0.006	0.438 ± 0.043	0.910 ± 0.105
Remazol Rojo	0.240 ± 0.023	0.587 ± 0.137	0.474 ± 0.025	0.935 ± 0.095
Rojo Profundo	0.291 ± 0.007	0.603 ± 0.106	0.607 ± 0.018	1.159 ± 0.061
Synozol Amarillo	0.230 ± 0.071	0.542 ± 0.031	0.446 ± 0.031	0.763 ± 0.030
Synozol Turquesa	0.240 ± 0.011	0.53 ± 0.076	0.619 ± 0.066	1.095 ± 0.030

Por último, habiendo concluido que es mejor emplear biopelículas de 72 horas, se procedió a evaluar la decoloración de biopelículas de ambas cepas con esta edad en efluentes simulados que contuvieron una mezcla de los seis tintes y la concentración de nutrientes del medio con los que se estableció las cinéticas de decoloración de tintes azoicos.

4.8 EFLUENTES SIMULADOS Y REALES

El propósito de este experimento fue evaluar la capacidad decoloradora de LMBTM1 y LMBTM5 en una simulación de efluentes así como en uno real ya que esto podría representar un primer paso para trabajos futuros en condiciones reales. Se emplearon efluentes simulados a tres distintos pHs pues el rango pH de los efluentes reales es amplio (O'Neill et al. 1999).

4.8.1 Pruebas de decoloración en efluentes Simulados

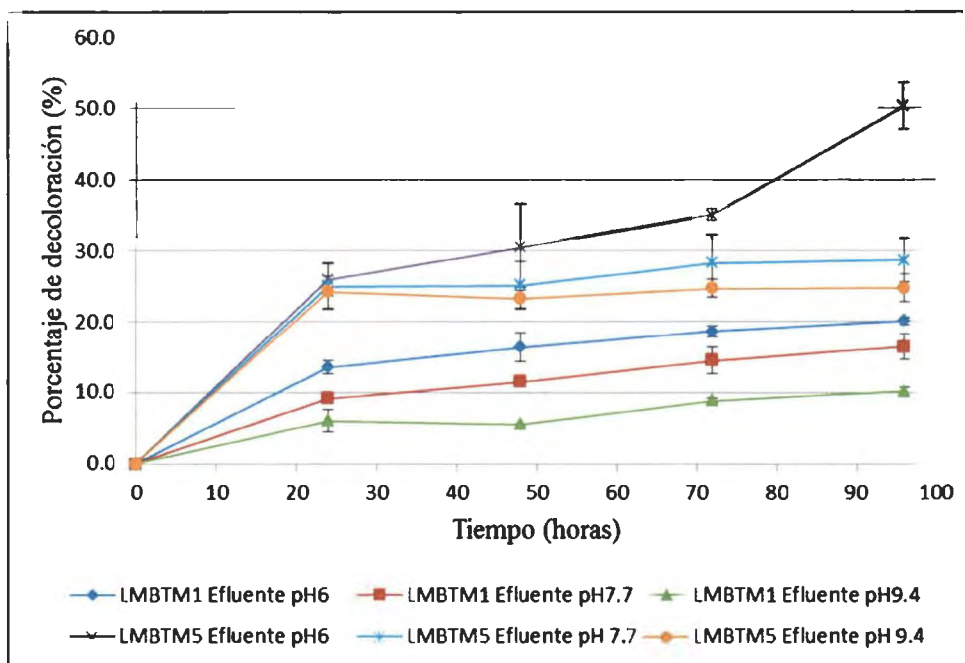
De aquí se concluyó que la cepa LMBTM5 fue superior a LMBTM1 al decolorar en mayor porcentaje los efluentes de los tres distintos pHs a lo largo de toda la cinética de decoloración (Figura 12; anexo 12.4.1.3).

La cepa LMBTM1, la decoloración de la cepa fue sensible a los distintos pHs durante todo el proceso de decoloración, alcanzando los mayores porcentajes en el efluente de pH6. Respecto a la cepa LMBTM5, las diferencias en la decoloración se evidenciaron claramente a partir las 48 horas de la cinética y los porcentajes fueron mayores en efluentes de pH6 al igual que en LMBTM1.

Las razones por las que la mayor decoloración se dio en los efluente de pH 6 podría deberse a que el sistema ligninolítico de los hongos de pudrición blanca como *Trametes versicolor*, involucrados en la decoloración, tienden a ser tener pHs óptimos por debajo de pH 7 (Kurniawati y Nicell 2008; Madhavi y Lele S 2009).

Por último, al igual que en la cinética de decoloración de tintes azoicos, se presentó una disminución significativa de la biomasa inicial (anexo 12.5.3).

Figura 12. Cinética de decoloración de efluentes simulados por biopelículas de LMBTM1 y LMBTM5



4.8.2 Pruebas de decoloración en efluente Real

El efluente real

Se utilizaron efluentes colectados del río Huaycoloro proveniente de la empresa textil de San Juan de Lurigancho. Los mayores porcentajes de decoloración fueron nuevamente evidenciados en la cepa LMBTM5 (figura 13, anexo 12.4.2) respecto a la cepa LMBTM1 durante todo el proceso de decoloración. Asimismo, no hubo consumo de biomasa durante el proceso (anexo 12.5.3). Esto podría sugerir que el efluente tuvo componentes capaces de ser asimilados por la biopelícula pero no esto no se pudo corroborar debido que al provenir de muchos procesos textiles éstos terminan siendo demasiado complejos (O'Neill et al. 1999) y se requiere análisis más profundos no contemplados en el presente trabajo.

Los espectros de absorción (anexo 10) tuvieron cambios notorios posteriores a la decoloración lo que sugiere cambios químicos en el tinte presente en el efluente (Mitrovic et al. 2012).

Figura 13. Cinética de decoloración de efluente real por biopelículas de LMBTM1 y LMBTM5

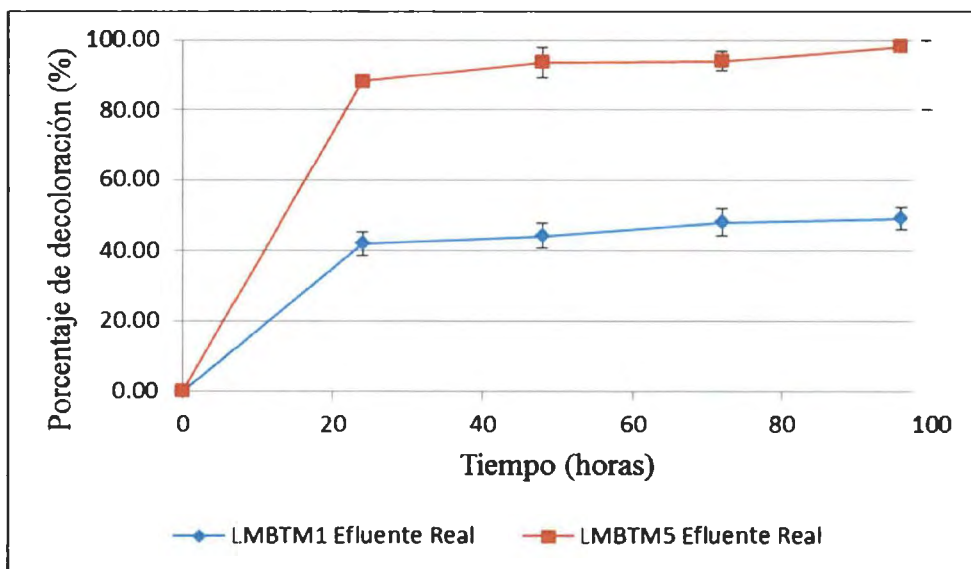


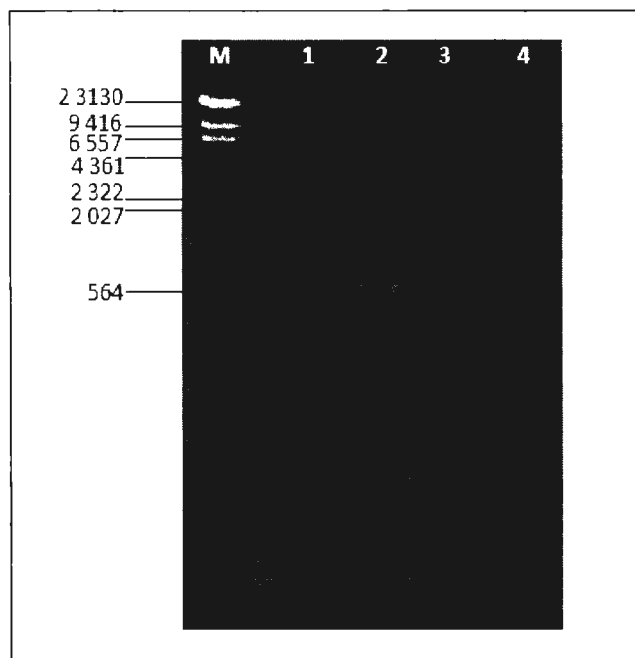
Tabla 9. Biomasa de biopelículas al final del proceso de decoloración de tintes azoicos

Efluente	Biomasa (g/l)			
	LMBTM1		LMBTM5	
	Inicial	Final	Inicial	Final
Efluente Simulado pH6	0.790 ± 0.018	0.346 ± 0.059	1.843 ± 0.083	0.869 ± 0.044
Efluente Simulado pH7.7	0.811 ± 0.047	0.331 ± 0.033	1.840 ± 0.095	0.839 ± 0.047
Efluente Simulado pH9.4	0.801 ± 0.035	0.314 ± 0.065	1.799 ± 0.058	0.794 ± 0.105
Efluente Real	0.812 ± 0.032	0.680 ± 0.059	1.794 ± 0.059	1.680 ± 0.079

4.9 ANÁLISIS MOLECULAR PARA IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS SELECCIONADAS

Mediante la electroforesis de los productos de PCR se pudo ver una sola banda por reacción (figura 14) por lo que se evidenció que no existieron productos inespecíficos. Los productos fueron secuenciados con los *primers* ITS1 e ITS4 y el consenso de las secuencias alineadas fueron de ambos *primers* fue empleado para evaluar la similitud con otras especies de las bases de datos de NCBI.

Figura 14. Amplificación de productos de PCR



M: marcador molecular Lambda DNA/HindIII. 1: Control negativo de reacción PCR. 2: Control positivo de reacción de PCR. 3: Productos de PCR de LMBTM1. 4: Productos de PCR de LMBTM5.

La búsqueda de BLAST reveló que la cepa LMBTM1 presenta alta similitud con *Ceriporia lacerata* y que LMBTM5 con *Trametes polyzona*. En el caso de LMBTM1, fue aislado a partir de una colonia que rodaba la superficie de un tronco y de cuerpos fructíferos de otro basidiomiceto (anexo 1, figura A1) y que coincide con caracteres

diagnósticos de otras especies de *Ceriporia* reportado por Jia y Cui (2011). Respecto a LMBTM5, fue aislado a partir del cuerpo fructífero (anexo 1, figura A5) y cuyos caracteres diagnósticos coinciden altamente con la especie *Trametes polyzona* y presenta sinónimos como *Corioloopsis polyzona* (Corner, 1989). Por lo tanto, los análisis moleculares coinciden con las figuras presentadas en los anexos.

Tabla 10. Alineamiento de secuencias ITS mediante análisis BLAST

Cepa	Especie	Cobertura	Similaridad	Accesión
LMBTM1	<i>Ceriporia lacerata</i>	99%	98%	GU045770.1
	<i>Ceriporia lacerata</i>	99%	98%	KJ152169.1
	<i>Ceriporia lacerata</i>	99%	98%	KF850375.1
	<i>Ceriporia lacerata</i>	99%	98%	KF782841.1
	<i>Ceriporia lacerata</i>	99%	98%	KF703929.1
LMBTM5	<i>Trametes polyzona</i>	100%	99%	JN164979.1
	<i>Trametes polyzona</i>	100%	98%	JN645078.1
	<i>Trametes polyzona</i>	100%	98%	JN645068.1
	<i>Trametes polyzona</i>	100%	98%	JN164980.1
	<i>Trametes polyzona</i>	100%	98%	JN164978.1

De acuerdo a estos resultados la cepa LMBTM1 corresponde a *Ceriporia lacerata* y la LMBTM5 a *Trametes polyzona*. Estas especies son basidiomicetos de pudrición blanca con capacidad ligninolítica ya han sido reportadas como productoras de peroxidases y lacasas (Lee et al. 2007; Chairin 2013).

V. CONCLUSIONES

1. De un total de 75 cuerpos fructíferos de basidiomicetos se logró aislar sólo diez. Todos estos fueron positivos para la reacción de guaiacol. De los cinco basidiomicetos del cepario del LMB sólo BAS1 tuvo actividad guaiacol positiva.
2. Del total de cepas guaiacol positivas sólo LMBTM1, LMBTM2, LMBTM3, LMBTM4, LMBMT5, LMBU6 y BAS1 resultaron decoloradores de tintes azoicos. Las mejores dos cepas decoloradoras fueron LMBTM1 y LMBTM5 que además resultaron ser hidrofóbicas y por lo tanto se eligieron para llevar a cabo los experimentos de decoloración con biopelículas en medio líquido.
3. El protocolo de formación de biopelícula con inóculo micelar disgregado y homogenizado permite el desarrollo de biopelículas de basidiomicetos tanto en tela de poliéster como en malla de metal.
4. Las biopelículas de LMBTM1 y LMBTM5 formadas en tela de poliéster y malla de metal no presentaron diferencias significativas en términos de biomasa adherida y porcentaje de adherencia.
5. El medio de decoloración más conveniente para llevar a cabo la cinética de decoloración de biopelículas de ambas cepas fue aquel que poseía menos cantidad de nutrientes.
6. Existen diferencias significativas en la decoloración al emplear una biopelícula de 48 horas frente a una de 72 horas, siendo esta última superior a la primera.
7. Existen diferencias significativas en la decoloración de un tinte respecto a otro, siendo Azul Brillante y Synozol Turquesa los más decolorados y los que presentan cambios más notorios en su espectro de absorción.
8. Se evidenció una mayor decoloración en los efluentes simulados de pH6 en ambas cepas.

9. Existe una pérdida significativa de biomasa al finalizar el proceso de decoloración de tintes azoicos y de efluentes simulados en todas las biopelículas de ambas cepas. Por lo contrario, en los efluentes reales la biomasa se mantiene.
10. La cepa LMBTM5 fue superior en la decoloración de tintes azoicos, efluentes simulados y efluentes reales respecto a la cepa LMBTM1.
11. Los análisis moleculares revelaron que las cepa LMBTM1y LMBTM5 son los hongos de pudrición blanca *Ceriporia lacerata* LMBTM5 y *Trametes lyozona*.

VI. RECOMENDACIONES

1. Determinar la actividad enzimática de las enzimas ligninolíticas presentes en las cepas LMBTM1 y LMBTM5.
2. Buscar inductores que optimicen el medio de decoloración.
3. Analizar y determinar los compuestos formados como producto de la decoloración y evaluar su toxicidad.
4. Evaluar los casos particulares de decoloración espontánea de Remazol Negro y los cambios ocurridos en Levafix Rojo en presencia de biopelículas de basidiomicetos mediante análisis más profundos.
5. Si se deseara usar el soporte alternativo de malla de metal por su capacidad de reúso se deberá buscar una forma eficiente de limpiar la biomasa adherida al mismo.
6. Si se desea usar un sistema continuo de fermentación se deberá buscar un equilibrio entre actividad decoloradora y pérdida de biomasa para que sea sostenible en el tiempo.
7. Para procesos de mayor escala de tratamiento de efluentes se deberá determinar si es conveniente o no variar el pH de los mismos para aumentar la eficiencia de decoloración.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adam, O; Samson, R. 2011. Fundamentals of mold growth in indoor environments and strategies for healthy living. Capítulo 5. Ecology and general characteristics of indoor fungi. Wageningen Academic Publishers.
2. Adonsinda, M; Martins, M; Lima, N; Silvestre, A; Queiroz, M. 2003. Comparative studies of fungal degradation of single or mixed bioaccessible reactive azo dyes. *Chemosphere*. 52: 967-973.
3. Alaimo, L; Hartman, T; Rosen, R; McGeorge, L; Meyer, R; Oxenford, J; Clark, L; Ho, C; Rosen, J. 1990. Nonpriority analysis of the wastewater streams of four dye manufacturing facilities. *Journal Water Pollution Control Federation*. 62:665-669
4. Ali, L; Algaithi, R; Habib, HM; Souka, U; Rauf, M; Ashraf, S. 2013. Soybean peroxidase-mediated degradation of an azo dye- a detailed mechanistic study. *BMC biochemistry*. pp 14: 35.
5. Ali, N; Hameed, A; Ahmed, S. 2010. Role of Brown-rot fungi in the bioremoval of azo dyes using different conditions. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41: 907-915.
6. Aneja, K. 2003. Experiments in Microbiology, Plant Pathology and Biotechnology. Sección 23. Mushroom Production Technology. Cuarta edición. Editorial New Age International.
7. Bagewadi, Z; Vernekar, A; Patil, A; Abhijit, A; Jain, VM. 2011. Biodegradation of industrially important textile dyes by actinomycetes isolated from activated sludge. 1(3): 351-360.
8. Barrasa, J; Martínez, A; Martínez, M. 2009. Isolation and selection of novel basidiomycetes for decolorization of recalcitrant dyes. *Folia Microbiologica*. 54(1): 59-66.
9. Bellemain, E; Carlsen, T; Brochmann, C; Coissac, E; Taberlet, P; Kausrud, H. 2010. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology*. 10:189.

10. Bisschops, I; Spanjers, H. 2003. Literature review on textile wastewater characterization. *Environmental Technology*. 24: 1399-1411.
11. Booth, C. 1971. *Methods in Microbiology*. Capítulo 8. Basidiomycetae: Homobasidiomicetae. Volumen 4. Editorial Academic Press.
12. Borghi, E; Sciota, R; Biassoni, C; Cirasola, D; Cappelletti, L; Vizzini, L; Boracchi, P; Morace, G. 2011. Cell surface hydrophobicity: a predictor of biofilm production in *Candida* isolates? *Journal of Medical Microbiology*. 60 (5): 689-690.
13. Buswell, JA; Cai, Y; Chang, S. 1995. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and lactase production by *Lentinula (Lentinus)* edodes. 128: 81-87.
14. Caritá, R; Marin-Morales, M. 2008. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. *Chemosphere*. 72(5): 722-5.
15. Chacko, J; Subramaniam, K. 2011. Enzymatic Degradation of Azo Dyes - A Review. *International Journal of Environmental Sciences*. 1(6): 1250-1260.
16. Chairin, T; Nitheranont, T; Watanabe, A; Asada, Y; Khanongnuch, C; Lumyong, S. 2013. Biodegradation of bisphenol A and decolorization of synthetic dyes by laccase from white-rot fungus. *Trametes polyzona*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 169(2): 539-45.
17. Chau, H; Goh, YK; Si, B; Vujanovic, V. 2010. Assessment of alcohol percentage test for fungal surface hydrophobicity measurement. *Letters in Applied Microbiology*. 50(3): 295-300.
18. Chen, K-C; Wu, J-Y; Huang, C-C; Liang, Y-M; Hwang, S-CJ. 2003. Decolorization of azo dye using PVA-immobilized microorganisms. *Journal of Biotechnology* 101(3): 241-252.
19. Christie, R. 2001. *Colour Chemistry*. Capítulo 2: The physical and chemical basis of colour. Capítulo 3: Azo dyes and pigments. Volumen 27. The Royal Society of Chemistry.
20. Corner, E. 1989. *Ad Polyporaceas VI. The genus Trametes*. Editorial J. Cramer.
21. Crini, G. 2006. Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: a review. *Bioresource technology*. 97(9): 1061-85.

22. Croan, S. C. 2001. Preservation of hyphal-forming brown- and white-rot wood-inhabiting basidiomycetes. IRG/WP : 01/10397
23. Crueger, W. y Crueger A. 1990. Biotechnology: a text book of industrial microbiology. Capítulo 2. *Screening* for new metabolites. Editorial Medison Science Technology.
24. D'Agostini, E; D'Agostini, T; Silveira, J; Paccola-Meirelles, L; Barros, N; Andrea, G. 2011. Low carbon/nitrogen ratio increases laccase production from basidiomycetes in solid substrate cultivation. *Agricultural Microbiology*. 68 (3).
25. Dietrich, D; Lamar, R. 1990. Selective Medium for Isolating *Phanerochaete chrysosporium* from Soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 56(10).
26. Donlan, R M; Costerton, JW. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 15, 167-193.
27. Erkurt, E a.; Ünyayar, A; Kumbur, H. 2007. Decolorization of synthetic dyes by white rot fungi. involving laccase enzyme in the process. *Process Biochemistry* 42(10): 1429-1435.
28. Espejo, E; Agosin, E; Vicuña, R. 1990. Catabolism of 1,2-diarylethane lignin model compounds by two brown-rot fungi. *Archives of Microbiology*. 154 (4):370-374.
29. Eugenio, M; Carbajo, J; Martín, J; González, A; Villar, J. 2009. Laccase production by *Pycnoporus sanguineus* under different culture conditions. *Journal of Basic Microbiology* 49(5): 433-40.
30. Ezeronye, OU; Okerentugba, PO. 1999. Performance and efficiency of a yeast biofilter for the treatment of a Nigerian fertilizer plant effluent. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 15: 515-516.
31. Fries, N. 1987. Ecological and evolutionary aspects of spore germination in the higher basidiomycetes. *Transactions British Mycological Society*. pp. 88:1-7.
32. Fu, S; Yu, H; Buswell, JA. 1997. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Pleurotus sajor-caju*. 147: 133-137.
33. Fu, Y; Viraraghavan, T. 2001. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. *Bioresource technology*. 79(3): 251-62.

34. Gherbawy, Y; Voigt, K. 2008. Capítulo 12: Advances and Identification of Wood Rooting Fungi in Timber and Standing Trees. Editorial Springer.
35. Ghoreishi, M; Haghighi R. 2003. Chemical catalytic reaction and biological oxidation for treatment of non-biodegradable textile effluent. *Chemical Engineering Journal*. 95: 163-169.
36. Giles, CH; Duff, DG; Sinclair, RS. 1989. Gile's Laboratory course in dyeing. Capítulo 2: Practical considerations. Cuarta edición. Society of Dyers and Colourists.
37. Gomaa, O; Momtaz, O; El Kareem H. Fathey R. 2009. Enhancement of laccase production by brown rot fungi and its role in decolorization. *New Biotechnology* 25:0.
38. Gutiérrez-Correa, M; Ludeña, Y; Ramage, G y Villena, G. 2012. Recent Advances on Filamentous Fungal Biofilms for Industrial Uses. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 167(5): 1235-53.
39. Gutiérrez-Correa, M; Villena GK. 2003. Fermentación por adhesión a superficies: una nueva categoría fermentativa. *Revista Peruana de Biología*. 10(2):13-124.
40. Hailei, W; Guangli, Y; Ping, L; Yanchang, G; Jun, L; Guosheng, L; Jianming, Y. 2009. Overproduction of *Trametes versicolor* laccase by making glucose starvation using yeast. *Enzyme and Microbial Technology*. 45(2): 146-149.
41. Hofrichter, M; Scheibner, K.; Bublitz, F.; Schneegass, I.; Ziegenhagen, D.; Martens, R. and Fritsche, W. 1999. Depolymerization of straw lignin by manganese peroxidase from *Nematoloma frowardii* is accompanied by release of carbon dioxide. 53(2): 161-166
42. Homolka, L. (2013). *Laboratory Protocols in Fungal Biology*, 9-17. doi:10.1007/978-1-4614-2356-0
43. Hood, I. 2006. The mycology of the Basidiomycetes. *ACIAR Proceedings*. pp. 124: 7-9.
44. Huffman, D; Tiffany, L; Knaphaus, G; Healy, R. 2008. *Mushrooms and Other Fungi of the Midcontinental United States*. University of Iowa.

45. Hwang, S; Lee, C; Ahn, I. 2008. Product identification of guaiacol oxidation catalyzed by manganese peroxidase. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 14: 487-492.
46. İşik, M; Sponza, D. 2003. Effect of oxygen on decolorization of azo dyes by *Escherichia coli* and *Pseudomonas sp.* and fate of aromatic amines. *Process Biochemistry*. 38(8): 1183-1192.
47. Jabra-Rizk, M; Falkler, W; Meiller, T. 2004. Fungal Biofilms and Drug Resistance. *Emerging Infectious Diseases*. 10(1).
48. Jayasinghe, C; Imtiaj, A; Lee, GW; Im, KH; Hur, H; Lee, MW; Yang, H-S; Lee, T-S. 2008. Degradation of three aromatic dyes by white rot fungi and the production of ligninolytic enzymes. *Mycobiology*. 36(2): 114–20.
49. Jia, B; Cui, B. 2011. Notes on *Ceriporia* (*Basidiomycota, Polyporales*) in China. *Mycotaxon*. 116(1): 457-468.
50. Jiang, H; Bishop, P. 1994. Aerobic biodegradation of azo dyes in biofilms. *Water Science Technology*. 29: 525-530.
51. Karapinar Kapdan, I; Kargi, F. 2002. Biological decolorization of textile dyestuff containing wastewater by *Coriolus versicolor* in a rotating biological contactor. *Enzyme and Microbial Technology* 30(2): 195-199.
52. Karnataka C. 2001. General Aspects of Basidiomycetes. *Science Vision*. A specialized magazine for medical entrances.
53. Keharia, H; Madamwar, D. 2003. Bioremediation concepts for treatment of dye containing wastewater: a review. *Indian journal of experimental biology*. 41(9): 1068-1075.
54. Khan, R; Bhawana, P; Fulkar, MH. 2012. Microbial decolorization and degradation of synthetic dyes: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 12(1): 75-97.
55. Kurniawati S, Nicell J. 2008. Characterization of *Trametes versicolor* laccase for the transformation of aqueous phenol. *Bioresource Technology*. 99(16):7825-7834.
56. Labeda D. 1990. Isolation of biotechnological organism from nature. *Basic Techniques*. McGraw-Hill.

57. Lebrun, J; Lamy, I; Mougin, C. 2011. Favouring the bioavailability of Zn and Cu to enhance the production of lignin-modifying enzymes in *Trametes versicolor* cultures. *Bioresource Technology* 102(3): 3103-3109.
58. Lee, J-W; Gwak, K; Park, J; Park, M; Choi, D; Kwon, M; Choi, I. 2007. Biological pretreatment of softwood *Pinus densiflora* by three white rot fungi. *Journal of microbiology*. 45(6): 485-91.
59. Lens, P; O'Flaherty, AP; Moran, AP; Stoodley, P; Mahony, T. 2003. Biofilms in Medicine, Industry and Environmental Biotechnology. Capítulo 2: The role of hydrophobicity and exopolymers in initial adhesion and biofilm formation.
60. Letey, J; Carrillo, M ; Pang, X. 2000. Approaches to characterize the degree of water repellency. *Journal of Hydrology*. pp. 231-232, 61-65.
61. Levin, L; Forchiassin, F. 2001. Short Communication Ligninolytic Enzymes of the White Rot Basidiomycete *Trametes trogii*. 21: 179-186.
62. Libra, J a; Borchert, M; Banit, S. 2003. Competition strategies for the decolorization of a textile-reactive dye with the white-rot fungi *Trametes versicolor* under non-sterile conditions. *Biotechnology and Bioengineering*. 82(6): 736-744.
63. Madhavi, V; Lele, S. 2009. Laccase: properties and applications,. *BioResources*. 4(4):1694-1717.
64. Madigan M T, Martinko J M, Stahl DA y Clark D P. 2010. Brock Biology of Microorganisms. Capítulo 14: Biología de la célula eucariótica y microorganismos eucarióticos. Décimo-tercera edición. Editorial Pearson Education.
65. Malarczyk, F; Jarosz-Wilkolazka, A; Kochmanska-Rdest, J.2003. Effect of Low Doses of Guaiacol and Ethanol on Enzymatic Activity of Fungal Cultures. *Nonlinearity in Biology, Toxicology and Medicine*. 1(2): 167-178.
66. Manu, B; Chaudhari, S. 2001. Anaerobic decolorisation of simulated textile wastewater containing azo dyes. *Bioresource Rechnology*. 82 (2002): 225-231.
67. Martínez, A. 2001. Studies on wheat lignin degradation by *Pleurotus* species using analytical pyrolysis. 59: 401-411.
68. Martínez, A; Speranza, M; Ruiz-Dueñas. FJ; Ferreira, P; Camarero, S; Guillén, F; Martínez M; Gutiérrez, A y Del Río, JC. 2005. Biodegradation of lignocellulosics:

- microbial, chemical and enzymatic aspects of fungal attack to lignin. *International Microbiology*. 8(3): 195-204.
69. Mendonça Maciel, MJ; Castro e Silva. A; Telles Ribeiro, HC. 2010. Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: a review. *Electronic Journal of Biotechnology*. 13(6): 1-13.
70. Mitrovic, J; Radovic, M; Bojic, D; Andjelkovic, T; Purenovic, M; Bojic, A. 2012. Decolorization of textile azo dye reactive orange 16 with UV/H₂O₂ process. *Journal of the Serbian Chemical Society* 77(4): 465-481.
71. Moilanen, U; Osmä, JF; Winquist, E; Leisola, M; Couto, SR. 2010. Decolorization of simulated textile dye baths by crude laccases from *Trametes hirsuta* and *Cerrena unicolor*. *Engineering in Life Sciences*. 10(3): 242-247.
72. Moreira-Neto, S; Mussatto, S; Machado, K; Milagres. A. 2013. Decolorization of salt-alkaline effluent with industrial reactive dyes by laccase-producing basidiomycetes strains. *Letter in Applied Microbiology*. 56(4):283-90.
73. Mori, Kenji. 1998. Capítulo 1. Current Organic Chemistry. Basidiomycetes as a Source for New Bioactive Natural Products. Bentham Science Publishers.
74. Mueller, G; Bills, G; Foster. M. 2004. Biodiversity of Fungi. Inventory and monitoring methods. British Library Cataloguing in Publication Data. Elsevier Inc.
75. Nautiyal C, Dion P. 2008. Molecular Mechanisms of Plant and Microbe Coexistence. Capítulo 18: Morphotyping and Molecular Methods to Characterize Ectomycorrhizal Roots and Hyphae in Soil. Volumen 7. Editorial Springer.
76. Nilanjana, D; Lakshmi, V; Jaseetha, A; Evy A. 2012. Application of Biofilms on Remediation of Pollutants - An Overview. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*. 2 (5):783-790 .
77. Novotny, C; Rawal, B; Bhatt. M; Patel. M; Aek, V y Molitoris HP. 2001. Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleorotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. *Journal of Biotechnology*. 89: 113-122.
78. O'Neill, C; Lopez. a; Esteves. S; Hawkes. FR; Hawkes, D; Wilcox, S. 2000. Azo-dye degradation in an anaerobic-aerobic treatment system operating on simulated textile effluent. *Applied microbiology and biotechnology*. 53(2): 249-254.

79. O'Neill, CO; Hawkes, F; Esteves, S; Hawkes, D; Wilcox, S. 1999. Anaerobic and aerobic treatment of a simulated textile effluent. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 74(10): 993-999.
80. Øllgaard, B; Frost, L; Galster, J. 1998. Survey of azo-colorants in Denmark : Consumption, use, health and environmental aspects. Ministry of Environment and Energy.
81. Osma, J; Toca-Herrera, J; Rodríguez-Couto, S. 2010. Biodegradation of a simulated textile effluent by immobilised-coated laccase in laboratory-scale reactors. *Applied Catalysis A: General*. 373(1-2): 147-153.
82. O'Toole, GO; Kaplan, HB; Kolter, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. pp. 49-79.
83. Patrick, F; Mtui, G; Mshandete, A; Kivaisi, A. 2008. Optimization of laccase and manganese peroxidase production in submerged culture of *Pleurotus sajorcaju*. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 14: 487-492
84. Pereira, L; Alves, M. 2012. Strategies for Sustainable Development. Capítulo 4: Dyes: Environmental Impact and Remediation. Editorial Springer.
85. Pérez J, Muñoz-Dorado J, de la Rubia T y Martínez J. 2002 Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*. 5: 53-63.
86. Perumal, K; Malleswari, R; Catherin, A; Moorthy, T; Amm, S; Chettiar, M; Nadu, T. 2012. Decolourization of Congo Red dye by bacterial consortium isolated from dye contaminated soil, *Journal of Microbiology & Biotechnology Research*. 2(3): 475-480.
87. Pesciaroli, L; Petruccioli, M; Federici, F; D'Annibale, a. 2013. *Pleurotus ostreatus* biofilm-forming ability and ultrastructure are significantly influenced by growth medium and support type. *Journal of Applied Microbiology*. 114(6): 1750-62.
88. Prabha, T; Revathi, K; Vinod, M; Shanthakumar, S; Bernard, P. 2013. A simple method for total genomic DNA extraction from water moulds. *Current Science*. 104:3.
89. Praveen, G; Bhat, K. 2012. Decolorization of Azo dye Red 3BN by Bacteria. *International Research Journal of Biological Sciences* 1(5): 46-52.

90. Prewitt, M; Diehl, S V; Mcelroy, TC; Diehl, WJ. 2008. Comparison of general fungal and basidiomycete-specific ITS primers for identification of wood decay fungi. 58(10312): 66-71.
91. Priya, M; Divyashree, K; Goswami, C; Prabha, ML; Babu, A. 2013. Bioremediation of Textile Dyes by White Rot Fungi Isolated From Western Ghats Area. no.4: 913-918.
92. Puvaneswari NI, Muthukrishnan J, Gunasekaran P.2006. Toxicity assessment and microbial degradation of azo dyes. Indian Journal Experimental Biology. 44(8):618-626.
93. Radha, K; Regupathi, I; Arunagiri, a.; Murugesan, T. 2005. Decolorization studies of synthetic dyes using *Phanerochaete chrysosporium* and their kinetics. Process Biochemistry. 40(10): 3337-3345.
94. Ramage, G; Rajendran, R; Sherry, L; Williams, C. 2012. Fungal biofilm resistance. International Journal of Microbiology. ID 528521.
95. Ratna; Padhi, B. 2012. Pollution due to synthetic dyes toxicity & carcinogenicity studies and remediation. International Journal of Environmental Sciences. 3(3): 940-955.
96. Robinson, T; McMullan, G; Marchant, R; Nigam, P. 2001. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. Bioresource Technology. 77(3): 247-255.
97. Rodríguez, E; Pickard, MA; Vazquez-duhalt, R. 1999. Industrial Dye Decolorization by Laccases from Ligninolytic Fungi. 38: 27-32.
98. Rodriguez-Couto, S. 2013. Treatment of Textile Wastewater by White-rot Fungi: Still a Far Away Reality ? 2(3): 113-119.
99. Rodríguez-Couto, S; Toca, J. 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. Biotechnology Advances 24(5): 500-13.
100. Rojas, G; Flores, M; Larralde, C; Arévalo K. 2010. Decoloración del Azul Brillante de Remazol R (RBBR) en presencia de sulfato de cobre por dos nuevas cepas de *Trametes*. Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal. 1(2): 143-144.

101. Ruiz-Dueñas, F; Martínez, A. 2009. Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. *Microbial biotechnology*. 2(2): 164-177.
102. Rybicki, E; Świąch, T; Leśniewska, E; Albińska, J; Szykowska, MI; Paryjczak, T; Sypniewski, S. 2004. Changes in Hazardous Substances in Cotton after Mechanical and Chemical Treatments of Textiles. 12(2): 67-73.
103. Santoyo, F; González, A; Terrón, M; Ramírez, L; Pisabarro, A. 2008. Quantitative linkage mapping of lignin-degrading enzymatic activities in *Pleurotus ostreatus*. *Enzyme and Microbial Technology*. 43(2): 137-143.
104. Saratale, R; Saratale, GD; Chang, J; Govindwar, S. 2011. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 42(1): 138-157.
105. Schilling, J; Duncan, S; Presley, G; Filley, T; Jurgens, J a.; Blanchette, R. 2013. Colocalizing incipient reactions in wood degraded by the brown rot fungus *Postia placenta*. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 83: 56-62.
106. Schneider, K; Hafner, C; Jäger, I. 2004. Mutagenicity of textile dye products. *Journal of Applied Toxicology*. 24(2): 83-91.
107. Schoch, C; Seifert, K; Huhndorf, S; Robertd, V; Spouge, J; Levesque, A; Chen, W; Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *National Academy of Sciences*. 109 (16).
108. Seifert, K. 2009. Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources*. 9(1): 83- 89.
109. Seyis, I; Subasioglu, T. 2008. Comparison of live and dead biomass of fungi on decolorization of methyl orange. *African Journal of Biotechnology*. 7(13): 2212-2216.
110. Shah, V; Nerud, F. 2002. Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization. *Canadian Journal of Microbiology*. 48(10): 857-870.

111. Shunmugaperumal, T .2010. Biofilm eradication and prevention. A Phamaceutical Approach to Medical Device Infections. Capítulo 1. Introduccion and overview of biofilm. Editorial Wiley.
112. Singh, D; Chen. S. 2008. The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-degrading enzymes. Applied Microbiology Biotechnology. 81(3): 399-417.
113. Siqueria. V; Lima, N. 2013. Biofilm Formation by Filamentous Fungi Recovered from a Water System. Journal of Mycology. ID 152941.
114. Smits, T; Wick, L; Harms. Keel. C. 2003- Characterization of the surface hydrophobicity of filamentous fungi. Environmental Microbiology 5: 85-91
115. Solís, M; Solís, A; Pérez. H; Manjarrez. N; Flores, M. 2012. Microbial decolouration of azo dyes: A review. Process Biochemistry. 47(12): 1723-1748.
116. Staszczak, M. 2006. Proteasomal degradation pathways in *Trametes versicolor* and *Phlebia radiata*. Enzyme and Microbial Technology 30(4): 537-541.
117. Staszczak, M. 2008. The role of the ubiquitin-proteasome system in the response of the ligninolytic fungus *Trametes versicolor* to nitrogen deprivation. Fungal Genetics and Biology. 45(3): 328-337.
118. Stolz, A. 2001. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. Applied Microbiology and Biotechnology. 56(1-2): 69-80.
119. Stringer, M; Timberlake. W. 1995. *dewA* encodes a fungal hydrophobin component of the *Aspergillus* spore Wall. Molecular Microbiology 16 (1): 33-44
120. Swann, E; Frieders. E ; McLaughlin. DJ. 1999. Microbotryum, Kriegeria and the changing paradigm in basidiomycete classification. Mycologia. 91:51-66.
121. Takamiya, M; Magan, N; Warner. PJ. 2008. Impact assessment of bisphenol A on lignin-modifying enzymes by basidiomycete *Trametes versicolor*. Journal of Hazardous Materials. 154(1-3): 33-37.
122. Tekere, M; Mswaka. A; Zvauya. R; Read, SJ. 2001. Growth, dye degradation and ligninolytic activity studies on Zimbabwean white rot fungi. Enzyme and Microbial Technology. 28: 420-426.
123. Ten Have, R; Teunissen P. 2001. Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi. Chemical Reviews. 101: 3397-3413

124. THERMO SCIENTIFIC. 2014. T042 Technical Bulletin. Assesment of Nucleic Acid Purity. Wilmington, Estados Unidos.
125. Theerachat, M; Morel, S; Guieysse, D; Remaud-Simeon, M; Chulalaksananukul, W. 2012. Comparison of synthetic dye decolorization by whole cells and a laccase enriched extract from *Trametes versicolor* DSM11269. African Journal of Biotechnology. 11(8):1964-1969.
126. Thorn, R; Reddy, C; Harris D; Paul, EA. 1996. Isolation of saprophytic basidiomycetes from soil. Applied Environmental Microbiology. 62(11): 4288-4292.
127. Tripathi, A.; Srivastava, S. 2011. Ecofriendly Treatment of Azo Dyes: Biodecolorization using Bacterial Strains. International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics. 1(1): 37-40.
128. Van Der, J. 2002. Production of laccase by the white-rot fungus *Pycnoporus sanguineus*. Tesis para obtener el grado de Magister. University of Free State, Sudáfrica.
129. Venkatradi, R; Irvine, R. 1993. Cultivation of *Phanerochaete chrysosporium* and production of lignin peroxidase in novel biofilm reactors system: hollow fiber reactor reactor and silicone membrane reactor. Water Research. 27(4): 591-596.
130. Villena, G. 2006. Fermentacion por Adhesión a Superficies: Biopelículas de *Aspergillus niger* para la Producción de enzimas. Tesis para obtener el grado de doctor. Universidad Nacional Agraria La Molina.
131. Villena, G; Moreno, P; Gutiérrez-Correa, M. 2001. Cellulase production by fungal biofilms on polyester cloth. Agro FOOD Industry Hi-Tech. pp. 32-35.
132. Villena, G; Gutiérrez-Correa, M. 2003. Biopelículas de *Aspergillus niger* para la producción de celulasas: algunos aspectos estructurales y fisiológicos. 10(1): 78-87.
133. Villena, G; Gutiérrez-Correa, M. 2006. Production of cellulase by *Aspergillus niger* biofilms developed on polyester cloth. . Letters in applied microbiology. 43(3): 262-268.

134. Villena, G; Gutiérrez-Correa, M. 2007. Morphological patterns of *Aspergillus niger* biofilms and pellets related to lignocellulolytic enzyme productivities. Letters in applied microbiology. 45(3): 231-237.
135. Villena, G; Takashi, F; Shinji, T y Gutiérrez-Correa M. 2010. Structural analysis of biofilms and pellets of *Aspergillus niger* by confocal scanning laser microscopy and cryo scanning electron microscopy. Bioresource Technology. 101: 1920-1926.
136. Vyas, B; Bakowski, S; Sasek, V; Matucha, M. 1994. Degradation of anthracene by selected white rot fungi. 14: 65-70.
137. Wesenberg, D; Kyriakides, I; Agathos, SN. 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. Biotechnology Advances. 22(1-2):161-187.
138. White, T; Bruns, T; Lee, S; Taylor, J. 1990. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Capítulo 38: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal. New York Academic Press Inc.
139. Wu, Y; Li, T; Yang, L. 2012. Mechanisms of removing pollutants from aqueous solutions by microorganisms and their aggregates: a review. Bioresource Technology 107: 10-18.
140. Yamanaka, R; Soarcs, C; Matheus, D; Machado, K. 2008. Lignolytic enzymes produced by *Trametes villosa* ccb176 under different culture conditions. General Microbiology. 39 (1).
141. Zaharia, C; Suteu, D. 2010. Organic Pollutants Ten Years After the Stockholm Convention - Environmental and Analytical Update. Capítulo 3: Textile Organic Dyes - Characteristics, Polluting Effects and Separation / Elimination Procedures from Industrial Effluents - A Critical Overview. Editorial Intech.
142. Zaharia, C; Suteu, D; Muresan, A; Muresan, R; Popescu, A. 2009. Textile wastewater treatment by homogeneous oxidation with hydrogen peroxide. Environmental Engineering and Management Journal. 8 (6): 1359-1369.
143. Zambonelli, A; Bonito, G. 2012. Edible Ectomycorrhizal Mushrooms: Current Knowledge and Future Prospects. Capítulo 16. Cultivation of Basidiomycete

Edible Ectomycorrhizal Mushrooms: *Tricholoma*, *Lactarius* and *Rhizopogon*. Springer Heidelberg.

144. Zhang, C; Zhu, Z; Zhang, H; Hu, Z. 2011. Rapid reductive degradation of azo dyes by a unique structure of amorphous alloys. Chinese Science Bulletin 56(36): 3988-3992.
145. Zhang, T; Fu, YC; Bishop, PL. 1995. Transport and biodegradation of toxic organics in biofilms. Journal of Hazardous Materials. 41: 267-285.
146. Zhinqiang A. 2005. Handbook of industrial Mycology. Capítulo 2: Fungal germplasm for drug discovery and industrial applications. Volumen 22. Publicaciones Marcel Dekker.
147. Zollinger H. 2003. Color Chemistry: Syntheses, Properties, and Applications of Organic Dyes and Pigments. Tercera edición. Wiley- VCH.

ANEXOS

ANEXO 1. AISLAMIENTO Y REACTIVACIÓN DE BASIDIOMICETOS

Las fotografías de crecimiento en placa y reacción en guaiacol corresponden al tiempo en el cual el micelio abarca el diámetro de la placa de 8 cm o, en su defecto, el día en el que llegan a su máximo crecimiento como se indica en la tabla 1. En los casos donde no se presenta la reacción guaiacol es porque ésta resultó ser negativa.

Figura A1. Aislamiento de cepa LMBTM1 de Tingo María.

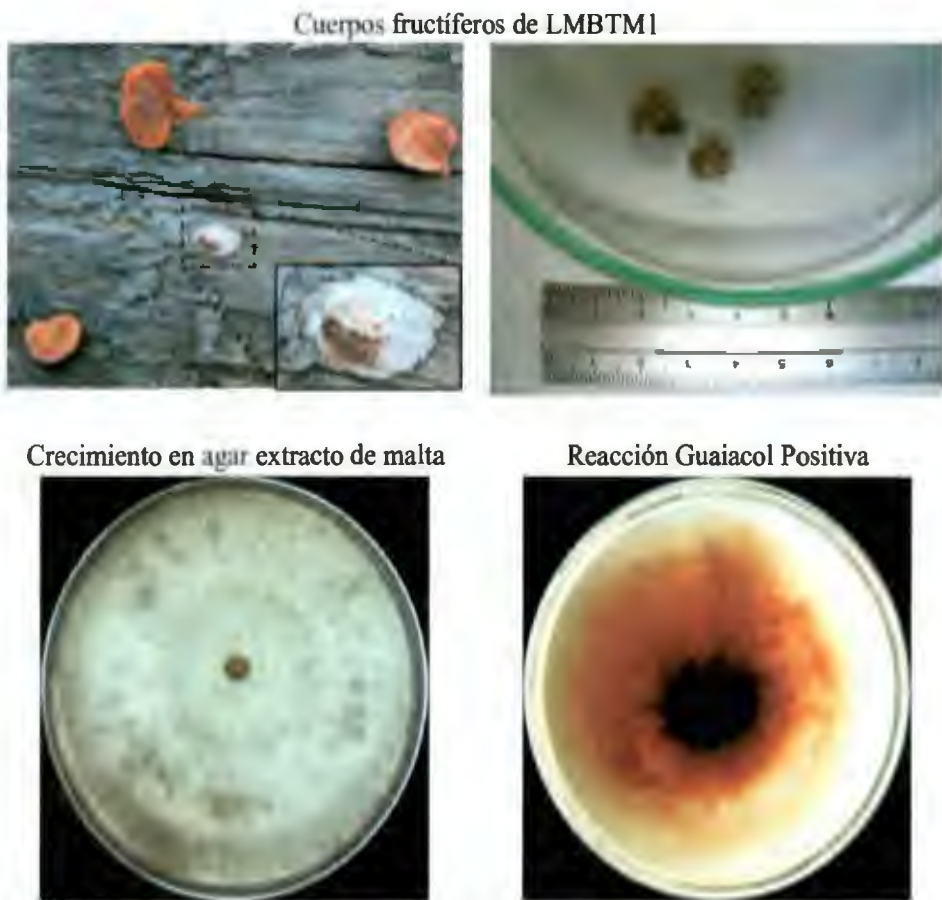


Figura A2 . Aislamiento de cepa LMBTM2 de Tingo María.

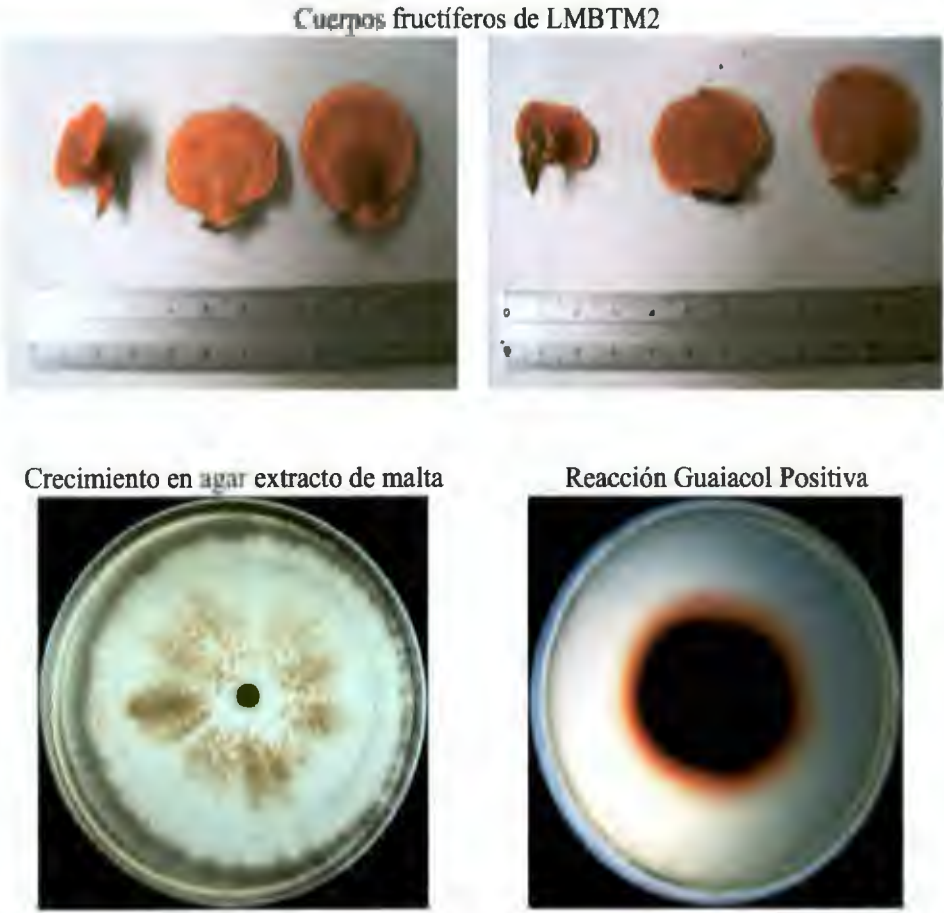


Figura A 3. Aislamiento de cepa LMBTM3 de Tingo María.



Crecimiento en agar extracto de malta



Reacción Guaiacol Positiva

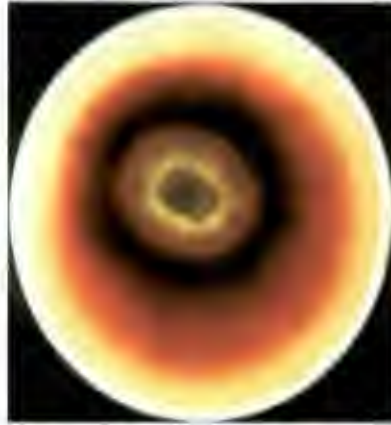


Figura A 4. Aislamiento de cepa LMBTM4 de Tingo María.

Cuerpos fructíferos de LMBTM4



Crecimiento en agar extracto de malta



Reacción Guaiacol Positiva



Figura A 5. Aislamiento de cepa LMBTM5 de Tingo María.



Crecimiento en agar extracto de malta



Reacción Guaiacol Positiva

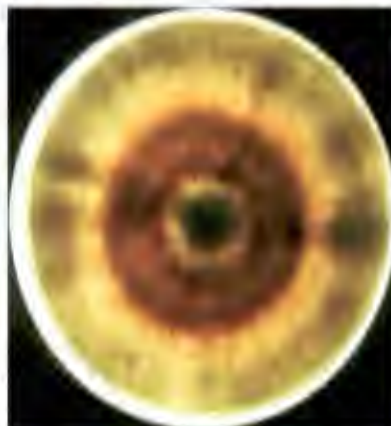


Figura A 6. Aislamiento de cepa LMBU6.

Crecimiento en agar extracto de malta



Reacción Guaiacol Positiva



Figura A7. Asilamiento de cepa LMBTM7 de UNALM.



Crecimiento en agar extracto de malta



Reacción Guaiacol Positiva

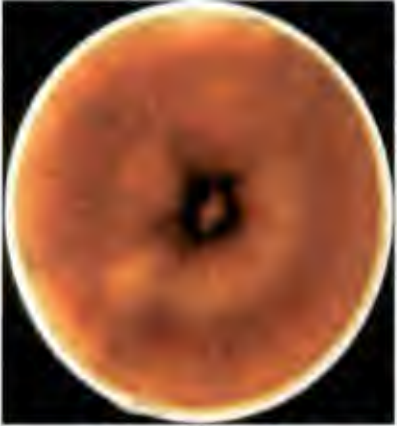


Figura A8. Aislamiento de cepa LMBTM8 de Tingo María.



Crecimiento en agar extracto de malta



Reacción Guaiacol Positiva



Figura A9. Aislamiento de cepa LMBTM9 de Tingo María.

Cuerpos fructíferos de LMBTM9



Crecimiento en agar extracto de malta



Reacción Guaiacol Positiva

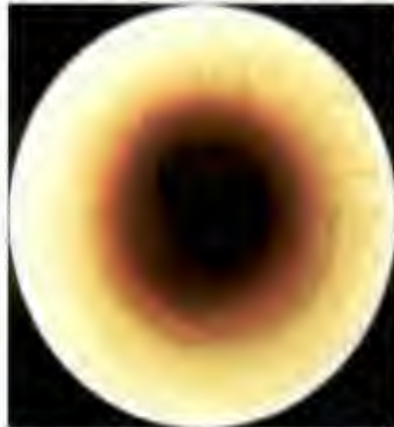


Figura A10. Aislamiento de cepa LMBTM10 de Tingo María.



Crecimiento en agar extracto de malta



Reacción Guaiacol Positiva



Figura A11. Reactivación BAS1 de Cepario LMB.

Crecimiento en agar extracto de malta



Reacción Guaiacol Positiva



Figura A12. Reactivación BAS6 de cepario LMB

Crecimiento en agar extracto de malta



Figura A13. Reactivación BAS7 de Cepario LMB.

Crecimiento en agar extracto de malta



Figura A14. Reactivación BASH1A de cepario LMB.

Crecimiento en Placa

Crecimiento en agar extracto de malta



Reacción Guaiacol Positiva



Figura A15. Reactivación BASH1C de cepario LMB.

Crecimiento en agar extracto de malta



Reacción Guaiacol Positiva



ANEXO 2. MICROFOTOGRAFÍAS DE BASIDIOMICETOS AISLADOS

Las siguientes fotografías se señalan las estructuras conocidas como fibulas propias de los basidiomicetos. En algunos casos no se pudieron detectar, sin embargo se muestran las hifas septadas y micelios estériles que son caracteres diagnósticos también propios de basidiomicetos. Todas las fotografías tienen un aumento de 40X del lente objetivo.

Figura A16. Cepa LMBTM1.

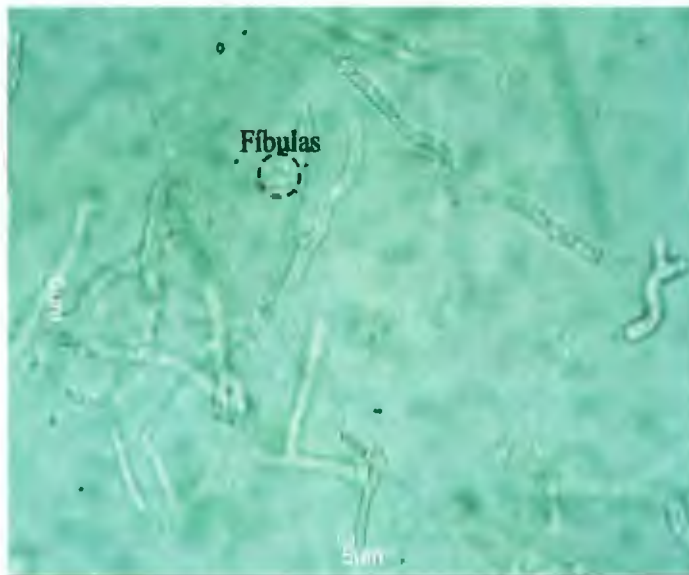


Figura A17. Cepa LMBTM2.

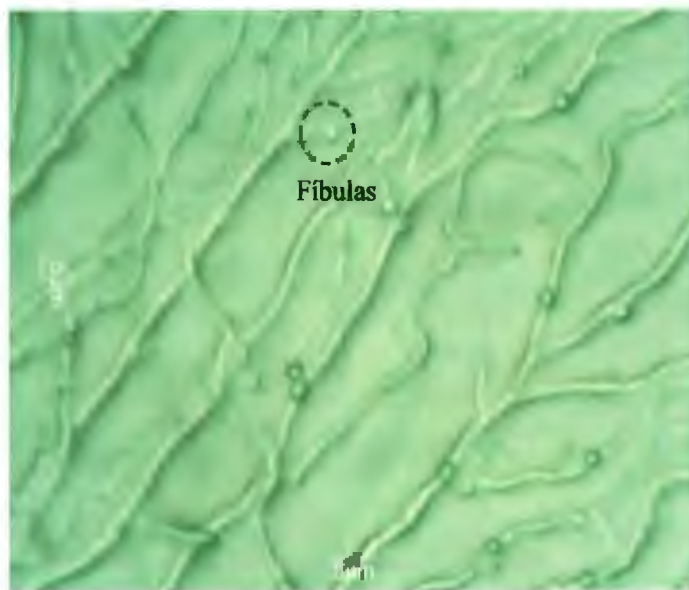


Figura A18. Ceba LMBTM3.

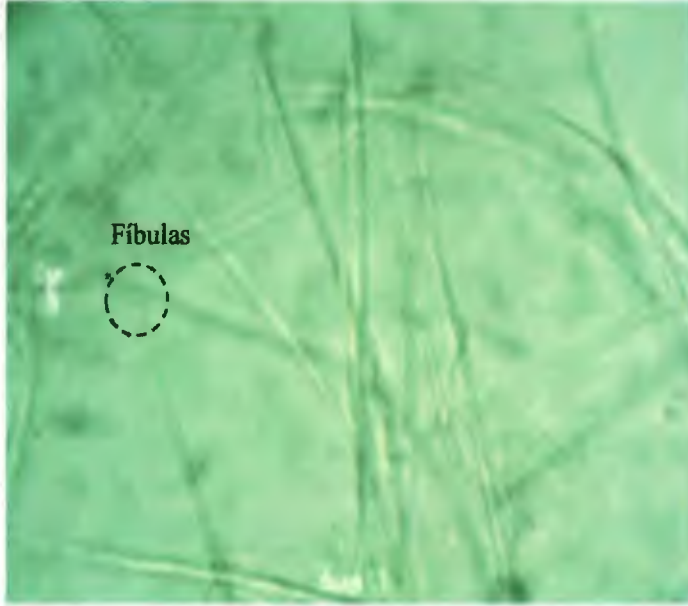


Figura A19. Ceba LMBTM4.

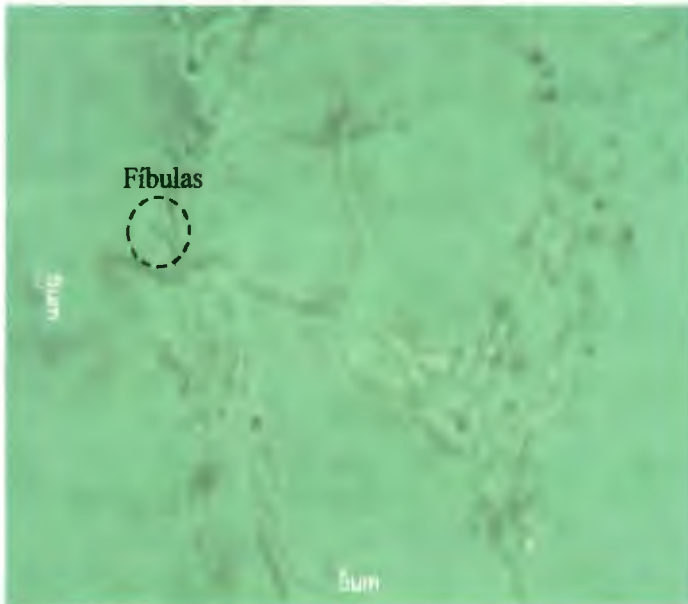


Figura A20. Ceba LMBTM5.

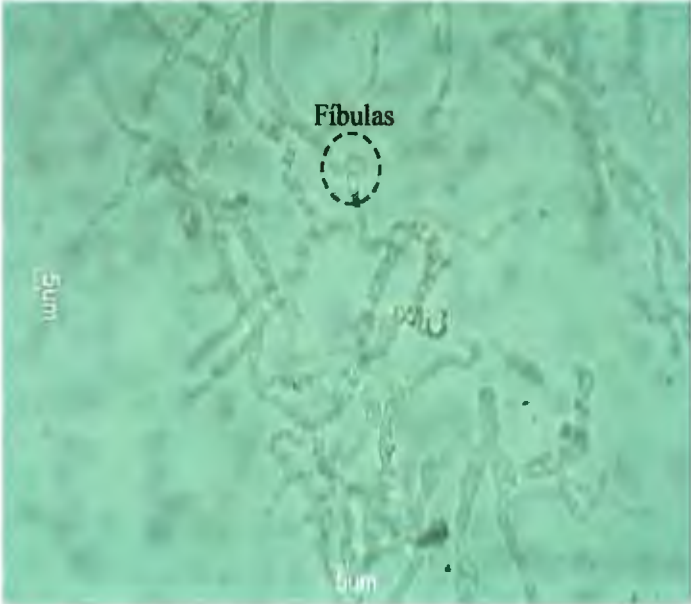


Figura A21. Ceba LMBU6.

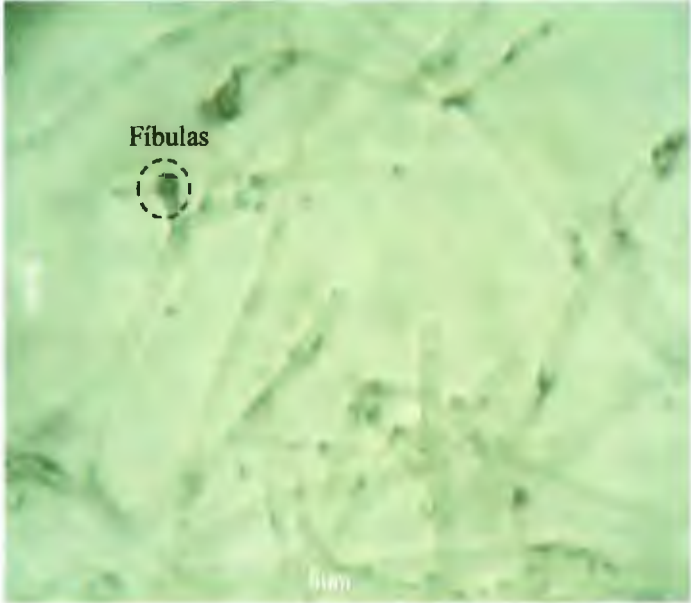


Figura A22. Cepa LMBTM7.

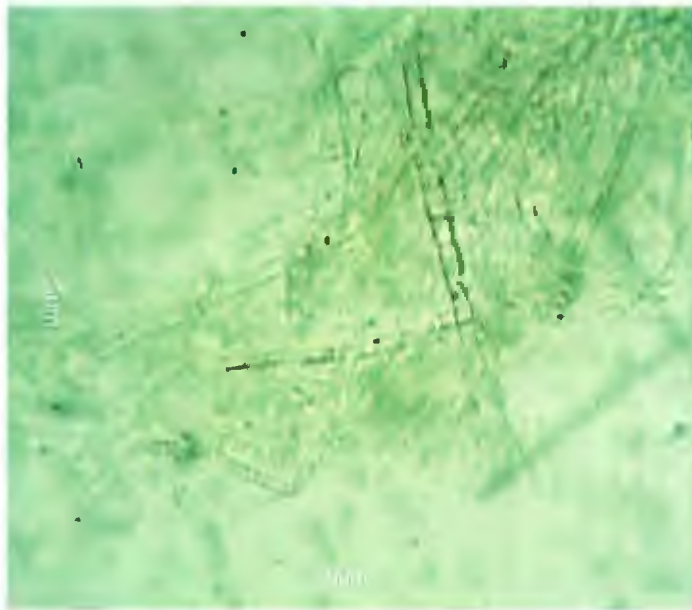


Figura A23. Cepa LMBTM8.



Figura A24. Cepa LMBTM9.

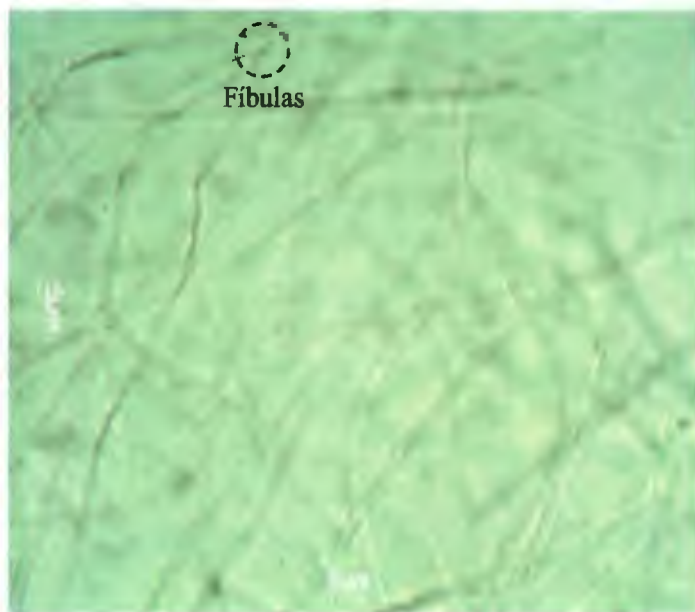


Figura A25. Cepa LMBTM10



Figura A26. Cepa BAS1.



Figura A27. Cepa BAS6.

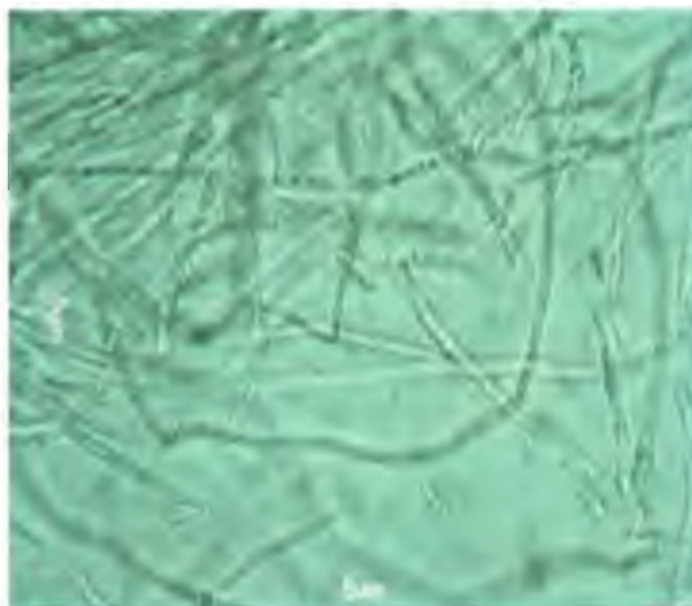


Figura A28. Ceba BAS7.

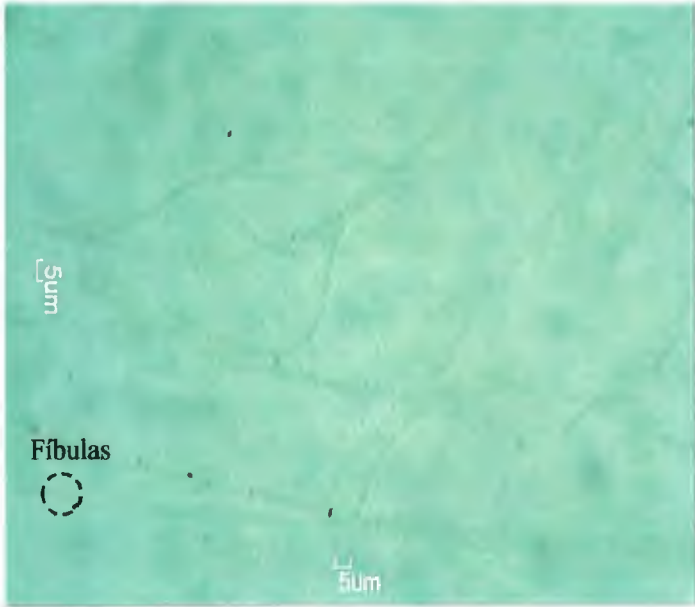


Figura A29. Ceba BASH1A.

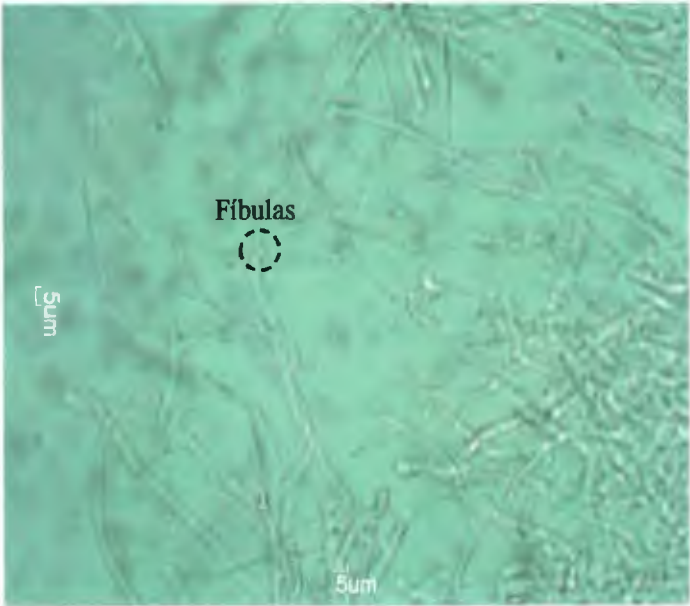
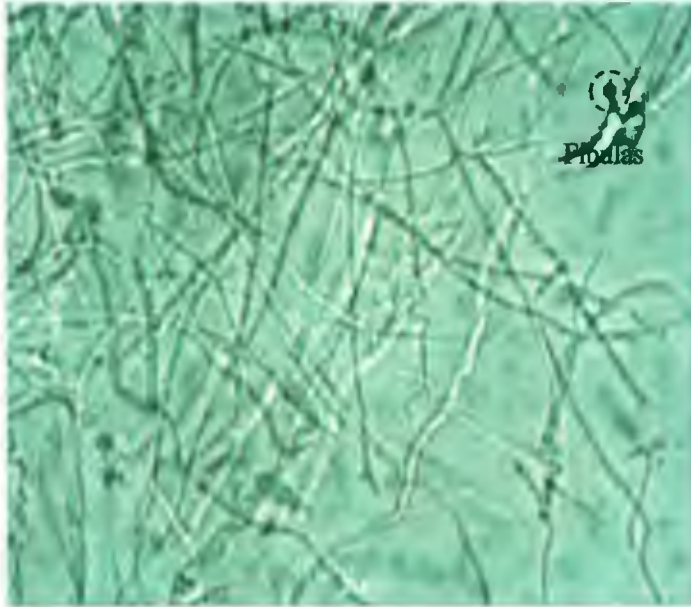
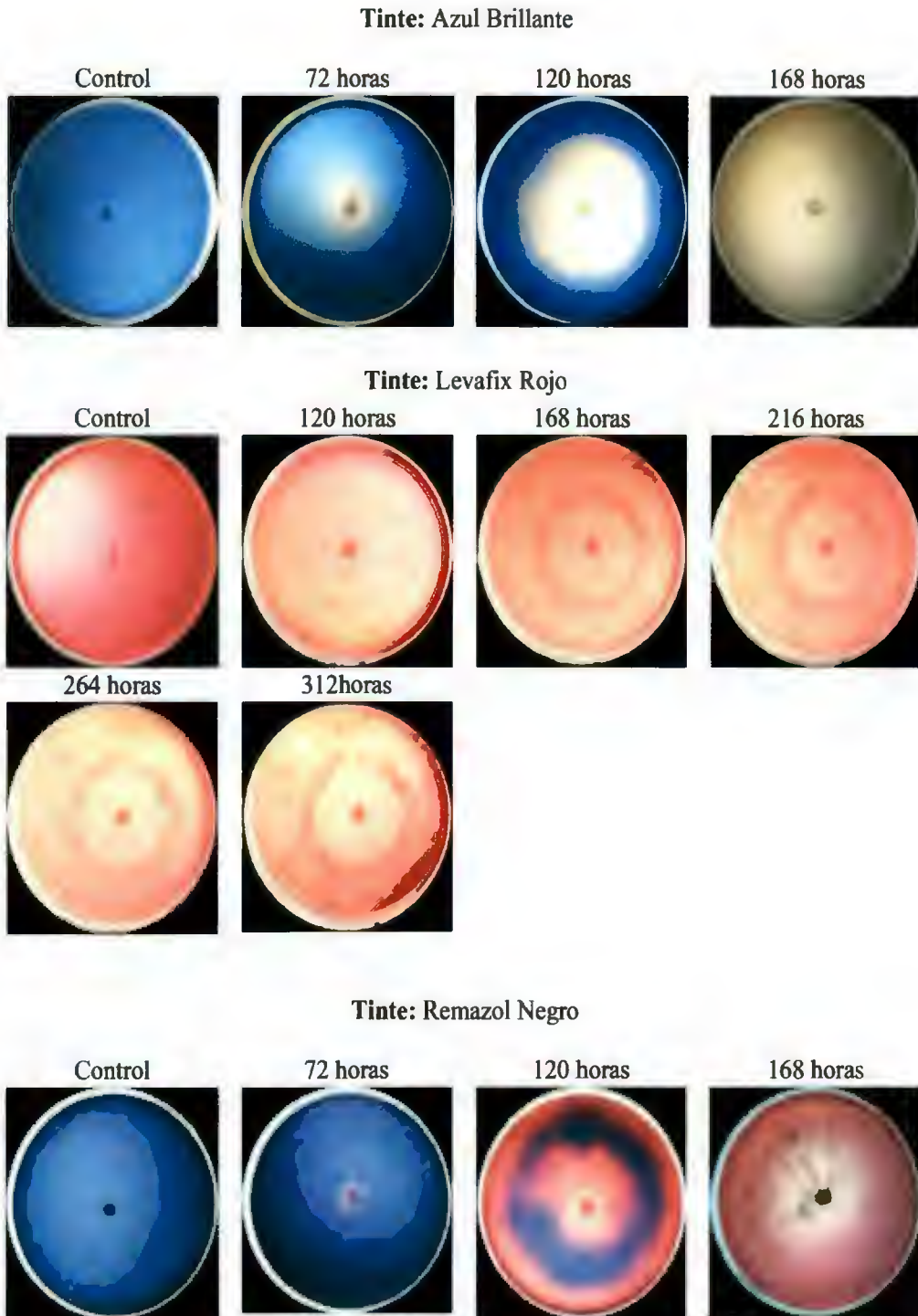


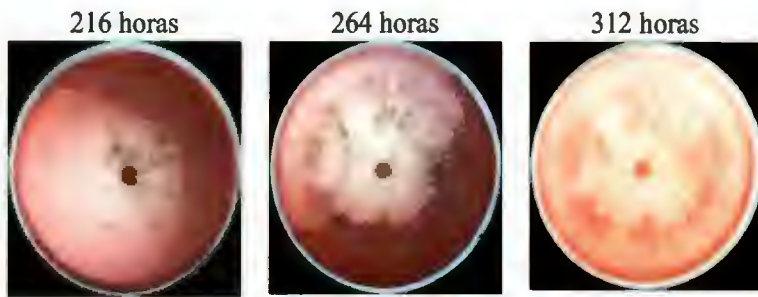
Figura A30. Cepa BASH1C



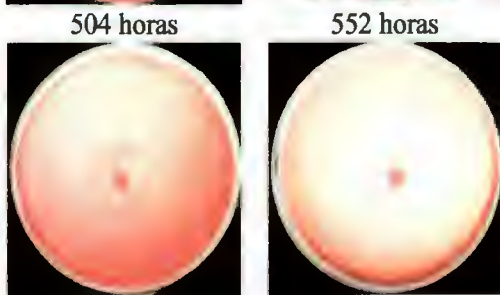
ANEXOS 3. TAMIZADO DE CEPAS PARA ACTIVIDAD DECOLORADORA

Figura A31. Secuencia de decoloración de la cepa LMBTM1 en medios sólidos conteniendo tintes azoicos





Tinte: Remazol Rojo



Tinte: Rojo Profundo



Tinte: Synozol Turquesa

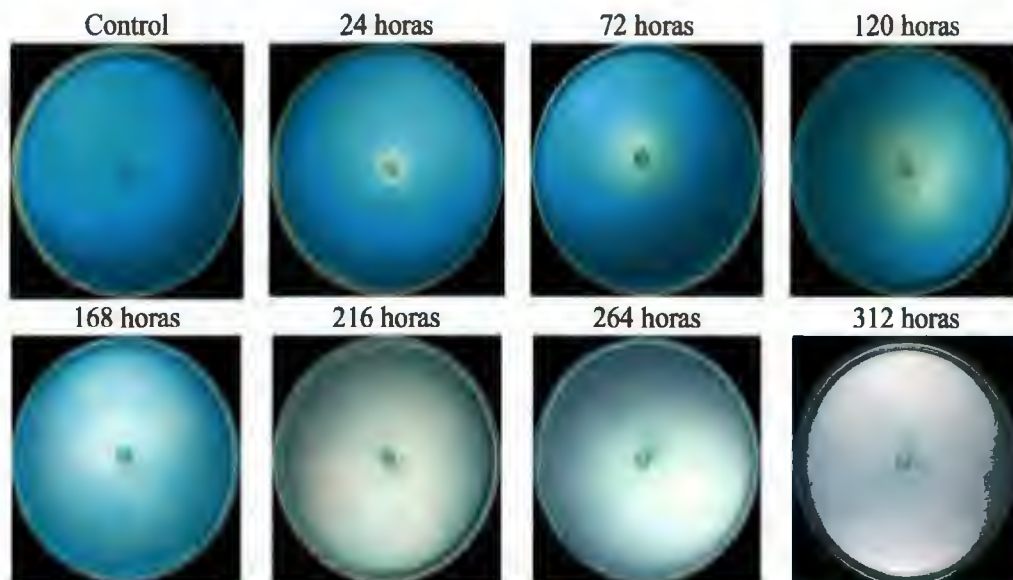
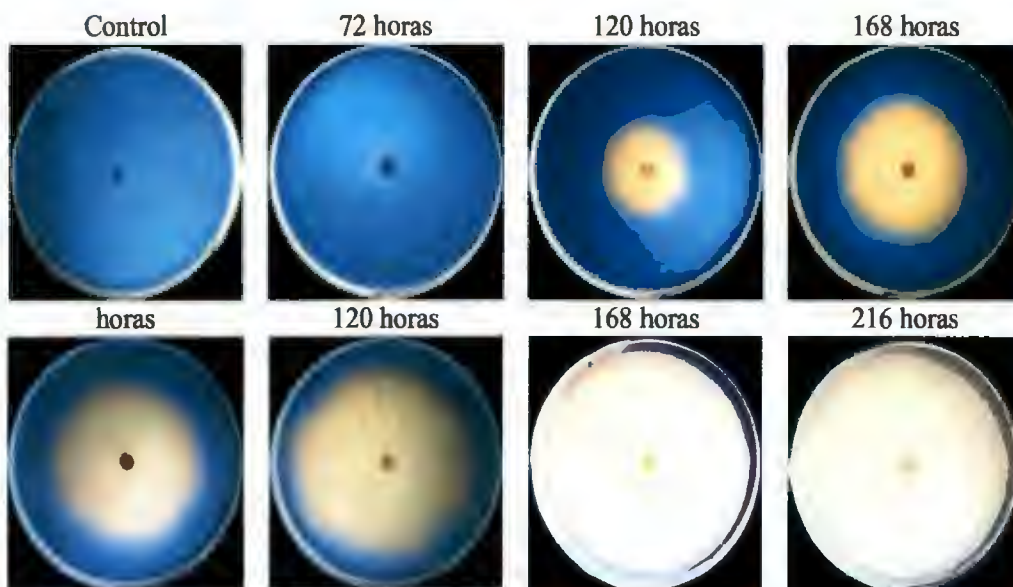
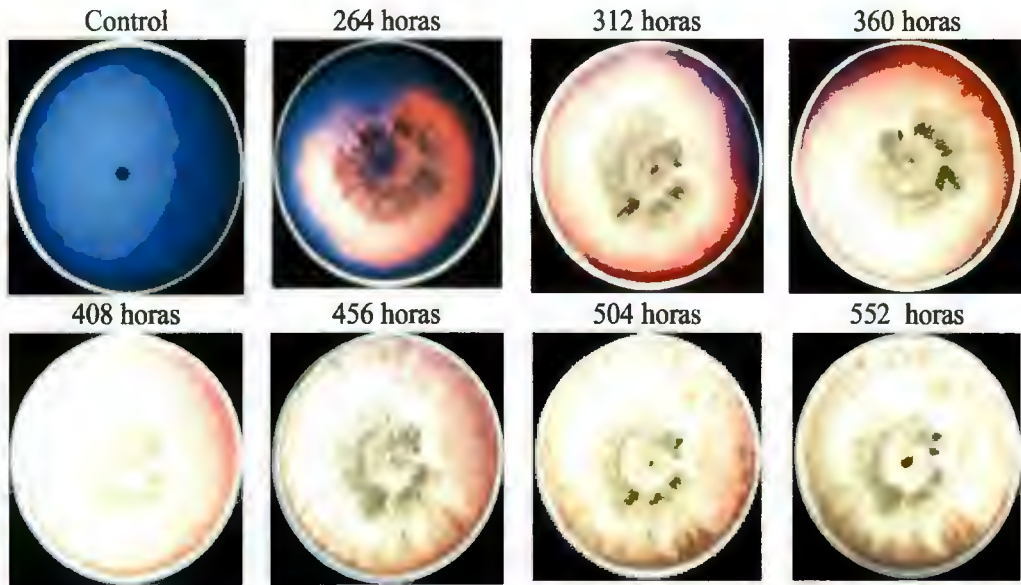


Figura A32. Secuencia de decoloración de la cepa LMBTM2 en medios sólidos conteniendo tintes azoicos

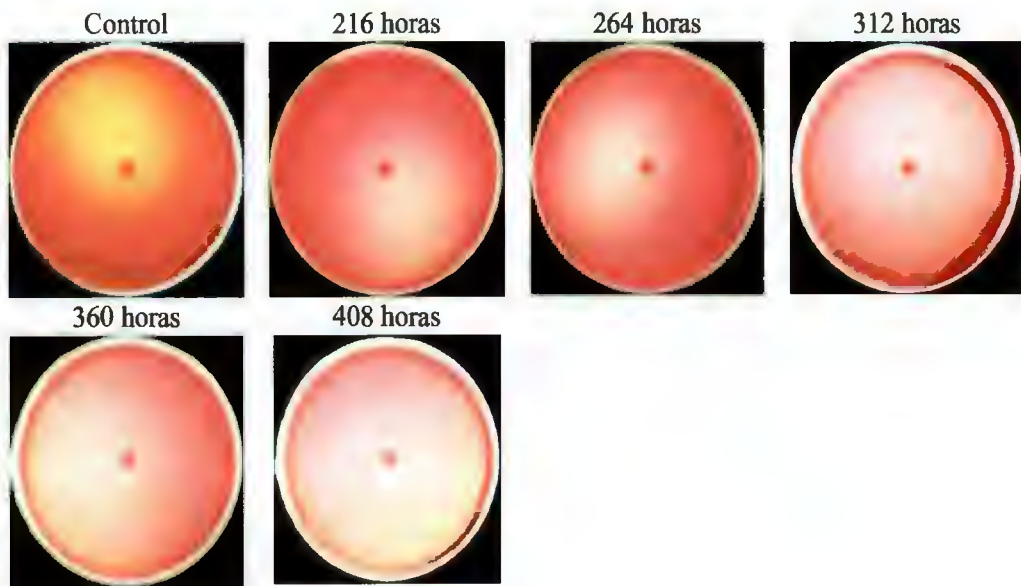
Tinte: Azul Brillante



Tinte: Remazol Negro



Tinte: Rojo Profundo



Tinte: Synozol Turquesa

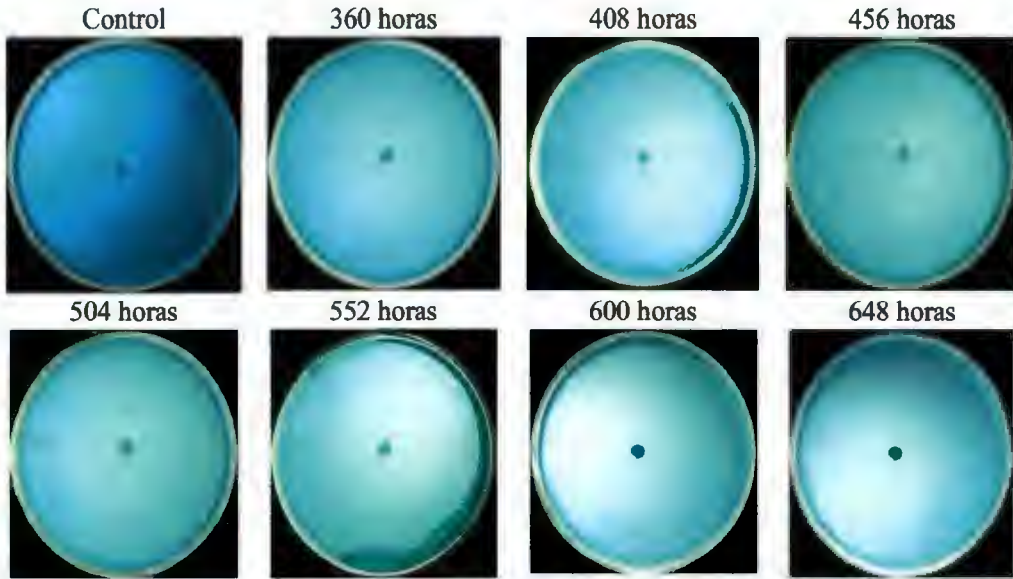


Figura A33: Secuencia de decoloración de la cepa LMBTM3 en medios sólidos conteniendo tintes azoicos

Tinte: Azul Brillante

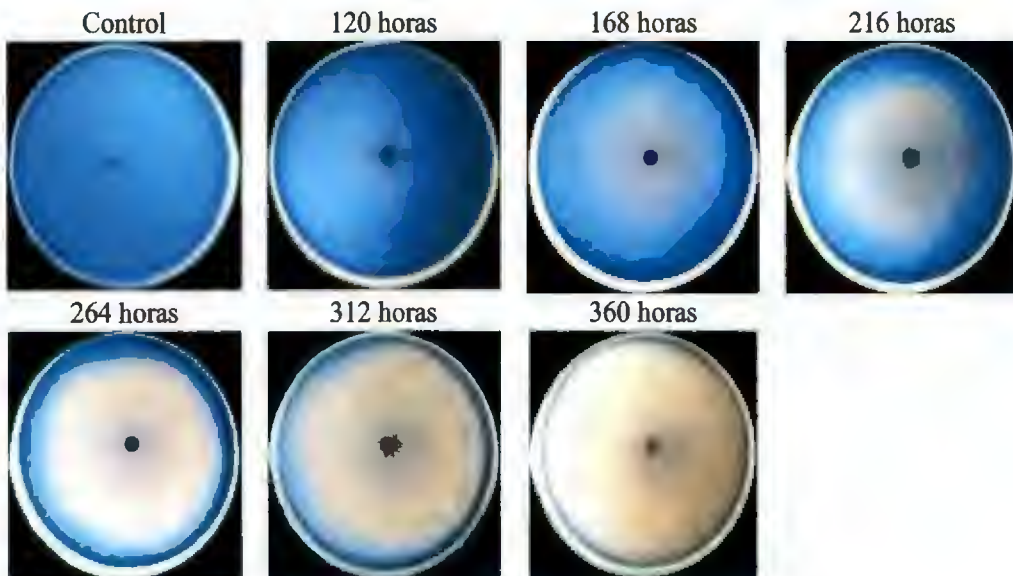
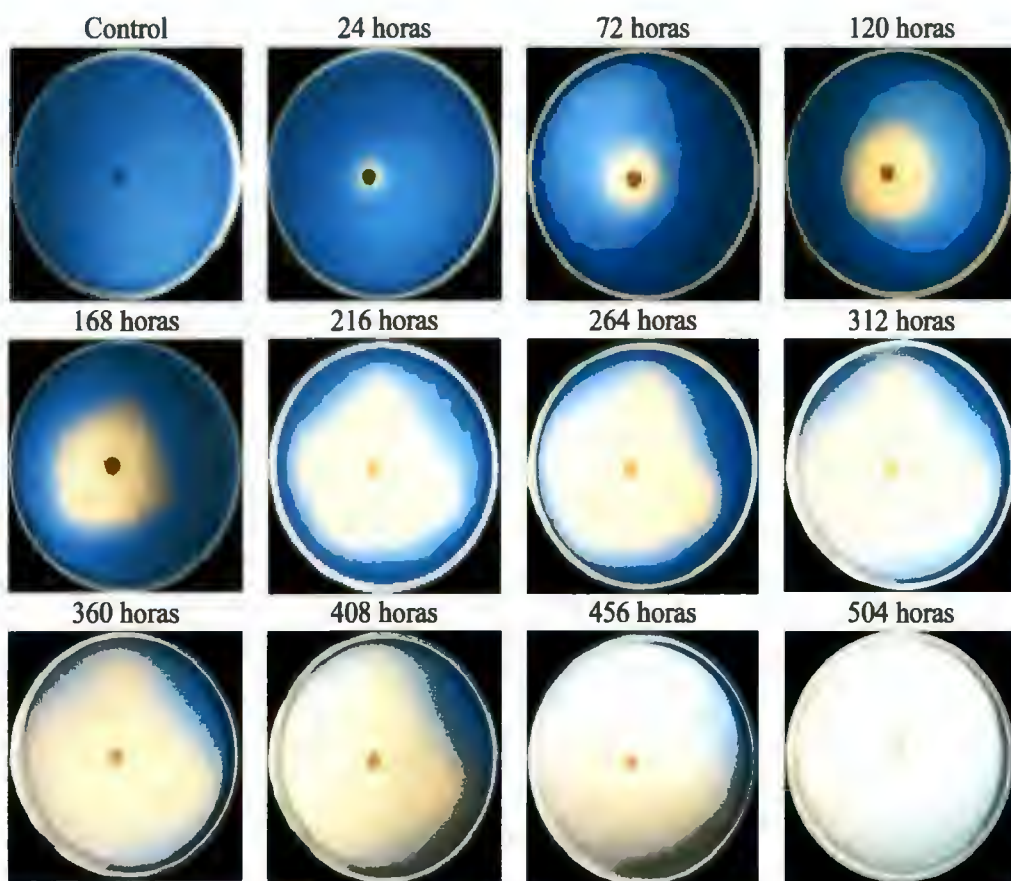


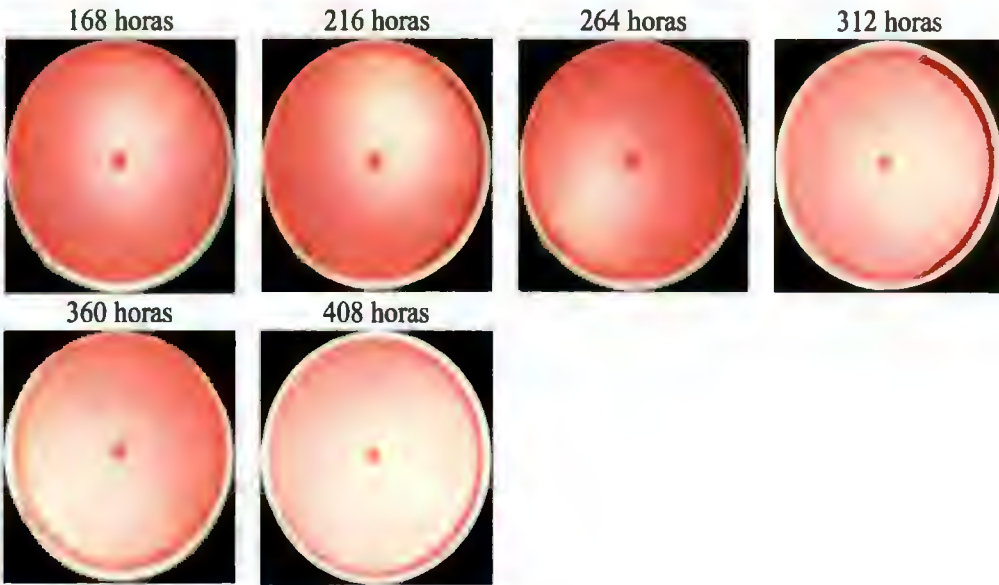
Figura A34. Secuencia de decoloración de la cepa LMBTM4 en medios sólidos conteniendo tintes azoicos

Tinte: Azul Brillante

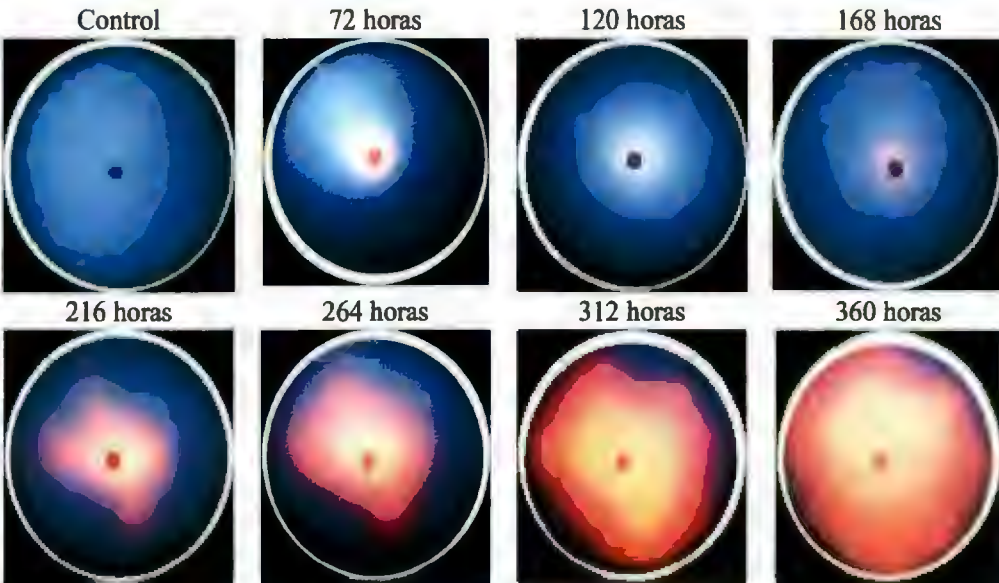


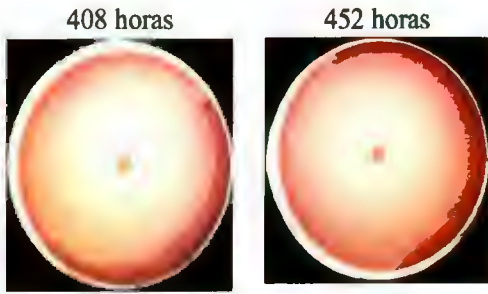
Tinte: Levafix Rojo



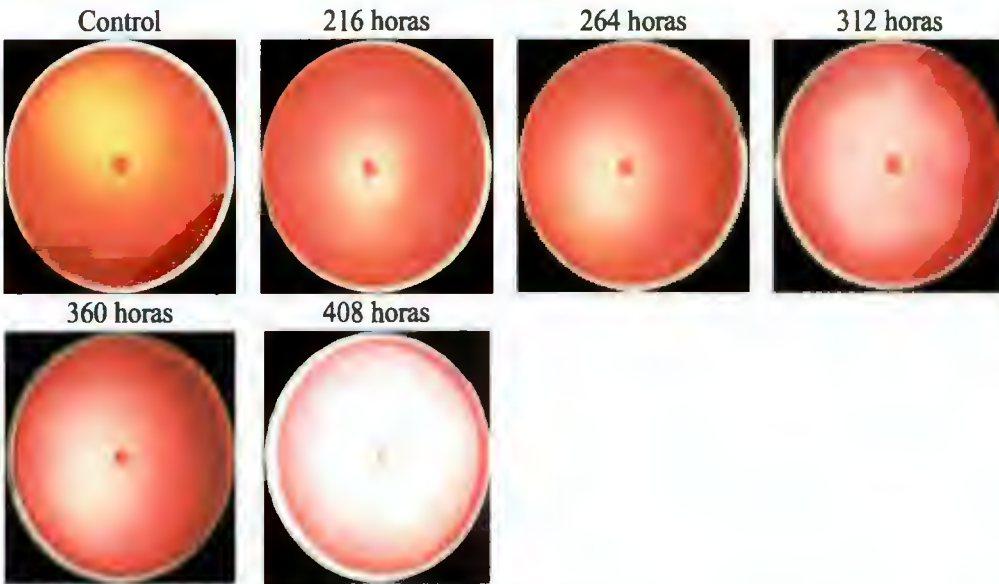


Tinte: Remazol Negro





Tinte: Rojo Profundo



Tinte: Synozol Turquesa

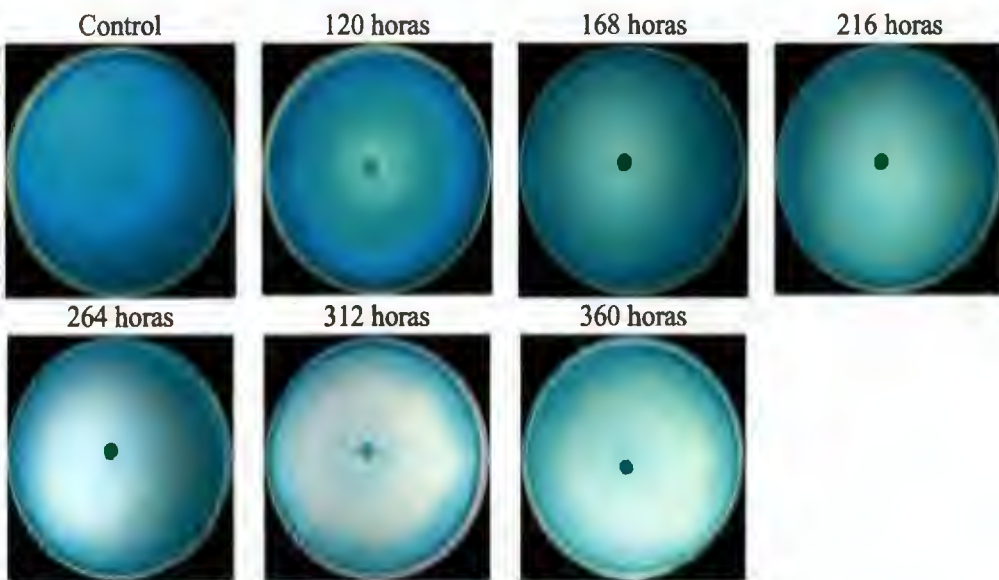
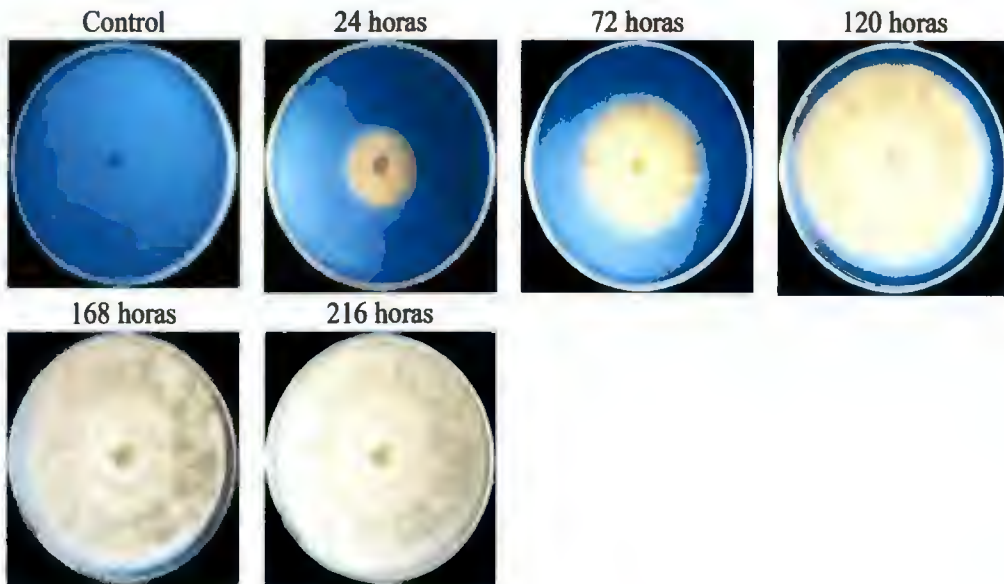
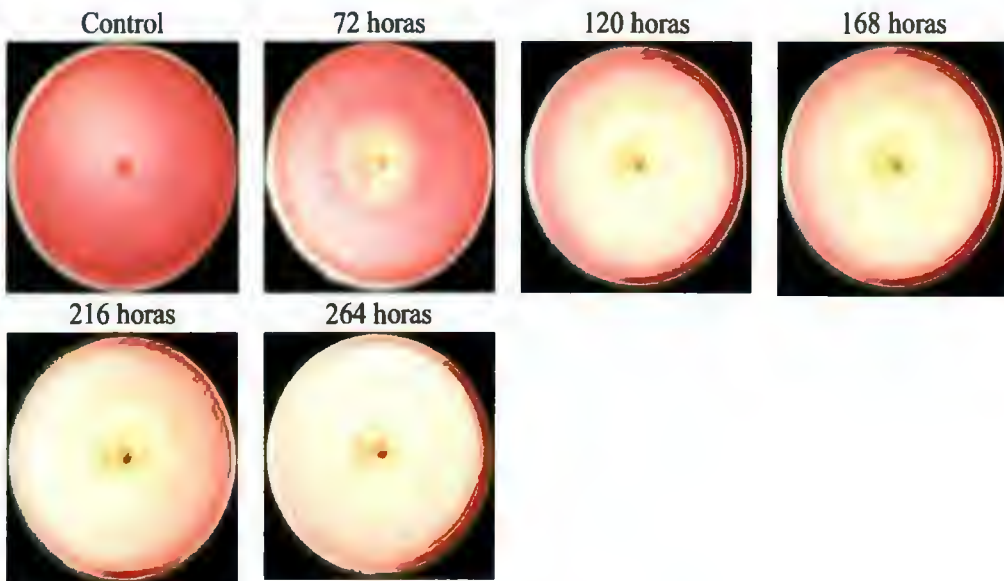


Figura A35. Secuencia de decoloración de la cepa LMBTM5 en medios sólidos conteniendo tintes azoicos

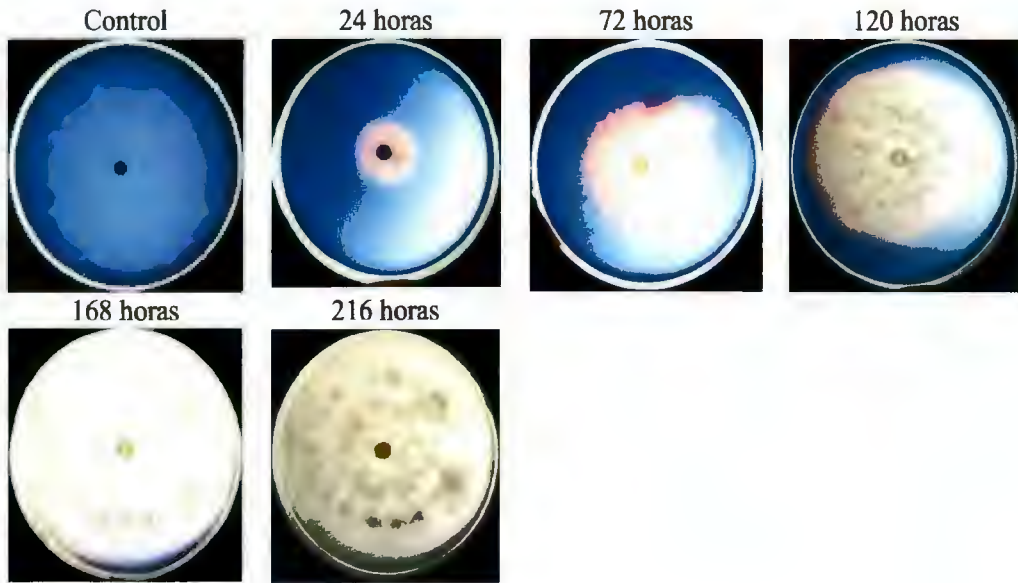
Tinte: Azul Brillante



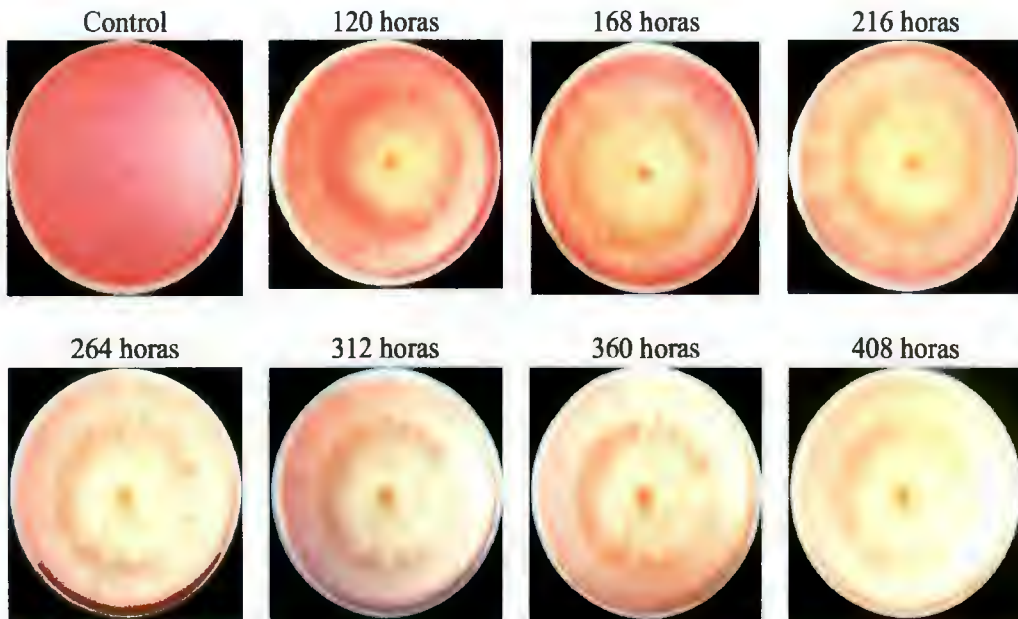
Tinte: Levafix Rojo



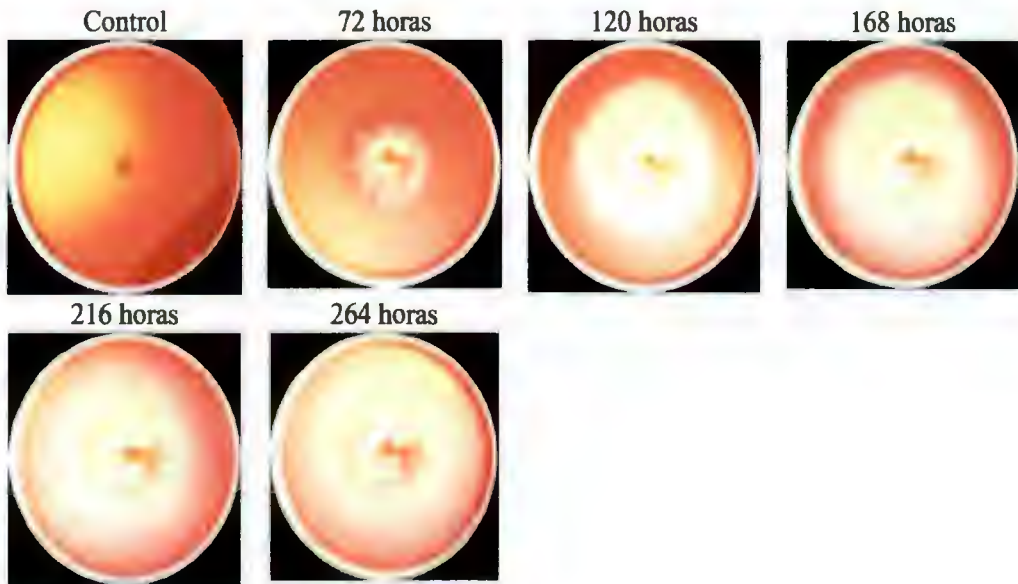
Tinte: Remazol Negro



Tinte: Remazol Rojo



Tinte: Rojo Profundo



Tinte: Synozol Turquesa

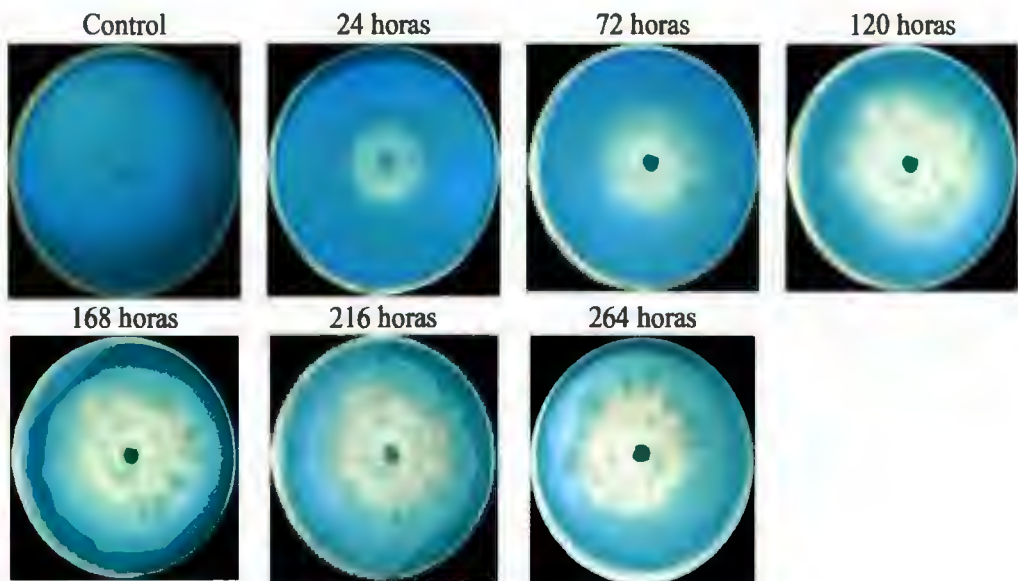


Figura A36. Secuencia de decoloración de la cepa LMBU6 en medios sólidos conteniendo tintes azoicos

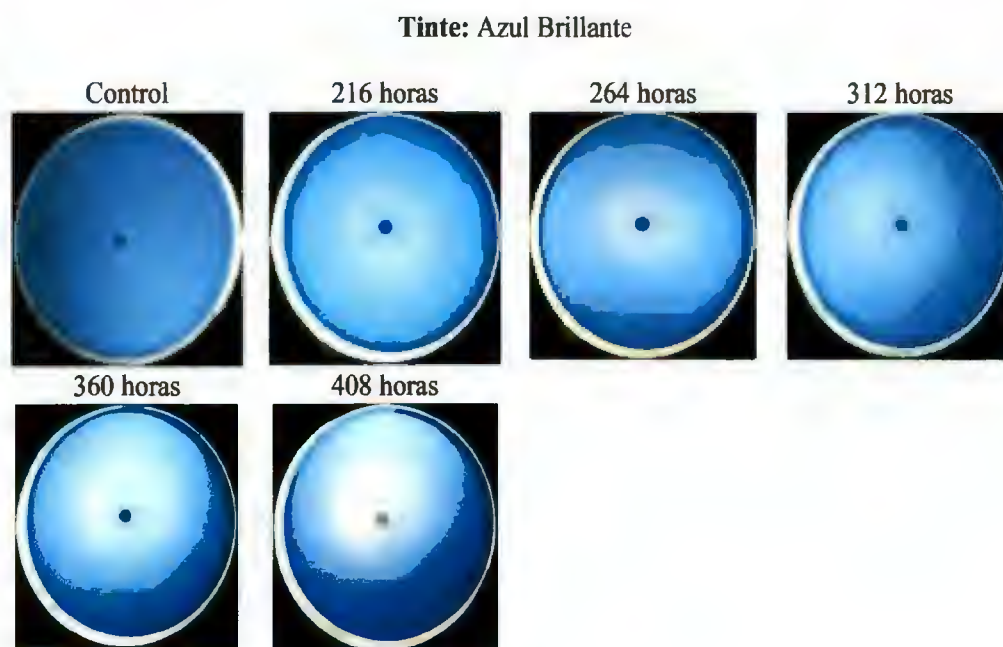
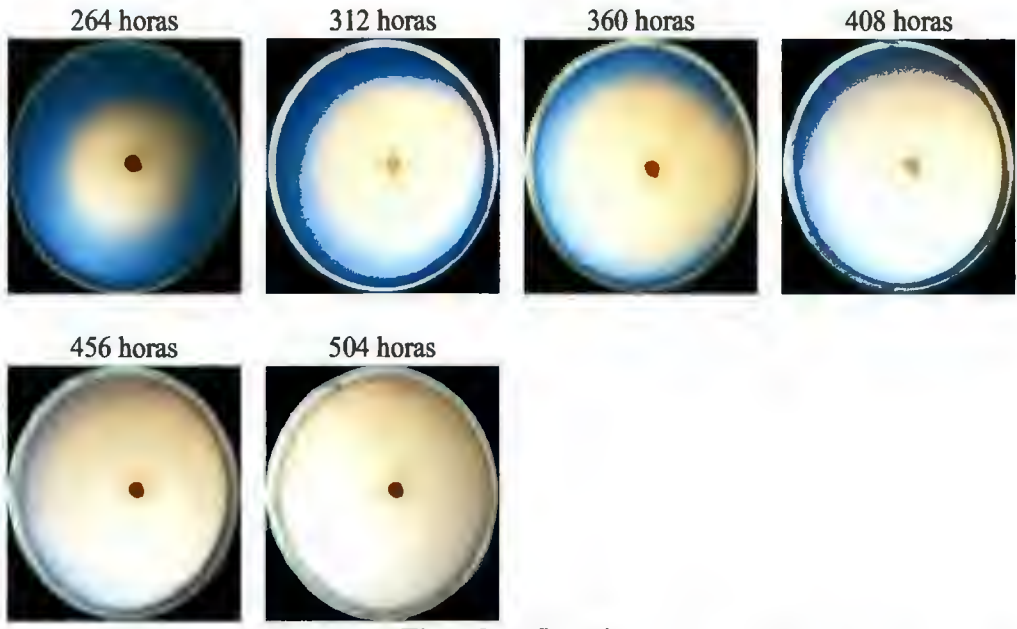
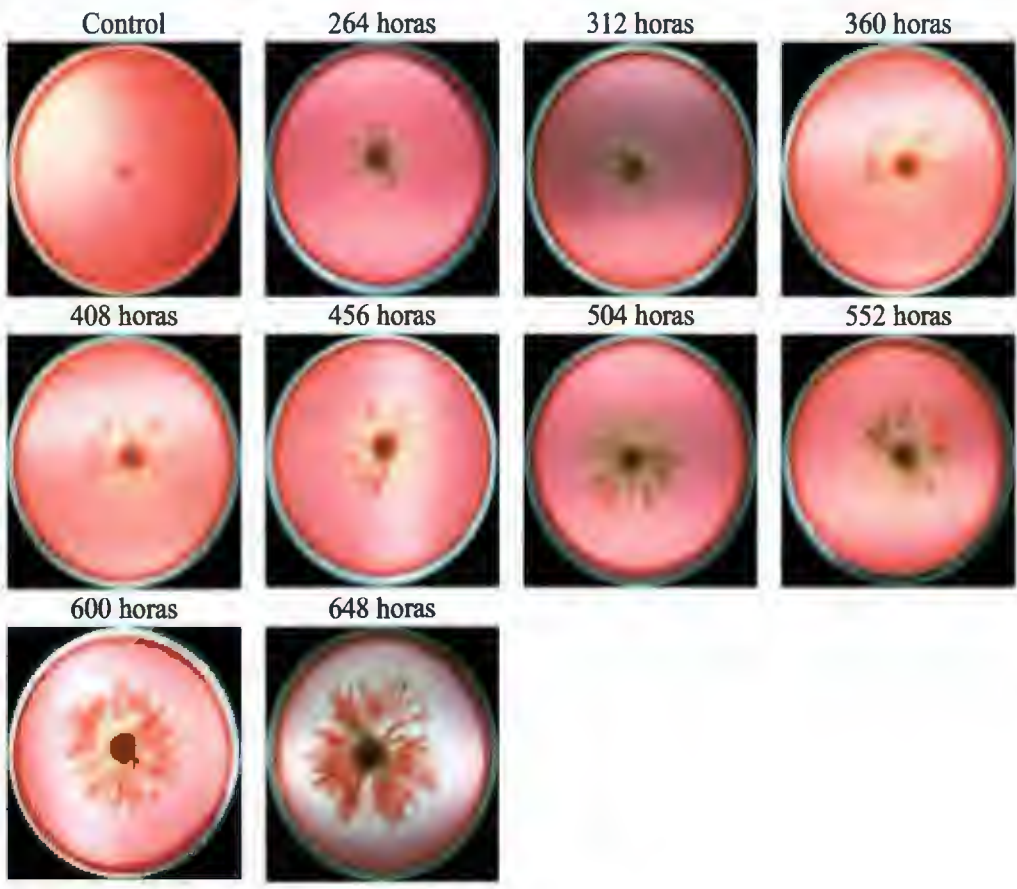


Figura A37. Tamizado de cepa BAS1

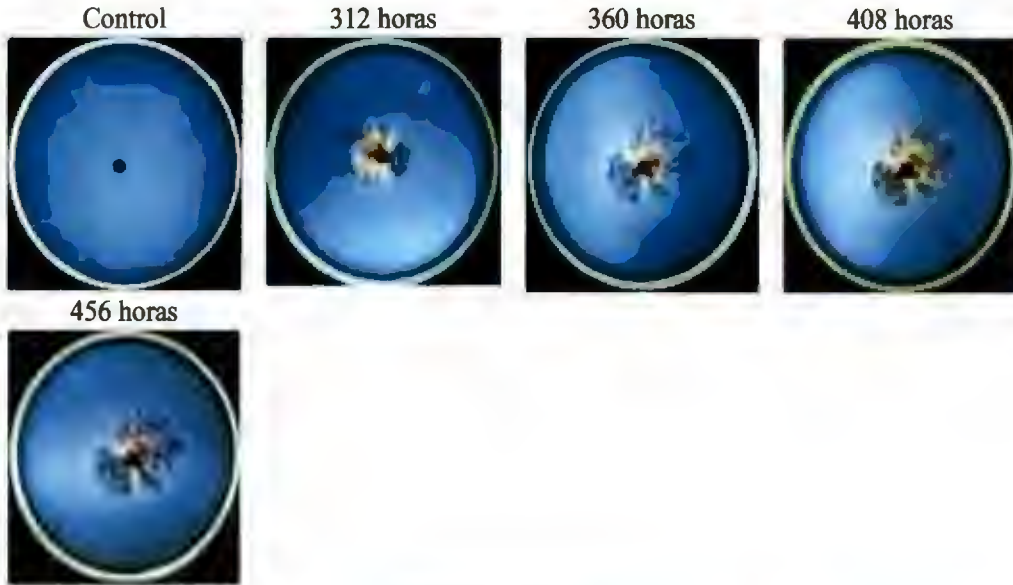




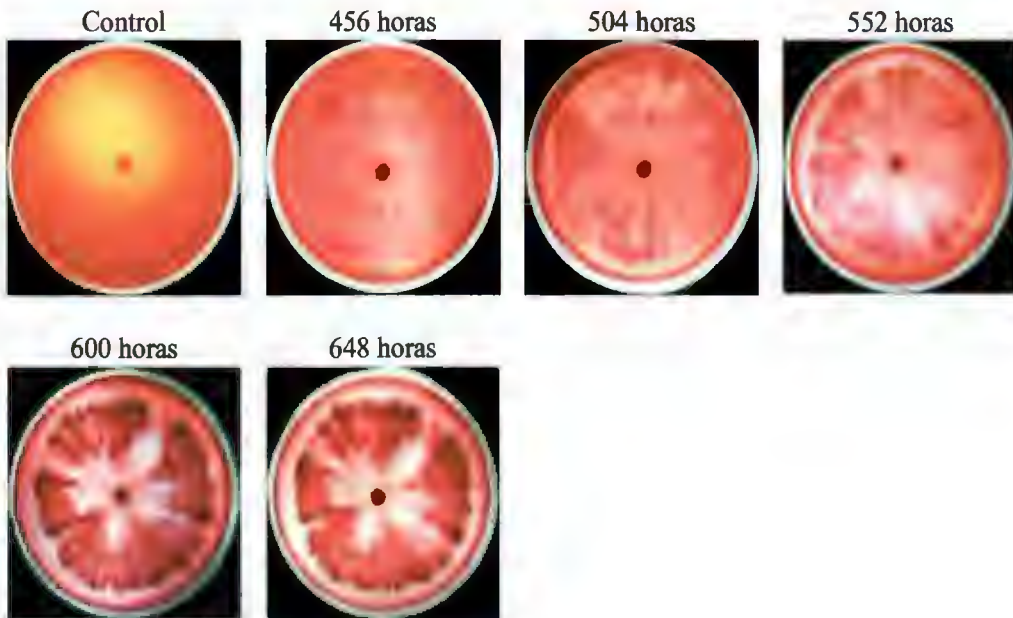
Tinte: Levafix Rojo



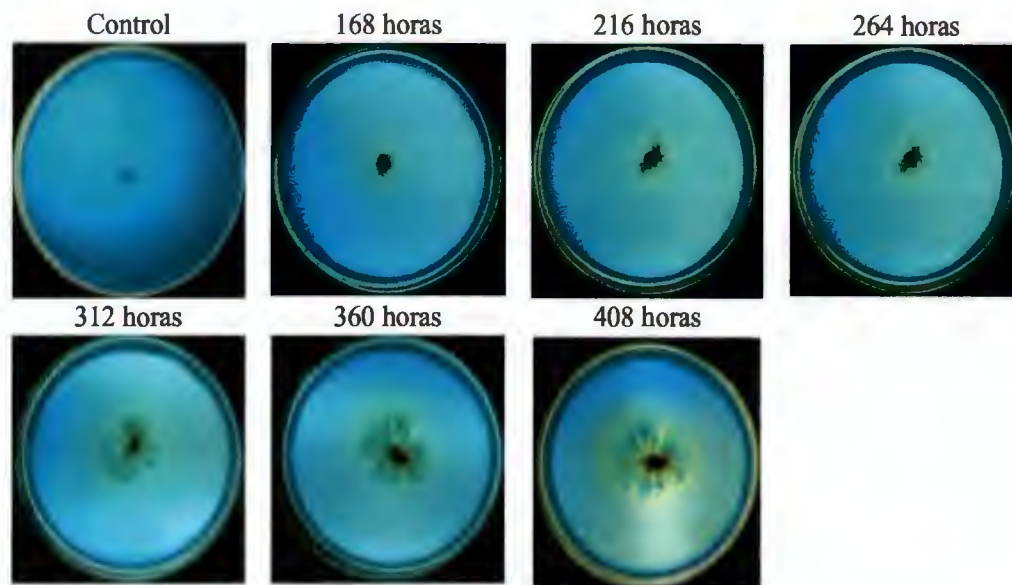
Tinte: Remazol Negro



Tinte: Rojo Profundo



Tinte: Synozol Turquesa



ANEXO 4. ESTANDARIZACIÓN DE PROTOCOLO DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE BASIDIOMICETOS

Tabla A1. Biomasa adherida al soporte de biopelícula (g/L) correspondiente a la cinética de crecimiento de LMBTM1 y LMBTM5 en tela de poliéster y malla de metal

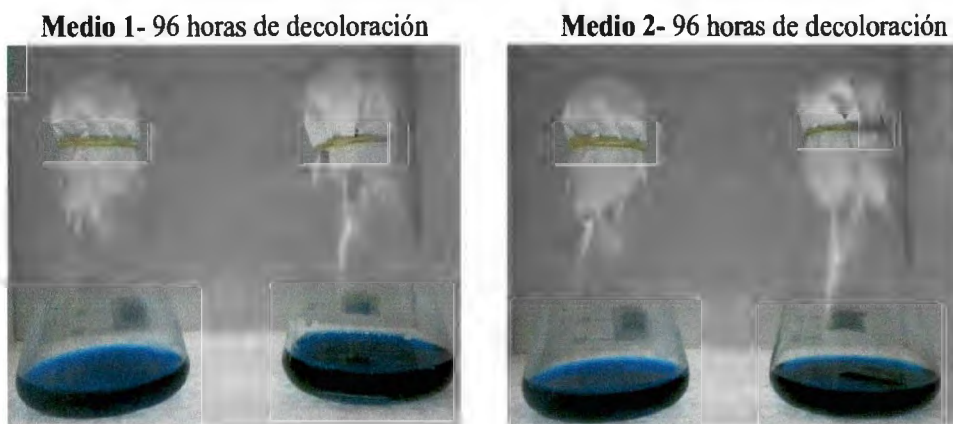
Cepa	Soporte sólido	Biomasa de biopelícula adherida al soporte (g/L)						
		8 horas	16 horas	24 horas	36 horas	48 horas	60 horas	72 horas
LMBTM 1	Tela de Poliéster	0.049 ± 0.012	0.109 ± 0.015	0.157 ± 0.014	0.267 ± 0.025	0.449 ± 0.056	0.629 ± 0.046	0.817 ± 0.055
	Malla de metal	0.047 ± 0.009	0.107 ± 0.014	0.153 ± 0.011	0.259 ± 0.008	0.430 ± 0.045	0.590 ± 0.013	0.801 ± 0.025
LMBTM 5	Tela de Poliéster	0.051 ± 0.004	0.105 ± 0.019	0.311 ± 0.083	0.655 ± 0.054	0.987 ± 0.090	1.355 ± 0.118	1.872 ± 0.097
	Malla de metal	0.044 ± 0.006	0.106 ± 0.007	0.238 ± 0.015	0.526 ± 0.142	0.848 ± 0.052	1.218 ± 0.116	1.682 ± 0.105

Tabla A2. Peso seco del inóculo empleado en la cinética de crecimiento.

Cepa	Soporte	Inóculo (g)						
		8 horas	16 horas	24 horas	36 horas	48 horas	60 horas	72 horas
LMBTM1	Tela de Poliéster	0.0293 ±0.0013	0.0293 ±0.0013	0.0293 ±0.0013	0.0300 ±0.0019	0.0293 ±0.0013	0.0293 ±0.0013	0.0308 ±0.0006
	Malla de Metal	0.0303 ±0.0021	0.0303 ±0.0021	0.0303 ±0.0021	0.0303 ±0.0021	0.0303 ±0.0021	0.0303 ±0.0021	0.0303 ±0.0021
LMBTM5	Tela de Poliéster	0.0238 ±0.0011	0.0232 ±0.0006	0.0229 ±0.0001	0.0238 ±0.0011	0.0238 ±0.0011	0.0238 ±0.0011	0.0238 ±0.0011
	Malla de Metal	0.0229 ±0.0011	0.0231 ±0.0004	0.0227 ±0.0010	0.0234 ±0.0016	0.0237 ±0.0009	0.0244 ±0.0008	0.0244 ±0.0008

ANEXO 5. ESTANDARIZACIÓN DE MEDIO LÍQUIDO PARA PRUEBAS DE DECOLORACIÓN

Figura A38. Cinética de decoloración para estandarización del medio de cepa LMBTM1



Medio 3- 96 horas de decoloración



Figura A39. Cinética de decoloración para estandarización de medio de cepa LMBTM5

Medio 1

24 horas de decoloración



48 horas de decoloración



72 horas de decoloración



96 horas de decoloración



Medio 2

24 horas de decoloración



48 horas de decoloración



72 horas de decoloración



96 horas de decoloración



Medio 3

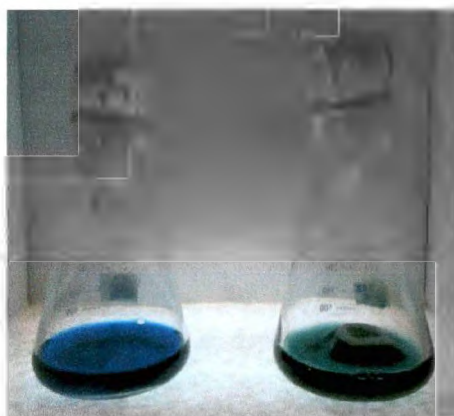
24 horas de decoloración



48 horas de decoloración



72 horas de decoloración



96 horas de decoloración

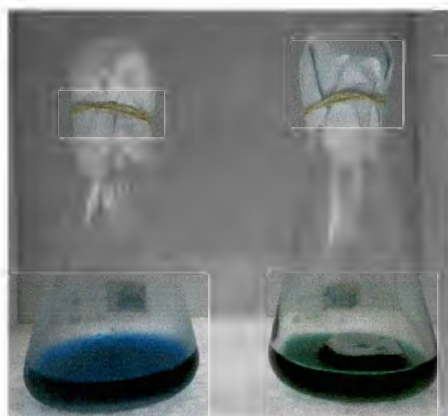


Tabla A3. Cinética de decoloración de biopelículas de LMBTM1 y LMBTM5 en medio 1, 2 y 3 conteniendo Azul Brillante y Synozol Turquesa

Cepa	Medio	Porcentaje de decoloración			
		24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
LMBTM1	Medio 1	15.13 ± 2.38	19.35 ± 2.26	27.26 ± 4.13	32.95 ± 2.21
	Medio 2	15.36 ± 1.93	22.17 ± 4.66	28.73 ± 2.88	33.82 ± 2.29
	Medio 3	15.26 ± 1.97	22.08 ± 4.70	28.81 ± 6.91	33.74 ± 2.27
LMBTM5	Medio 1	64.95 ± 3.79	65.70 ± 2.12	69.60 ± 1.34	74.35 ± 7.19
	Medio 2	58.02 ± 3.04	68.73 ± 5.82	74.72 ± 8.05	79.81 ± 3.09
	Medio 3	39.73 ± 6.96	63.33 ± 3.74	73.03 ± 5.14	90.37 ± 2.43

ANEXO 6. CINÉTICA DE DECOLORACIÓN DE TINTES AZOICOS

Figura A40. Cinética de decoloración de cepa LMBTM1 en medio líquido



Tinte Levafix Rojo

Biopelícula de 48 horas de crecimiento
96 horas de decoloración



Biopelícula de 72 horas de crecimiento
96 horas de decoloración



Tinte: Remazol Rojo

Biopelícula de 48 horas de crecimiento
96 horas de decoloración



Biopelícula de 72 horas de crecimiento
96 horas de decoloración



Tinte Rojo Profundo

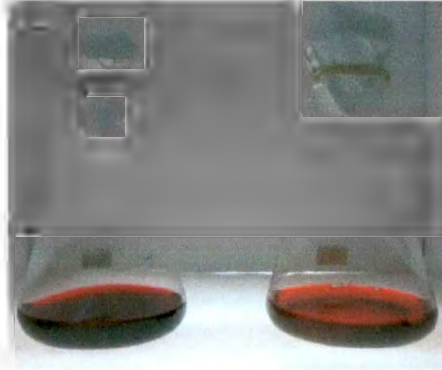
Biopelícula de 48 horas de crecimiento

96 horas de decoloración



Biopelícula de 72 horas de crecimiento

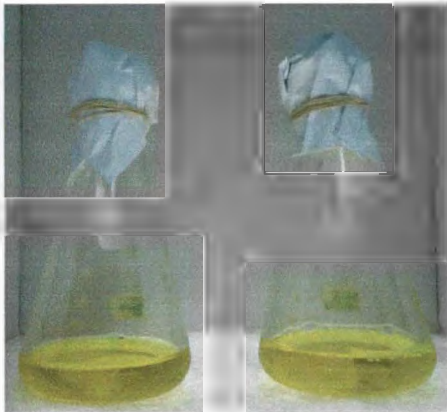
96 horas de decoloración



Tinte Synozol Amarillo

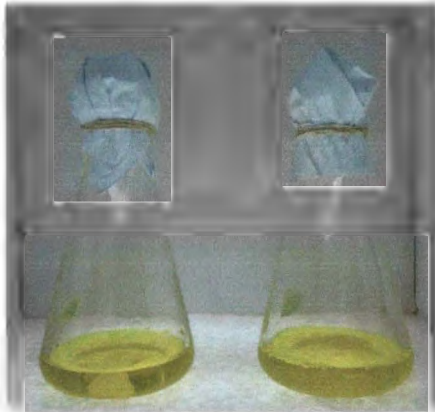
Biopelícula de 48 horas de crecimiento

96 horas de decoloración



Biopelícula de 72 horas de crecimiento

96 horas de decoloración



Tinte Synozol Turquesa

Biopelícula de 48 horas de crecimiento
96 horas de decoloración



Biopelícula de 72 horas de crecimiento
96 horas de decoloración



Figura A41. Cinética de decoloración de LMBTM5 en medio líquido conteniendo:

Tinte Azul Brillante

Biopelícula de 48 horas de crecimiento

24 horas de decoloración



48 horas de decoloración



72 horas de decoloración



96 horas de decoloración



Biopelícula de 72 horas de crecimiento

24 horas de decoloración



48 horas de decoloración



72 horas de decoloración



96 horas de decoloración



Tinte Levafix Amarillo

Biopelícula de 48 horas de crecimiento

96 horas de decoloración



Biopelícula de 72 horas de crecimiento

96 horas de decoloración



Tinte Levafix Rojo

Biopelícula de 48 horas de crecimiento

96 horas de decoloración



Biopelícula de 72 horas de crecimiento

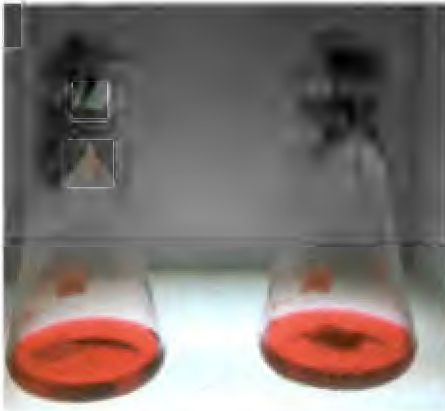
96 horas de decoloración



Tinte Remazol Rojo

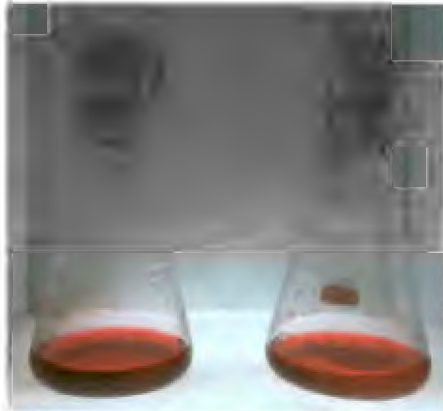
Biopelícula de 48 horas de crecimiento

96 horas de decoloración



Biopelícula de 72 horas de crecimiento

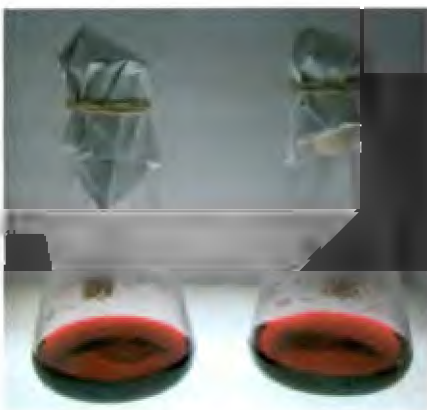
96 horas de decoloración



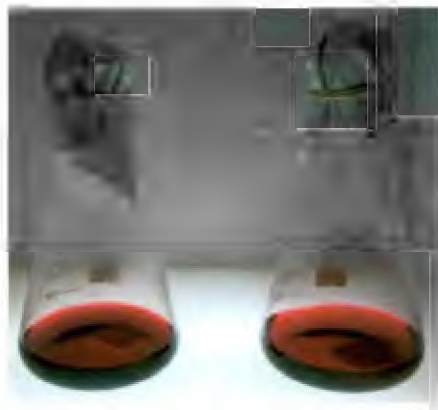
Tinte Rojo Profundo

Biopelícula de 48 horas de crecimiento

24 horas de decoloración



48 horas de decoloración



72 horas de decoloración



96 horas de decoloración



Biopelícula de 72 horas de crecimiento

24 horas de decoloración



48 horas de decoloración



72 horas de decoloración



96 horas de decoloración



Tinte Synozol Amarillo

Biopelícula de 48 horas de crecimiento

96 horas de decoloración



Biopelícula de 48 horas de crecimiento

96 horas de decoloración



Tinte Synozol Turquesa

Biopelícula de 48 horas de crecimiento

24 horas de decoloración



48 horas de decoloración



72 horas de decoloración



96 horas de decoloración

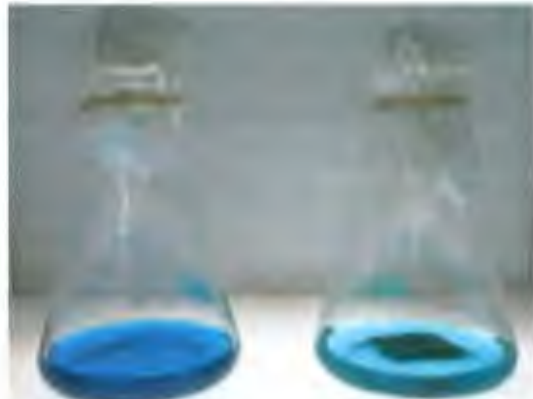


Biopelícula de 72 horas de crecimiento

0 horas de decoloración



24 horas de decoloración



48 horas de decoloración



72 horas de decoloración



Figura A42. Decoloración espontánea de Remazol negro en medio de decoloración.

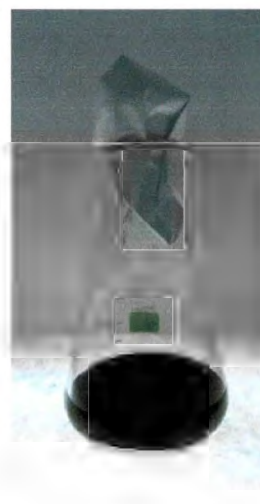
0 horas de decoloración



24 horas de decoloración



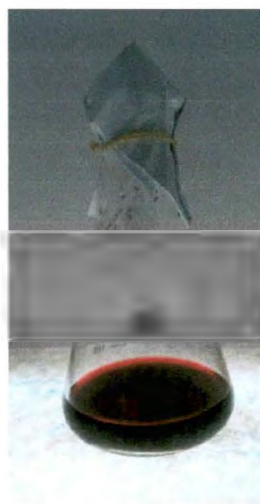
48 horas de decoloración



72 horas de decoloración



96 horas de decoloración



ANEXO 7. CINÉTICA DE DECOLORACIÓN DE EFLUENTES

Figura A43. Cinética de decoloración de LMBTM1 con efluentes simulados.

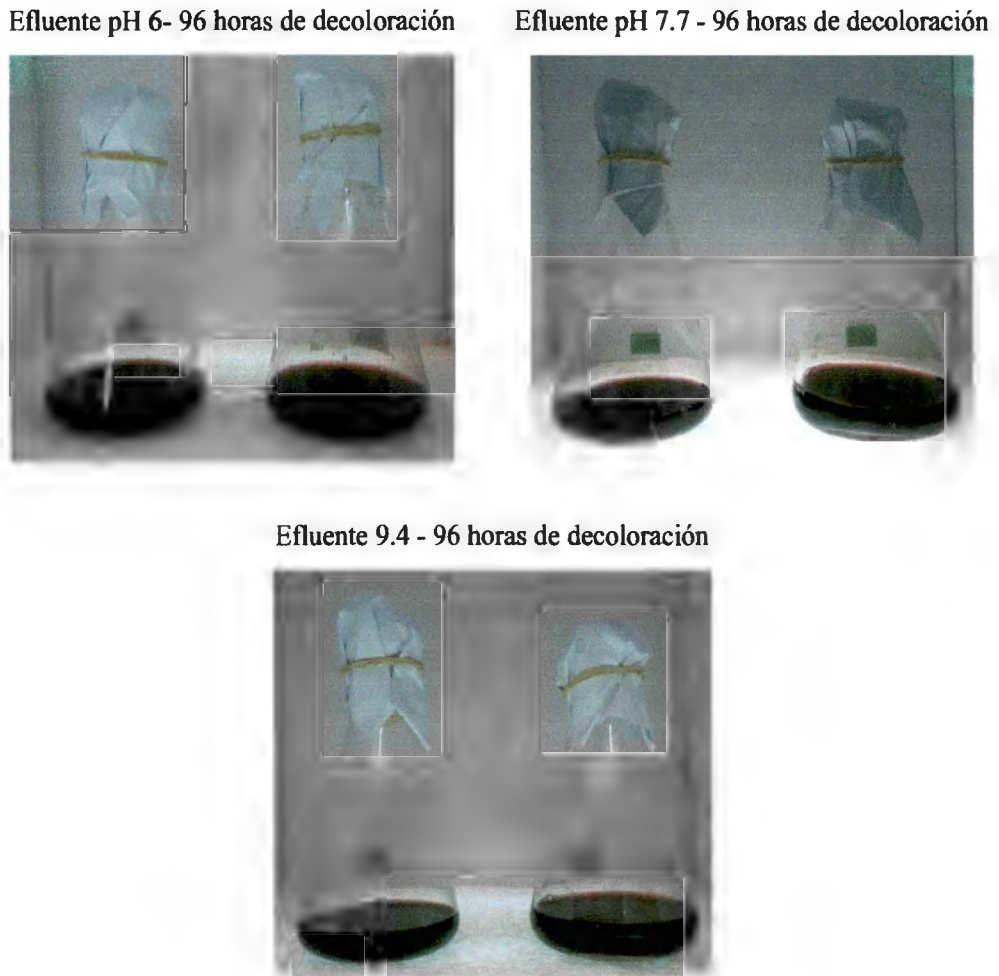


Figura A44. Cinética de decoloración de LMBTMI conefluentes simulados.

Efluente pH 6- 96 horas de decoloración



Efluente pH 7.7 - 96 horas de decoloración



Efluente 9.4 - 96 horas de decoloración



Figura A45. Cinética de decoloración de LMBTM1 del efluente real.

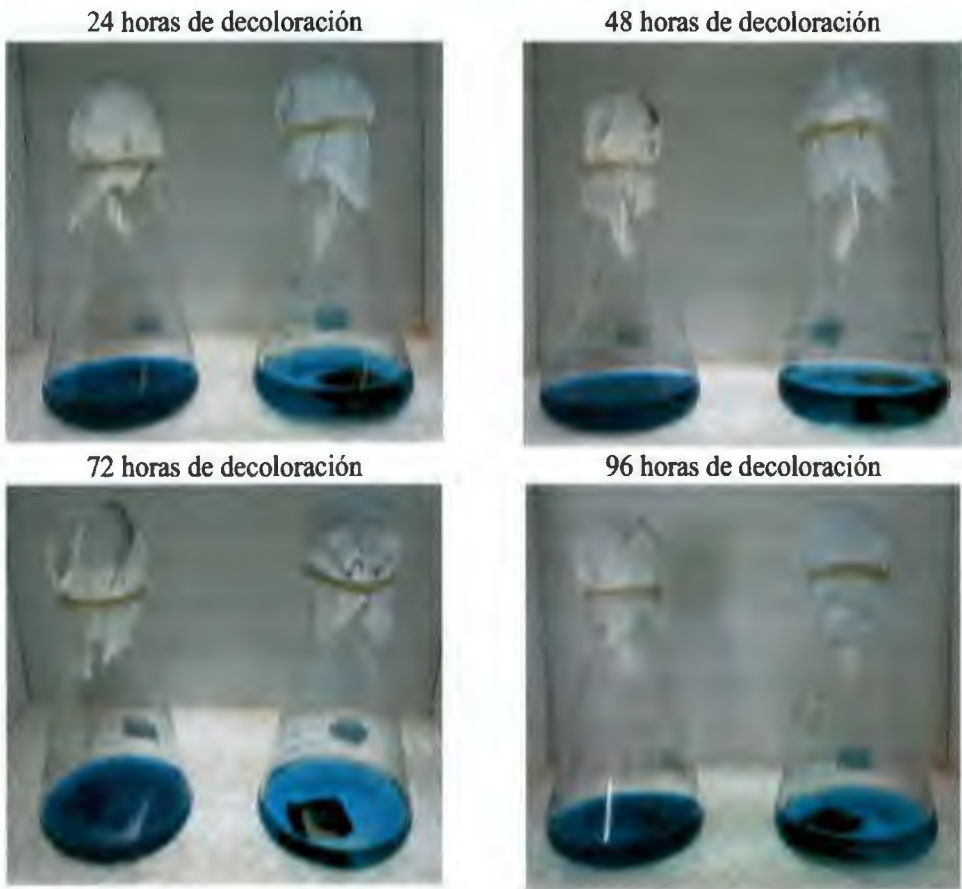
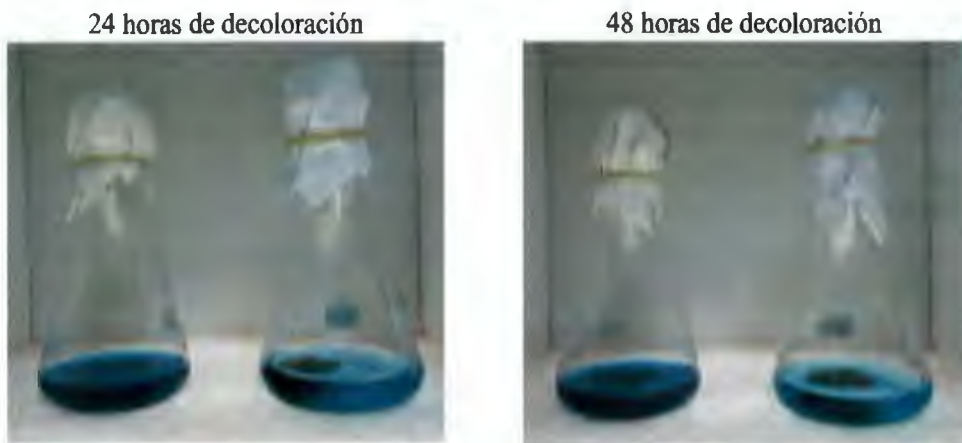
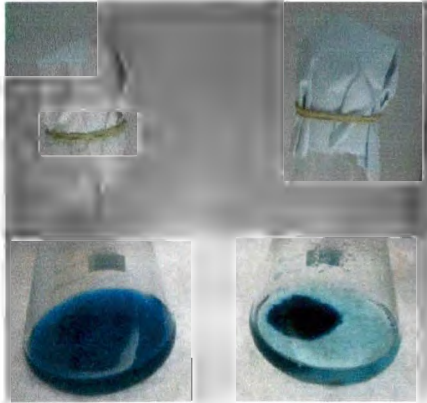


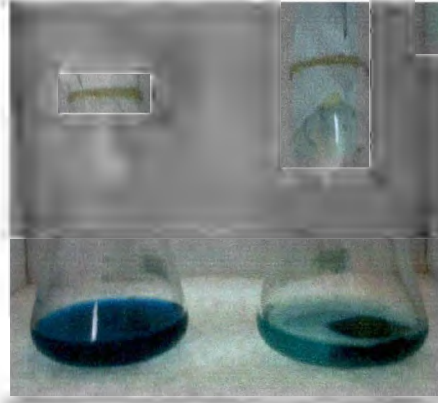
Figura A46. Cinética de decoloración de LMBTM5 del efluente real.



72 horas de decoloración



96 horas de decoloración



ANEXO 8. ESPECTROS DE ABSORCIÓN DE ESTANDARIZACIÓN DE MEDIO DE DECOLORACIÓN

Figura A47. Espectros de absorción de los controles de los medios 1, 2 y 3 de decoloración.

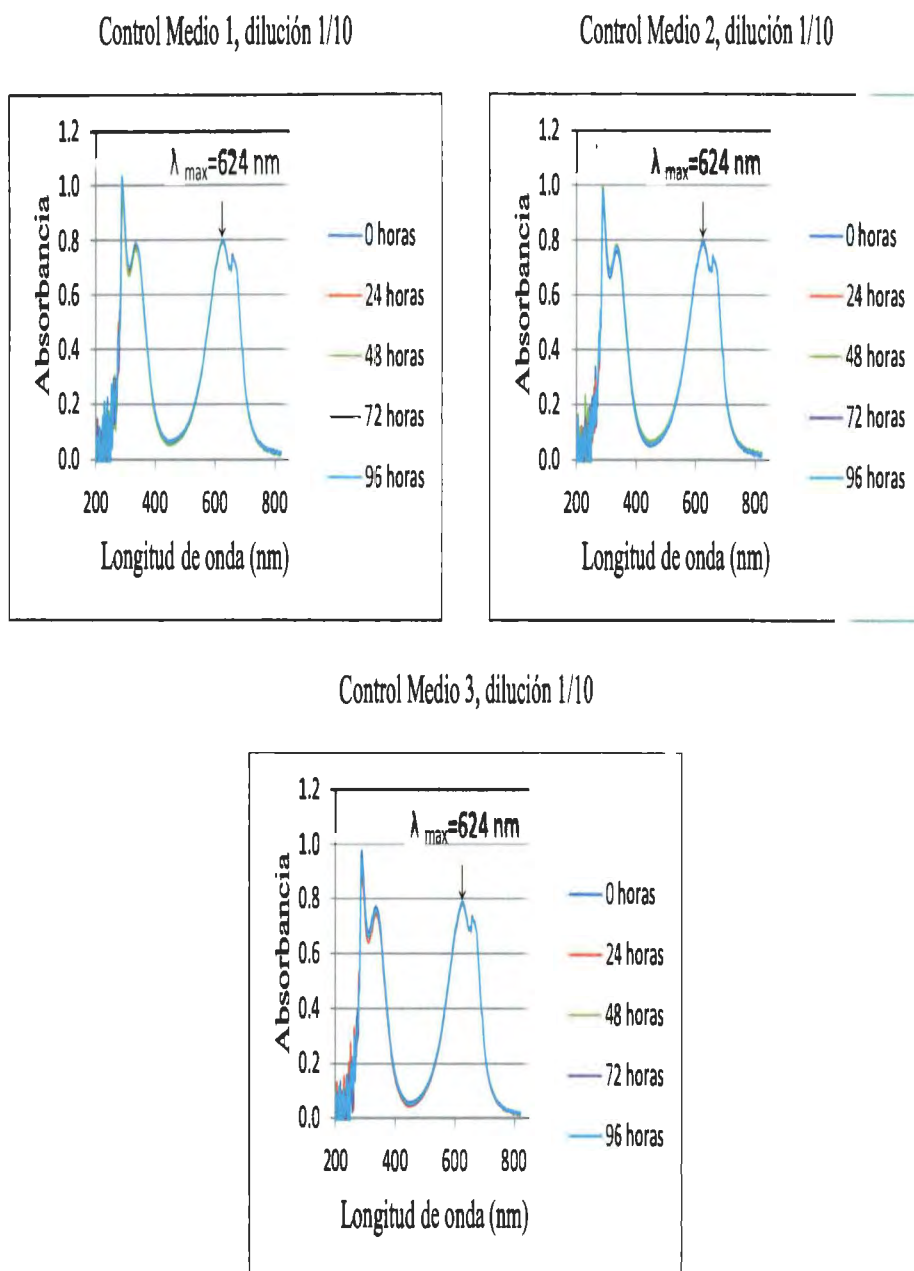


Figura A48. Espectros de absorción de decoloración de LMBTM1 de los medios 1,2 y 3

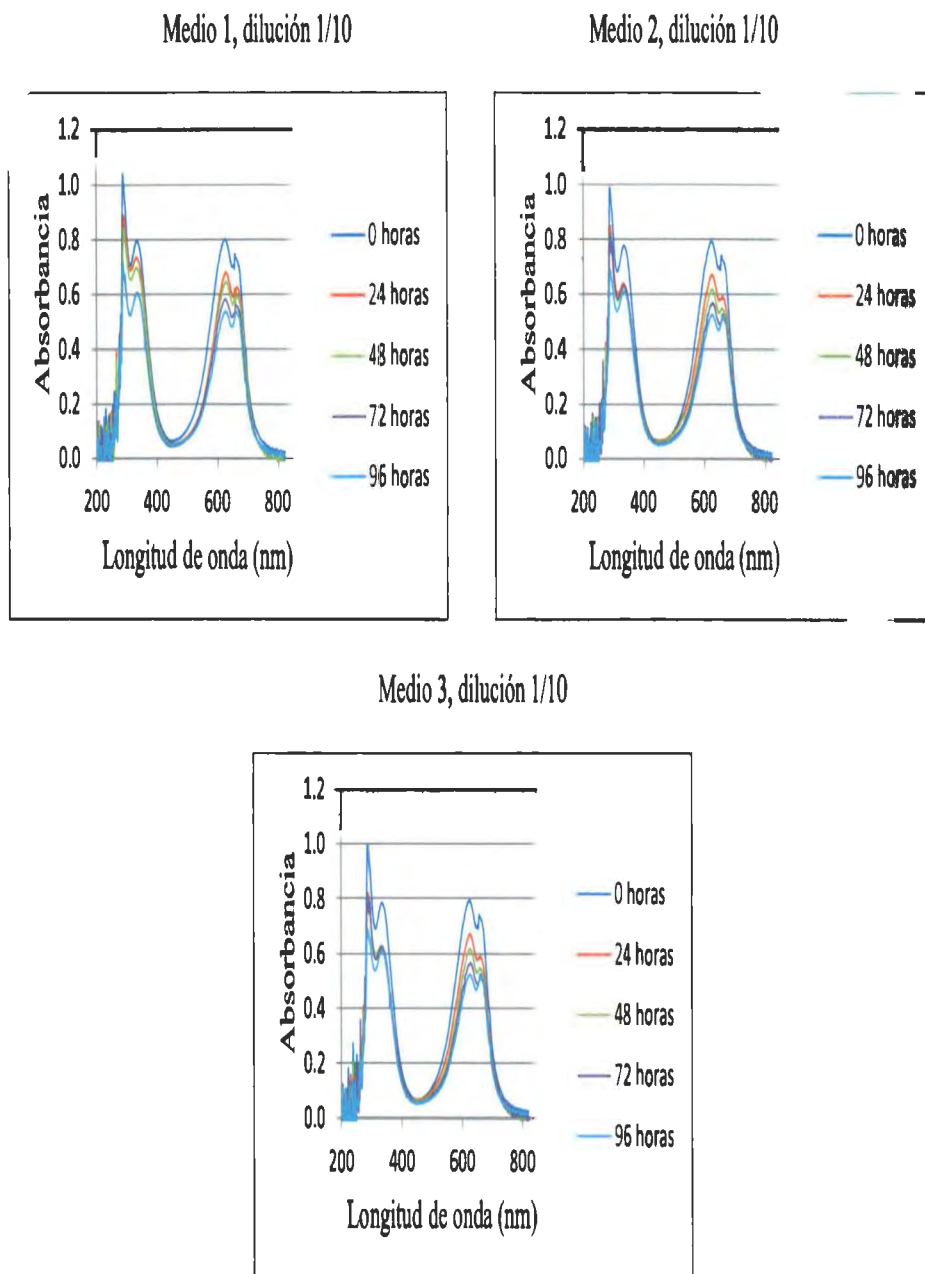
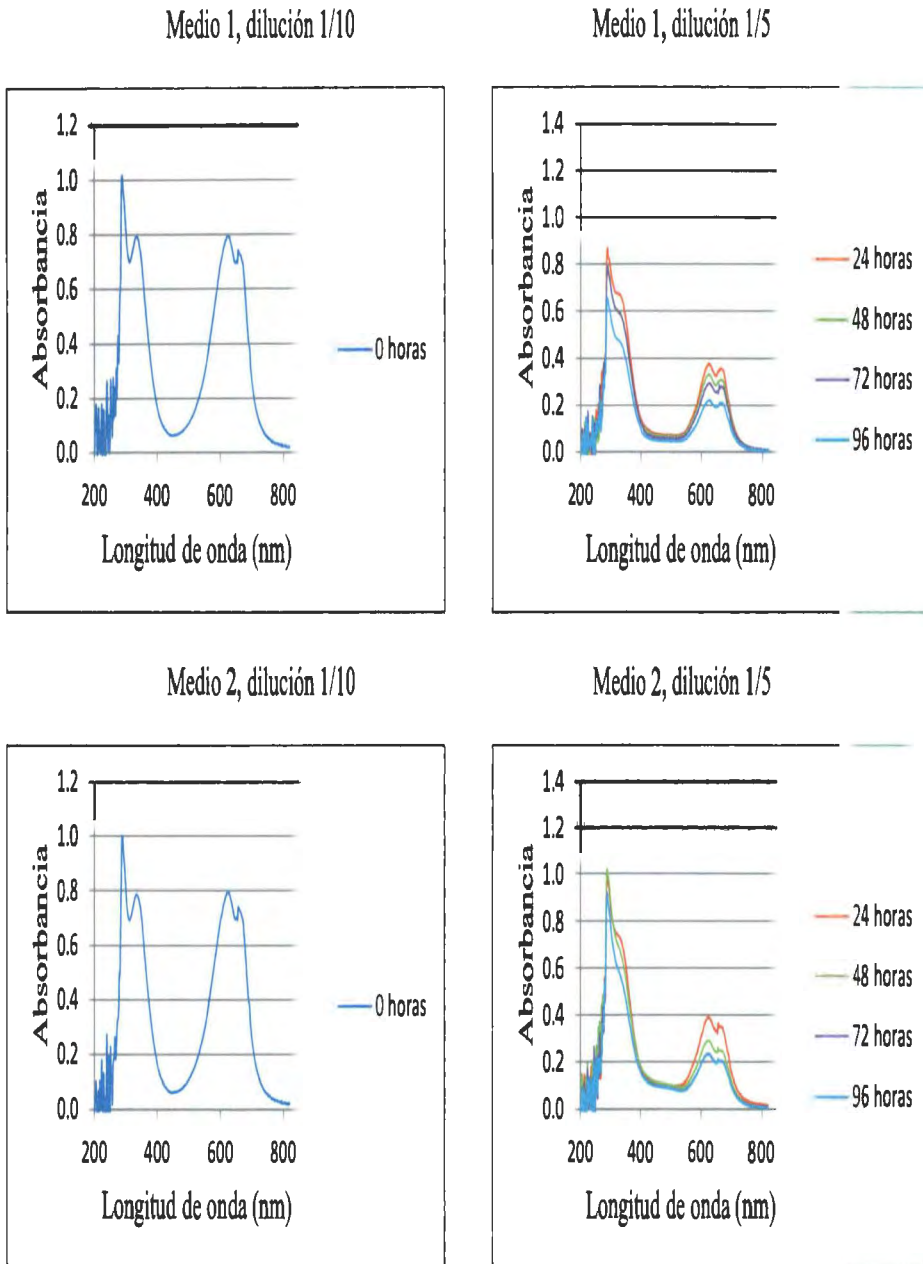
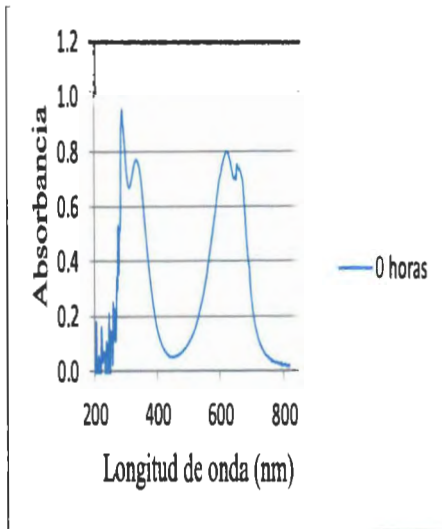


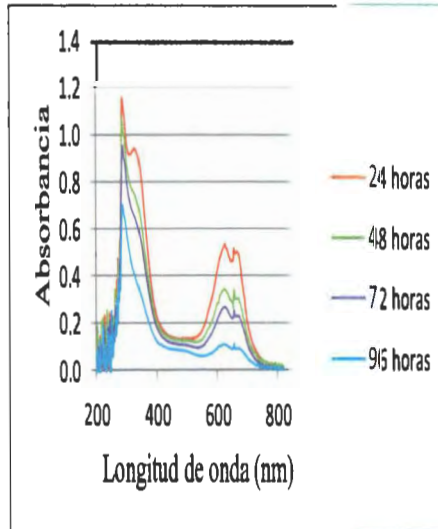
Figura A49. Espectros de absorción de decoloración de LMBTMS de los medios 1,2 y 3



Medio 3, dilución 1/10

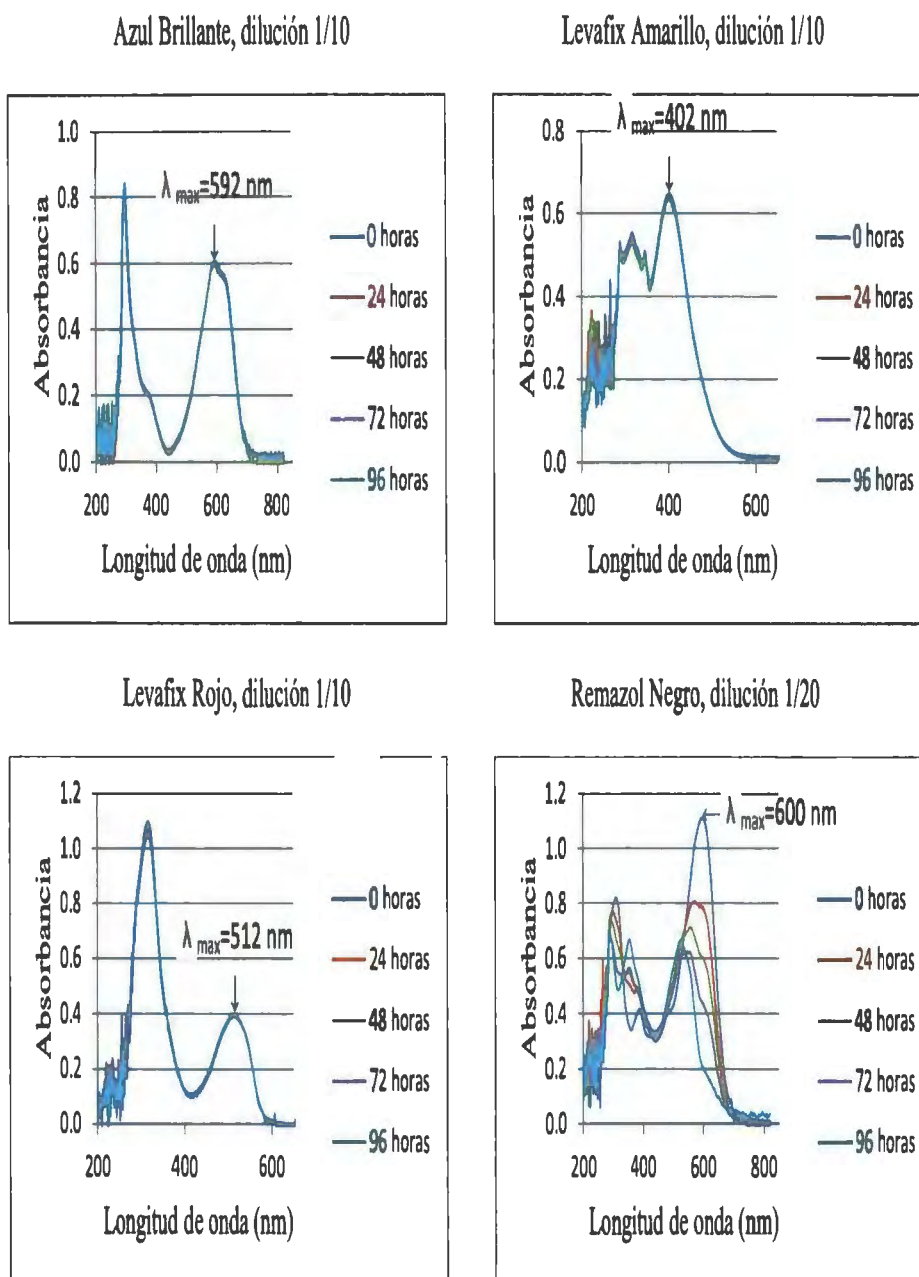


Medio 3, dilución 1/5

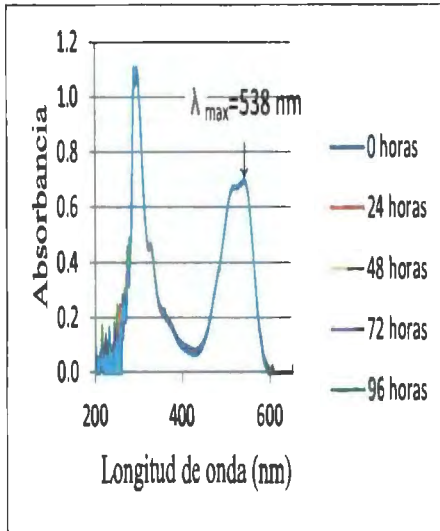


ANEXO 9. ESPECTROS DE ABSORCIÓN DE CINÉTICA DE DECOLORACIÓN DE TINTES AZOICOS

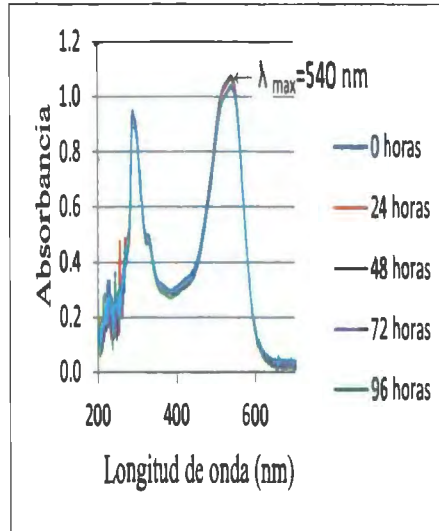
Figura A50. Espectros de absorción de los controles de cinética de decoloración.



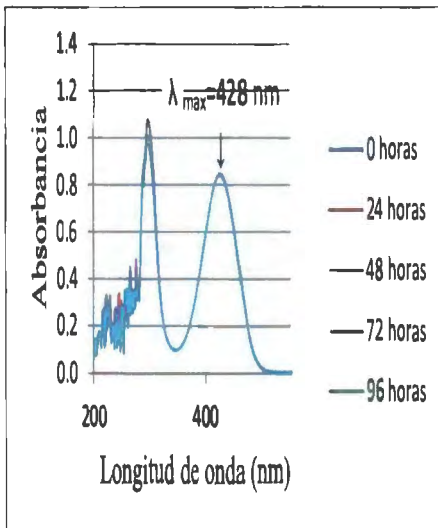
Remazol Rojo, dilución 1/10



Rojo Profundo, dilución 1/20



Synozol Amarillo, dilución 1/10



Synozol Turquesa, dilución 1/10

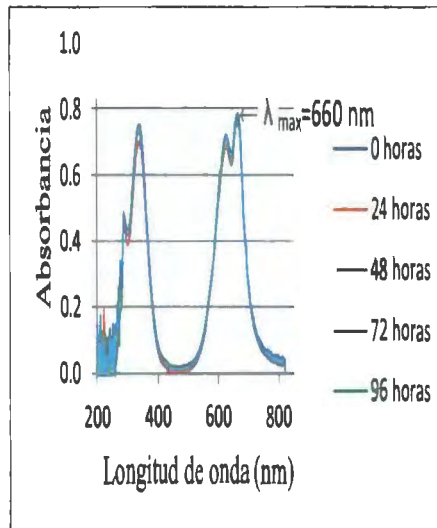
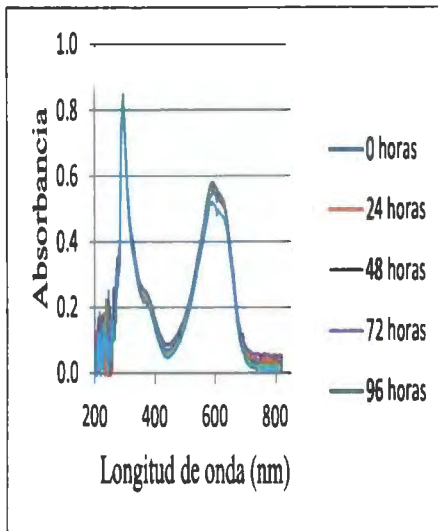
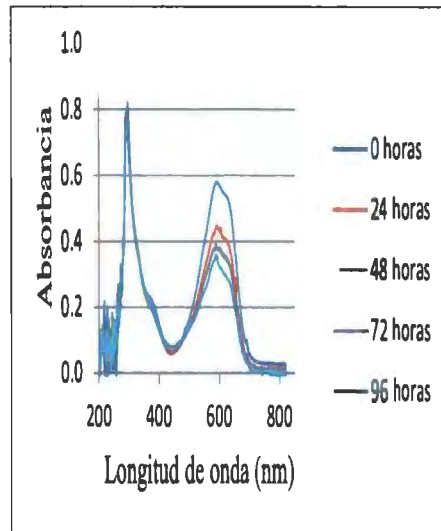


Figura A51. Cinética de decoloración de Azul Brillante.

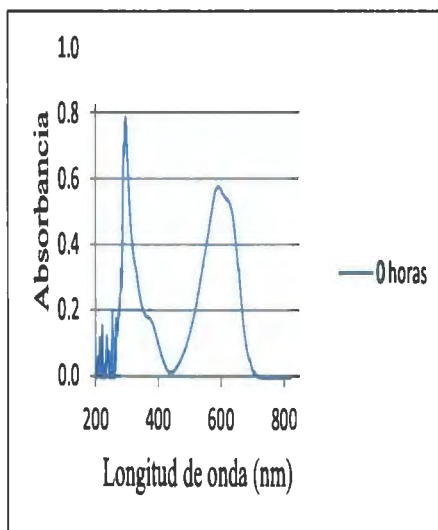
LMBTM1 de 48 horas de crecimiento, dilución 1/10



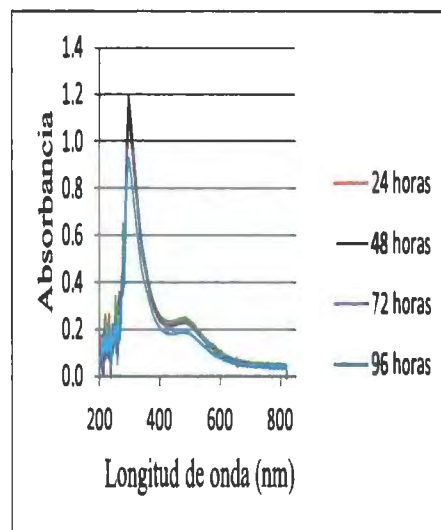
LMBTM1 de 72 horas de crecimiento, dilución 1/10



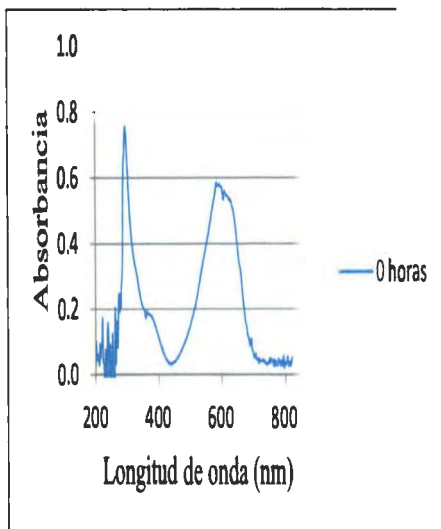
LMBTM5 de 48 horas de crecimiento, dilución 1/10



LMBTM5 de 48 horas de crecimiento, dilución 1/5



LMBTM5 de 72 horas de crecimiento, dilución 1/10



LMBTM5 de 72 horas de crecimiento, dilución 1/5

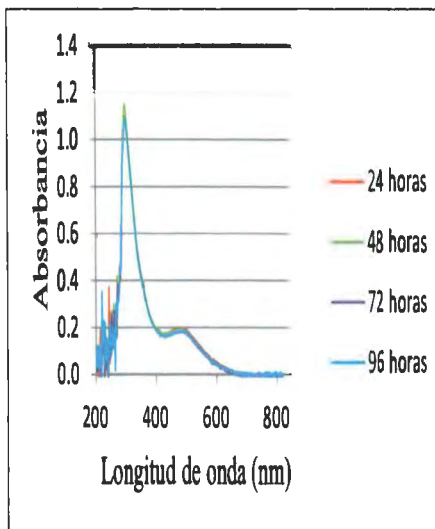
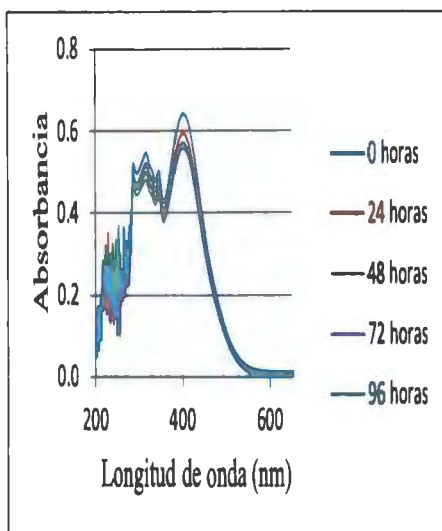
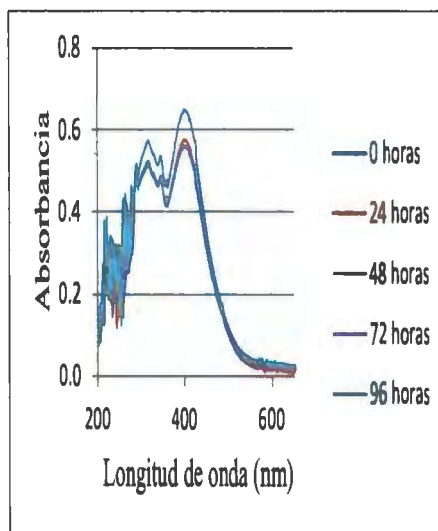


Figura A52. Cinética de decoloración de Levafix Amarillo.

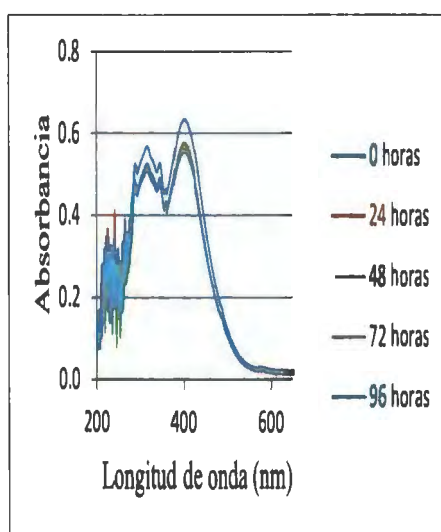
LMBTM1 de 48 horas de crecimiento, dilución 1/10



LMBTM1 de 72 horas de crecimiento, dilución 1/10



LMBTM5 de 48 horas de crecimiento, dilución 1/10



LMBTM5 de 72 horas de crecimiento, dilución 1/10

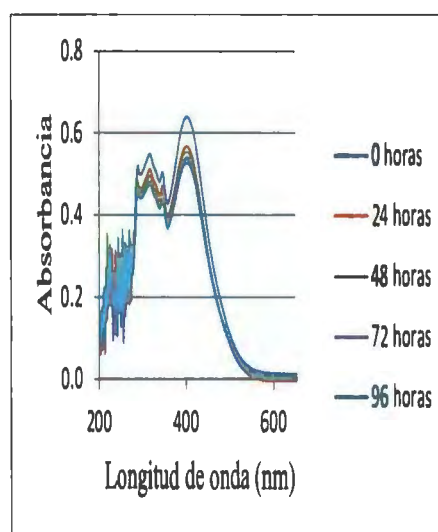
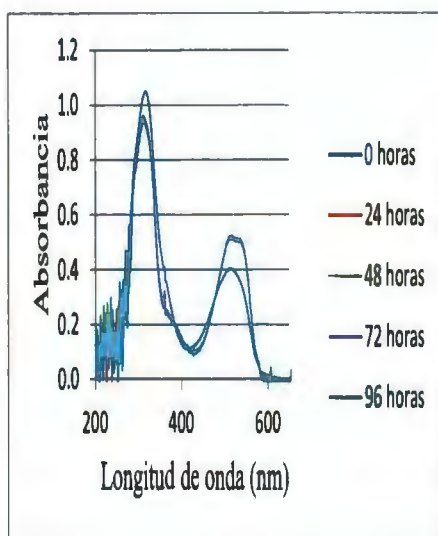
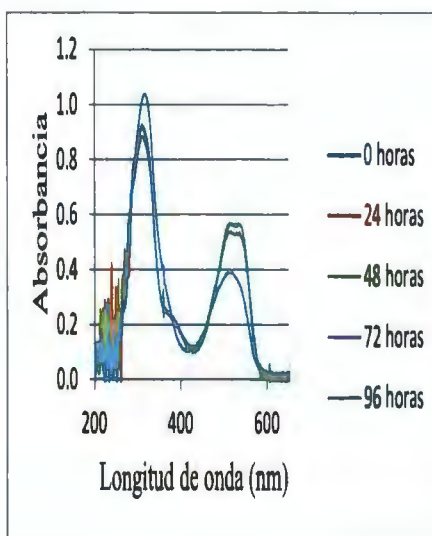


Figura A53. Cinética de decoloración de Levafix Rojo.

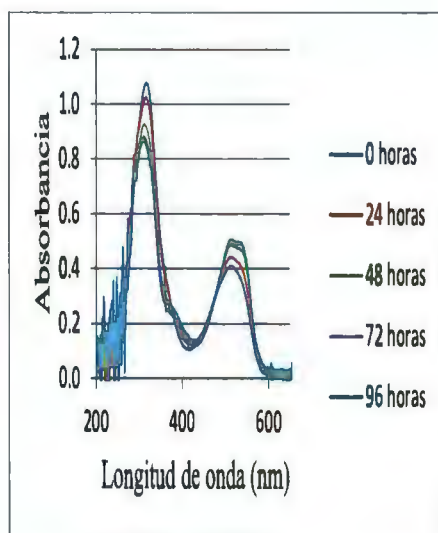
LMBTM1 de 48 horas de crecimiento, dilución 1/10



LMBTM1 de 72 horas de crecimiento, dilución 1/10



LMBTM5 de 48 horas de crecimiento, dilución 1/10



LMBTM5 de 72 horas de crecimiento, dilución 1/10

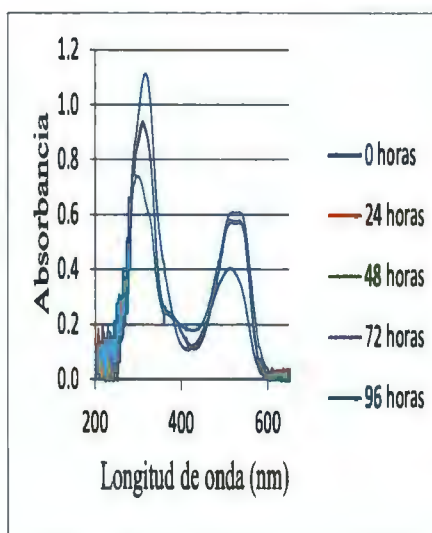
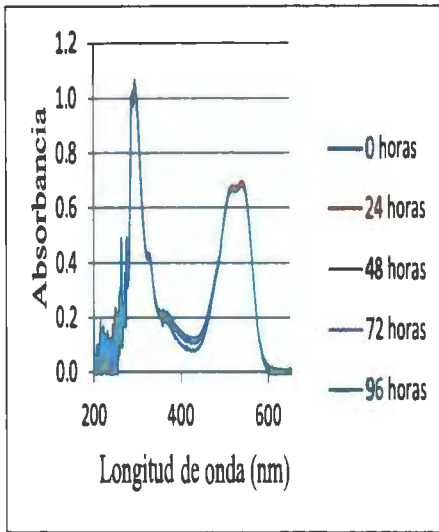
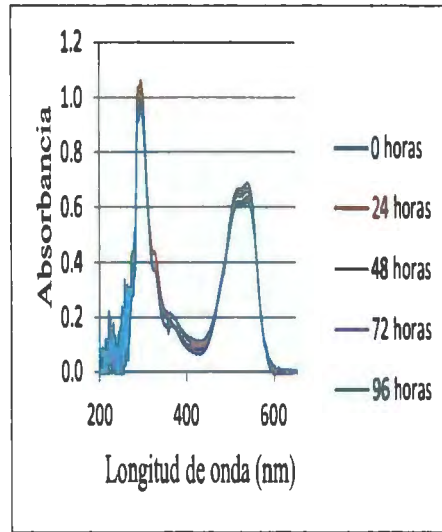


Figura A54. Cinética de decoloración de Remazol Rojo.

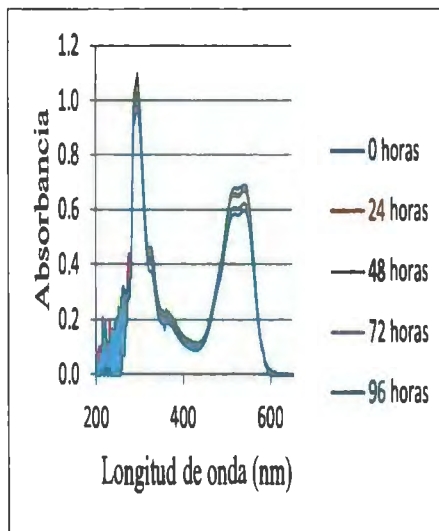
LMBTM1 de 48 horas de crecimiento, dilución 1/10



LMBTM1 de 72 horas de crecimiento, dilución 1/10



LMBTM5 de 48 horas de crecimiento, dilución 1/10



LMBTM5 de 72 horas de crecimiento, dilución 1/10

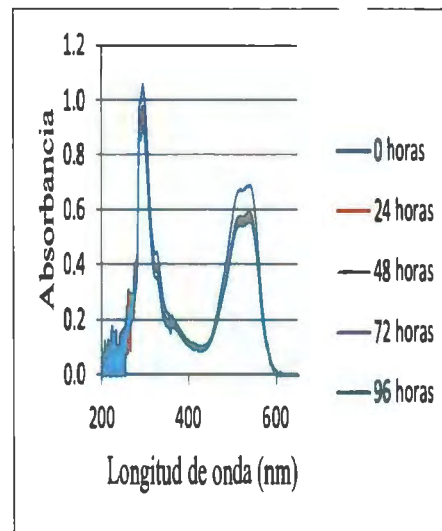
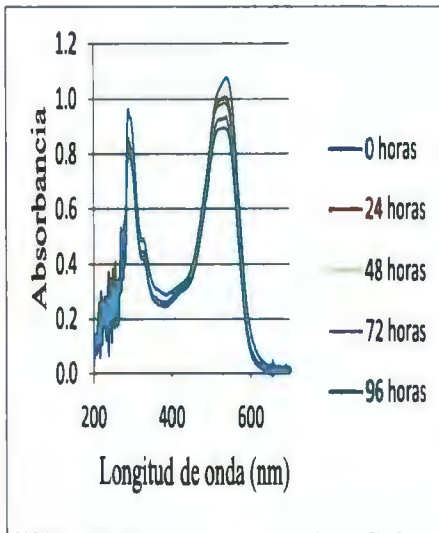
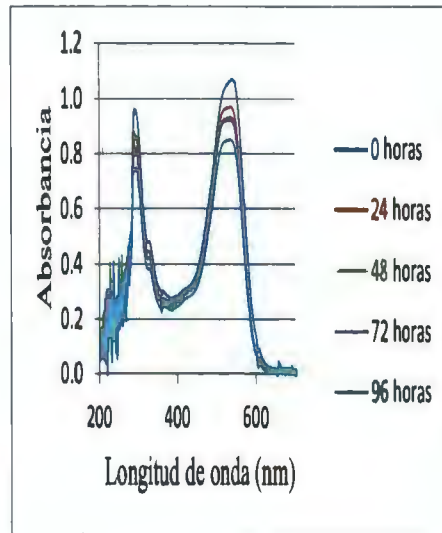


Figura A55. Cinética de decoloración de Rojo Profundo.

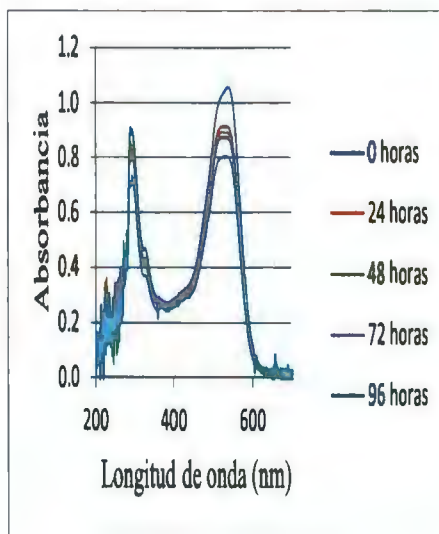
LMBTM1 de 48 horas de crecimiento, dilución 1/20



LMBTM1 de 72 horas de crecimiento, dilución 1/20



LMBTM5 de 48 horas de crecimiento, dilución 1/20



LMBTM5 de 72 horas de crecimiento, dilución 1/20

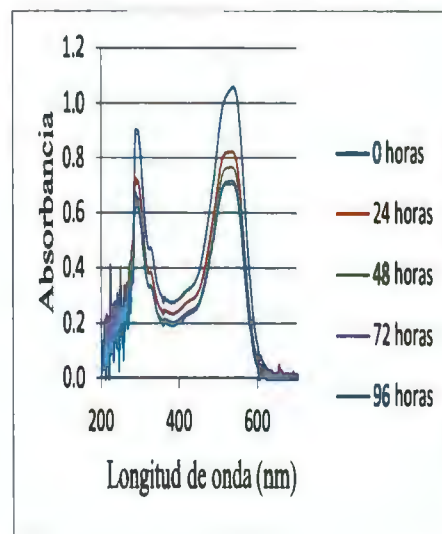
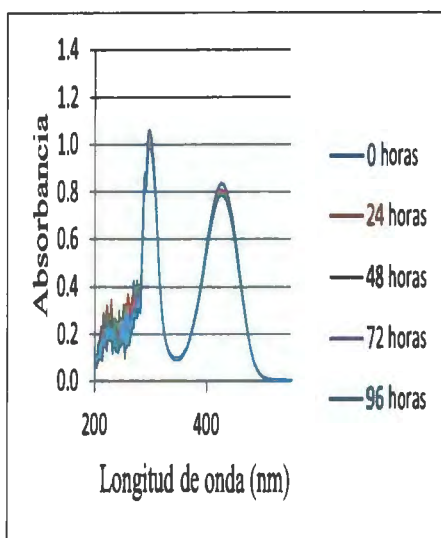
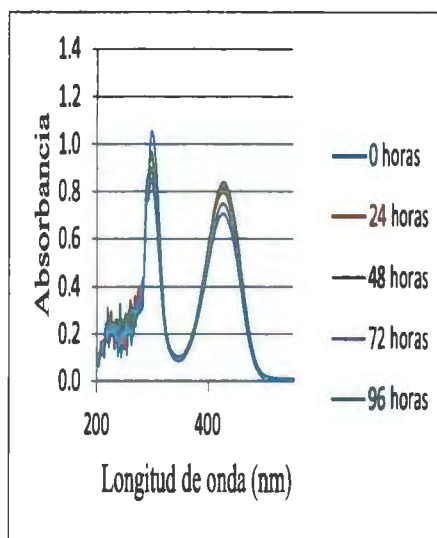


Figura A56. Cinética de decoloración de Synozol Amarillo.

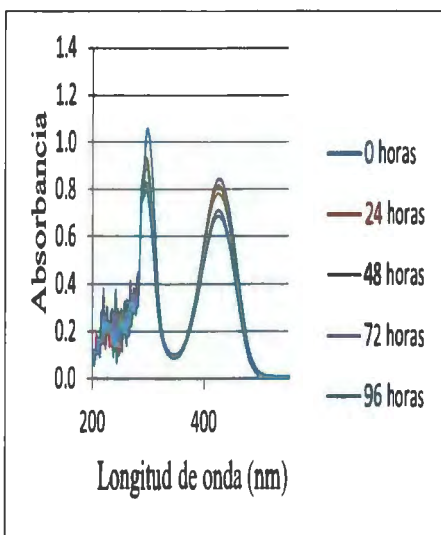
LMBTM1 de 48 horas de crecimiento, dilución 1/10



LMBTM1 de 72 horas de crecimiento, dilución 1/10



LMBTM5 de 48 horas de crecimiento, dilución 1/10



LMBTM5 de 72 horas de crecimiento, dilución 1/10

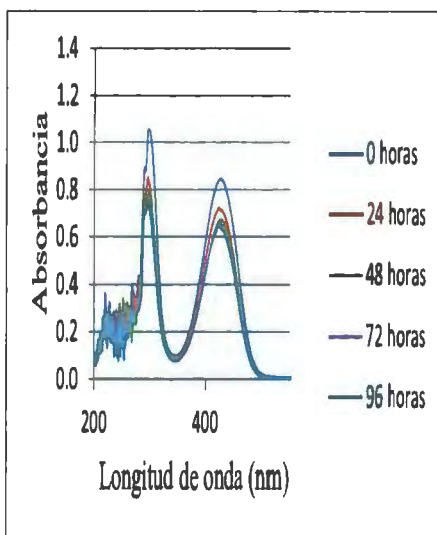
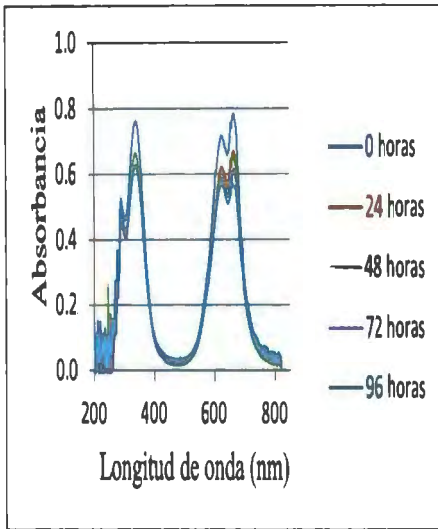
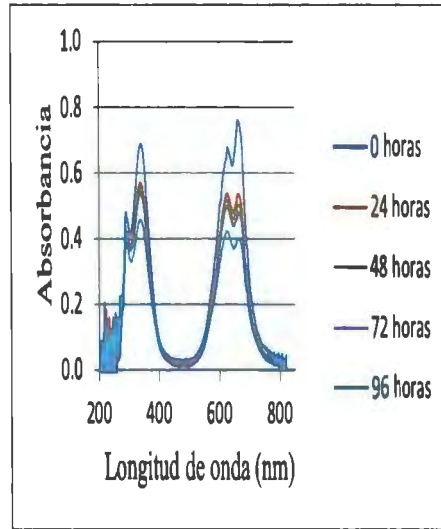


Figura A57. Cinética de decoloración de Synozol Turquesa.

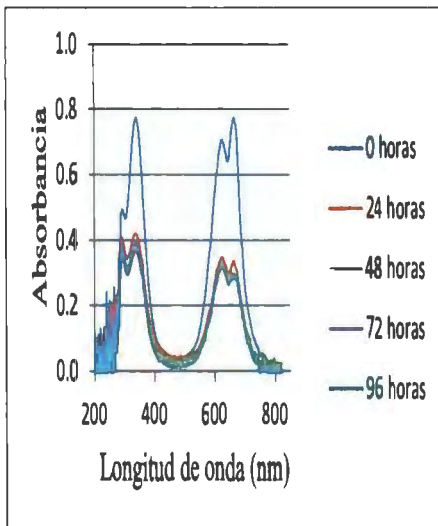
LMBTM1 de 48 horas de crecimiento, dilución 1/10



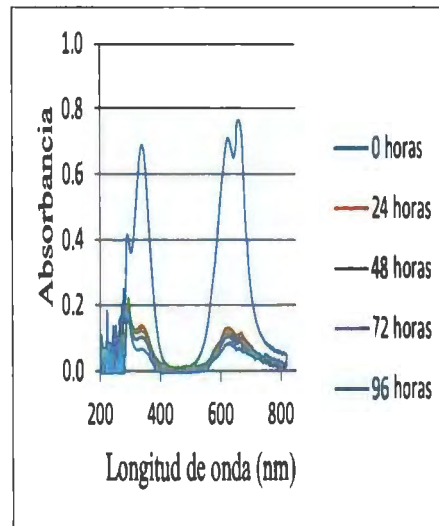
LMBTM1 de 72 horas de crecimiento, dilución 1/10



LMBTM5 de 48 horas de crecimiento, dilución 1/10



LMBTM5 de 72 horas de crecimiento, dilución 1/10



ANEXO 10. CINÉTICA DE DECOLORACION DE EFLUENTES

Figura 58. Espectros de absorción de los controles de efluentes simulados y el efluente real.

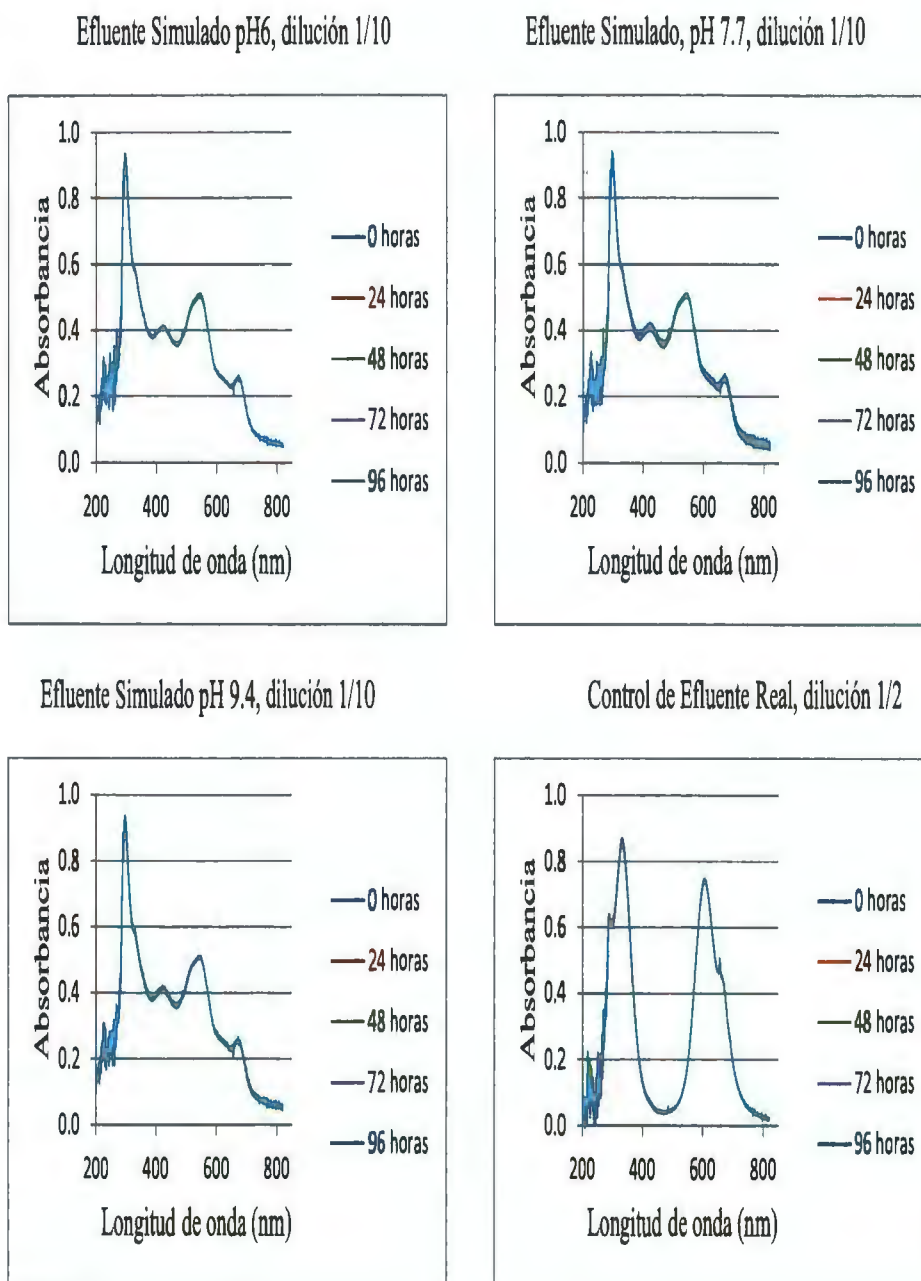


Figura 59. Espectros de absorción de cinética de decoloración de LMTBMT1 de efluentes simulados y el efluente real.

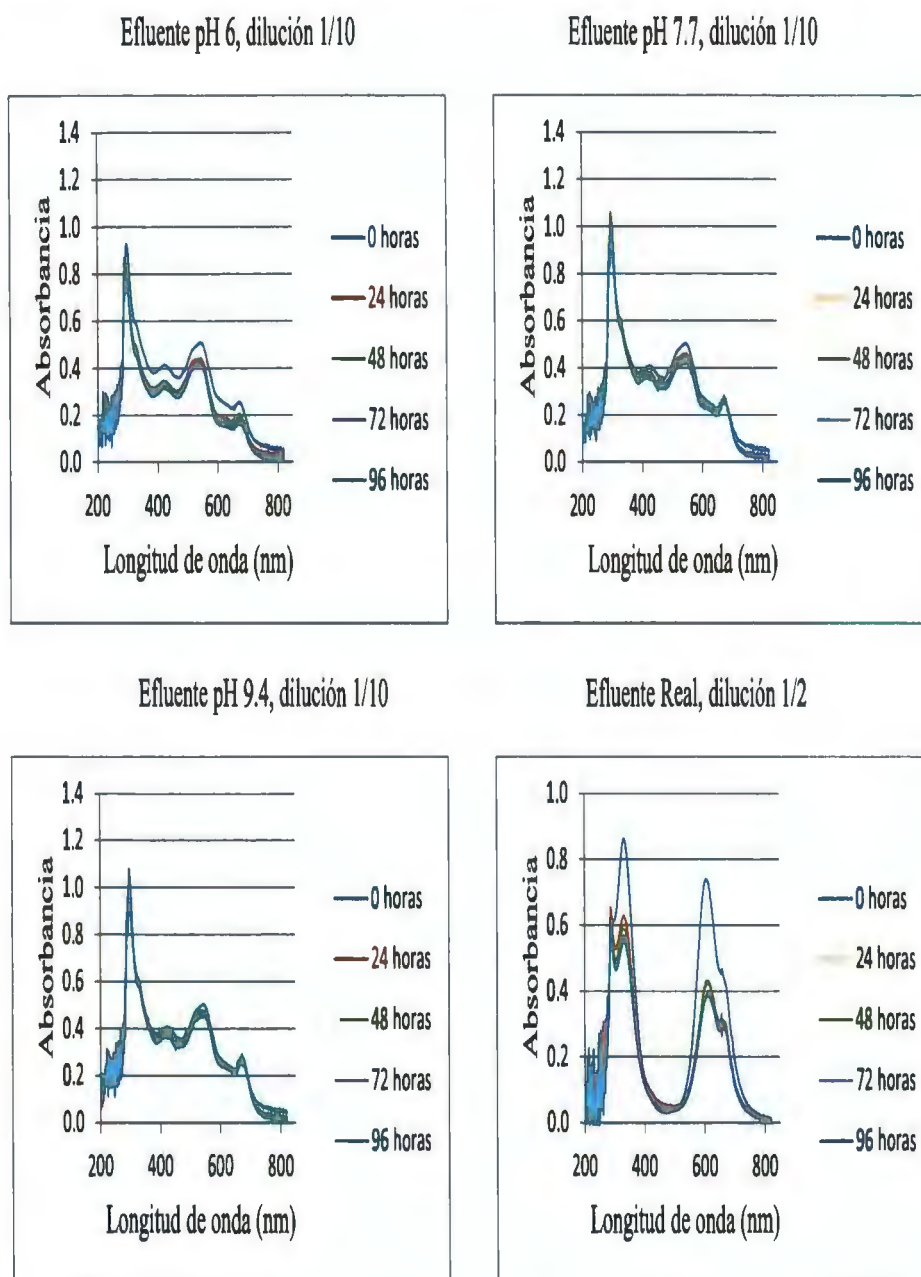
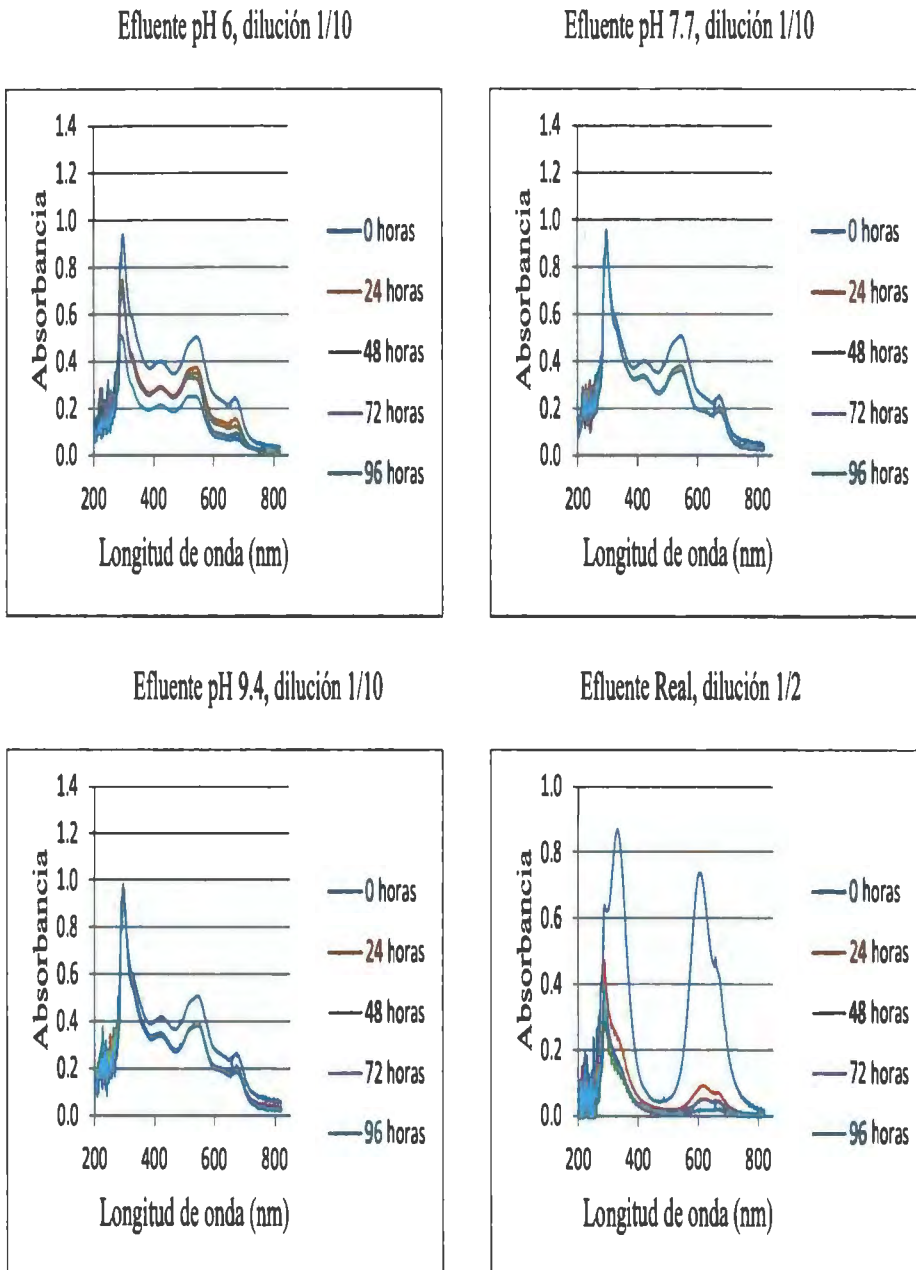


Figura 60. Espectros de absorción de cinética de decoloración de LMTBMT5 de efluentes simulados y el efluente real.



ANEXO 11. MUESTREO DE EFLUENTES TEXTILES

Figura 61. Tubo de descargue de efluentes textiles en río Huaycoloro.



Figura 62. Río teñido de color azul al entrar en contacto directo con los efluentes.



ANEXO 12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

ANEXO 12.1 BIOPELÍCULAS DE LMBTM1 Y LMBTM5 EN DOS SOPORTE SÓLIDOS.

12.1.1 Biomasa formada en dos soportes sólidos

12.1.1.1 Comparación de biomasa formada en biopelícula (g/L) de LMBTM1 en tela de poliéster respecto a la biomasa formada en malla de metal a las 48 horas de crecimiento

- T de Student para dos muestras independientes:

H_0 : No existe una diferencia entre las medias de biomasa en los dos soportes.

H_1 : Existe una diferencia significativa entre las medias de biomasa en los dos soportes.

P-Valor = 0.666	>	$\alpha = 0.05$
A un nivel de confianza del 95% se concluye que: No existe una diferencia significativa entre la biomasa de biopelícula de LMBTM1 de 48 horas de crecimiento formada en tela de poliéster respecto a la biomasa de biopelícula formada en malla de metal.		

12.1.1.2 Comparación de biomasa formada en biopelícula de LMBTM1 en tela de poliéster y malla de metal a las 72 horas de crecimiento

- T de Student para dos muestras independientes:

H_0 : No existe una diferencia entre las medias de biomasa en los dos soportes.

H_1 : Existe una diferencia significativa entre las medias de biomasa en los dos soportes

P-Valor =0.673	>	$\alpha= 0.05$
<p>A un nivel de confianza del 95% se concluye que: No existe una diferencia significativa entre la biomasa de biopelícula de LMBTM1 de 72 horas de crecimiento formada en tela de poliéster respecto a la biomasa de biopelícula formada en malla de metal.</p>		

12.1.1.3 Comparación de biomasa formada en biopelícula de LMBTM1 en tela de poliéster y malla de metal a las 48 horas de crecimiento

- T de Student para dos muestras independientes:

H_0 : No existe una diferencia entre las medias de biomasa en los dos soportes.

H_1 : Existe una diferencia significativa entre las medias de biomasa en los dos soportes.

P-Valor =0.082	>	$\alpha= 0.05$
<p>A un nivel de confianza del 95% se concluye que: No existe una diferencia significativa entre la biomasa de biopelícula de LMBTM5 de 48 horas de crecimiento formada en tela de poliéster respecto a la biomasa de biopelícula formada en malla de metal.</p>		

12.1.1.4. Comparación de biomasa formada en biopelícula de LMBTM1 en tela de poliéster y malla de metal a las 48 horas de crecimiento

- T de Student para dos muestras independientes:

H_0 : No existe una diferencia entre las medias de biomasa en los dos soportes.

H₁: Existe una diferencia significativa entre las medias de biomasa en los dos soportes.

P-Valor =0.083	>	$\alpha= 0.05$
A un nivel de confianza del 95% se concluye que: No existe una diferencia significativa entre la biomasa de biopelícula de LMBTM5 de 72 horas de crecimiento formada en tela de poliéster respecto a la biomasa de biopelícula formada en malla de metal.		

12.1.2. Adherencia de biopelículas de LMBTM1 y LMBTM5

12.1.2.1. Comparación de adherencia de biopelículas de LMBTM1 de 48 horas de crecimiento en tela de poliéster respecto a la adherencia en malla de metal.

- T de Student para dos muestras independientes:

H₀: No existe una diferencia entre los porcentajes de adherencia de biomasa en los dos soportes.

H₁: Existe una diferencia entre los porcentajes de adherencia de biomasa en los dos soportes.

P-Valor =0.180	>	$\alpha= 0.05$
A un nivel de confianza del 95% se concluye que: No existe una diferencia significativa entre adherencia de biomasa de biopelícula de LMBTM1 de 48 horas de crecimiento en tela de poliéster respecto a la adherencia de biomasa de biopelícula en malla de metal.		

12.1.2.2. Comparación de adherencia de biopelículas de LMBTM1 de 72 horas de crecimiento en tela de poliéster respecto a la adherencia en malla de metal.

- T de Student para dos muestras independientes:

H_0 : No existe una diferencia entre las medias de biomasa en los dos soportes.

H_1 : Existe una diferencia significativa entre las medias de biomasa en los dos soportes

P-Valor =0.993	>	$\alpha= 0.05$
<p>A un nivel de confianza del 95% se concluye que: No existe una diferencia significativa entre adherencia de biomasa de biopelícula de LMBTM1 de 72 horas de crecimiento en tela de poliéster respecto a la adherencia de biomasa de biopelícula en malla de metal.</p>		

12.1.2.3 Comparación de adherencia de biopelículas de LMBTM5 de 48 horas de crecimiento en tela de poliéster respecto a la adherencia en malla de metal.

- T de Student para dos muestras independientes:

H_0 : No existe una diferencia entre las medias de biomasa en los dos soportes.

H_1 : Existe una diferencia significativa entre las medias de biomasa en los dos soportes.

P-Valor =0.309	>	$\alpha= 0.05$
<p>A un nivel de confianza del 95% se concluye que: No existe una diferencia significativa entre adherencia de biomasa de biopelícula de LMBTM5 de 48 horas de crecimiento en tela de poliéster respecto a la adherencia de biomasa de biopelícula en malla de metal.</p>		

12.1.2.4. Comparación de adherencia de biopelículas de LMBTM5 de 72 horas de crecimiento en tela de poliéster respecto a la adherencia en malla de metal.

- T de Student para dos muestras independientes:

H_0 : NO existe una diferencia entre las medias de biomasa en los dos soportes.

H₁: Existe una diferencia significativa entre las medias de biomasa en los dos soportes.

P-Valor = 0.258	>	$\alpha = 0.05$
A un nivel de confianza del 95% se concluye que: No existe una diferencia significativa entre adherencia de biomasa de biopelícula de LMBTM5 de 72 horas de crecimiento en tela de poliéster respecto a la adherencia de biomasa de biopelícula en malla de metal.		

ANEXO 12.2 ESTANDARIZACIÓN DE MEDIO DE DECOLORACIÓN

12.2.1 Decoloración de medios de decoloración a 24 horas con biopelícula de LMBTM1

o ANOVA

H₀: NO existe una diferencia entre los porcentajes de decoloración de los medios 1, 2 y 3 a 24 horas de decoloración.

H₁: Existe una diferencia entre los porcentajes de decoloración de los medios 1, 2 y 3 a 24 horas de decoloración.

Tabla ANOVA para Porcentajes de decoloración por Medio de decoloración

Fuente	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Razón-F	P-Valor
Entre grupos	0.1064	0.0532	0.02	0.9821
Intra grupos	26.5256	2.94729		
Total (Corr.)	26.632			

Puesto que el P-Valor de la razón-F es mayor a 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de los porcentajes de decoloración entre un nivel de medio de decoloración y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

12.2.2 Decoloración de medios de decoloración a 48 horas con biopelícula de LMBTM1

- ANOVA

H_0 : NO existe una diferencia entre los porcentajes de decoloración de los medios 1, 2 y 3 a 48 horas de decoloración.

H_1 : Existe una diferencia entre los porcentajes de decoloración de los medios 1, 2 y 3 a 48 horas de decoloración.

Tabla ANOVA para Porcentajes de decoloración por Medio de decoloración

Fuente	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Razón-F	P-Valor
Entre grupos	20.5161	10.258	0.94	0.4252
Intra grupos	98.0225	10.8914		
Total (Corr.)	118.539			

Puesto que el P-Valor de la razón-F es mayor a 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de los porcentajes de decoloración entre un nivel de medio de decoloración y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

12.2.3. Decoloración de medios de decoloración a 72 horas con biopelícula de LMBTM1

- ANOVA

H_0 : NO existe una diferencia entre los porcentajes de decoloración de los medios 1, 2 y 3 a 72 horas de decoloración.

H_1 : Existe una diferencia entre los porcentajes de decoloración de los medios 1, 2 y 3 a 72 horas de decoloración.

Tabla ANOVA para Porcentajes de decoloración por Medio de decoloración

Fuente	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Razón-F	P-Valor
Entre grupos	6.09307	3.04653	0.19	0.8320
Intra grupos	146.01	16.2233		
Total (Corr.)	152.103			

Puesto que el P-Valor de la razón-F es mayor a 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de los porcentajes de decoloración entre un nivel de medio de decoloración y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

12.2.4 Decoloración de medios de decoloración a 96 horas con biopelícula de LMBTM1

o ANOVA

H_0 : NO existe una diferencia entre los porcentajes de decoloración de los medios 1, 2 y 3 a 96 horas de decoloración.

H_1 : Existe una diferencia entre los porcentajes de decoloración de los medios 1, 2 y 3 a 96 horas de decoloración.

Tabla ANOVA para Porcentajes de decoloración por Medio de decoloración

Fuente	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Razón-F	P-Valor
Entre grupos	1.84987	0.924933	0.27	0.7670
Intra grupos	30.472	3.38578		
Total (Corr.)	32.3219			

Puesto que el P-Valor de la razón-F es mayor a 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de los porcentajes de decoloración entre un nivel de medio de decoloración y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

12.2.5. Decoloración de medios de decoloración a 24 horas con biopelícula de LMBTM5

○ ANOVA

H_0 : NO existe una diferencia entre los porcentajes de decoloración de los medios 1, 2 y 3 a 24 horas de decoloración.

H_1 : Existe una diferencia entre los porcentajes de decoloración de los medios 1, 2 y 3 a 24 horas de decoloración.

Tabla ANOVA para Porcentajes de decoloración por Medio de decoloración

Fuente	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Razón-F	P-Valor
Entre grupos	1358.13	679.065	42.43	0.0000
Intra grupos	144.045	16.005		
Total (Corr.)	1502.18			

Puesto que el P-Valor de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de los porcentajes de decoloración entre un nivel de medio 1, 2 y 3, con un nivel del 95.0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente se efectuó Pruebas de Múltiples Rangos de Duncan.

○ Test de Duncan

Método: 95.0- Duncan

<i>medio 1, 2 y 3</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Medio 3	39.73	X
Medio 2	58.02	X
Medio 1	64.95	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>
Medio 1 - Medio 2	*
Medio 1 - Medio 3	*
Medio 2 - Medio 3	*

(*) Indica que a un nivel de 95.0% de confianza existe una diferencia significativa entre los porcentajes de decoloración de un medio y otro.

12.2.6. Decoloración de medios de decoloración a 48 horas con biopelícula de LMBTM5

- ANOVA

H_0 : NO existe una diferencia entre los porcentajes de decoloración de los medios 1, 2 y 3 a 48 horas de decoloración.

H_1 : Existe una diferencia entre los porcentajes de decoloración de los medios 1, 2 y 3 a 48 horas de decoloración.

Tabla ANOVA para Porcentajes de decoloración por Medio de decoloración

Fuente	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Razón-F	P-Valor
Entre grupos	58.4981	29.249	2.51	0.1359
Intra grupos	104.823	11.647		
Total (Corr.)	163.321			

Puesto que el P-Valor de la razón-F es mayor a 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de los porcentajes de decoloración entre un nivel de medio de decoloración y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

12.2.7 Decoloración de medios de decoloración a 72 horas con biopelícula de LMBTM5

- ANOVA

H_0 : NO existe una diferencia entre los porcentajes de decoloración de los medios 1, 2 y 3 a 48 horas de decoloración.

H_1 : Existe una diferencia entre los porcentajes de decoloración de los medios 1, 2 y 3 a 48 horas de decoloración.

Tabla ANOVA para Porcentajes de decoloración por Medio de decoloración

Fuente	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Razón-F	P-Valor
Entre grupos	54.8421	27.421	1.33	0.3126
Intra grupos	186.012	20.668		
Total (Corr.)	240.854			

Puesto que el P-Valor de la razón-F es mayor a 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de los porcentajes de decoloración entre un nivel de medio de decoloración y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

12.2.8 Decoloración de medios de decoloración a 96 horas con biopelícula de LMBTM5

o ANOVA

H_0 : NO existe una diferencia entre los porcentajes de decoloración de los medios 1, 2 y 3 a 96 horas de decoloración.

H_1 : Existe una diferencia entre los porcentajes de decoloración de los medios 1, 2 y 3 a 96 horas de decoloración.

Tabla ANOVA para Porcentajes de decoloración por Medio de decoloración

Fuente	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Razón-F	P-Valor
Entre grupos	530.757	265.379	17.79	0.0007
Intra grupos	134.291	14.9212		
Total (Corr.)	665.048			

Puesto que el P-Valor de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de los porcentajes de decoloración entre un nivel de medio 1, 2 y 3, con un nivel del 95.0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente se efectuó Pruebas de Múltiples Rangos de Duncan.

- o Test de Duncan

Método: 95.0- Duncan

<i>medio 1, 2 y 3</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Medio 3	39.73	X
Medio 2	58.02	X
Medio 1	64.95	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>
Medio 1 - Medio 2	
Medio 1 - Medio 3	*
Medio 2 - Medio 3	*

(*) Indica que a un nivel de 95.0% de confianza existe una diferencia significativa entre los porcentajes de decoloración de un medio y otro.

ANEXO 12.3 CINÉTICA DE DECOLORACIÓN DE TINTES AZOICOS

12.3.1 Decoloración de Azul Brillante

- o ANOVA

H₀: NO existen diferencias significativas entre los tres medios de decoloración.

H₁: Existen diferencias significativas entre los tres medios de decoloración.

Porcentaje de decoloración de Azul Brillante de las biopelículas de LMBTM1 de 48h, LMBTM1 de 72 h, LMBTM5 de 48 h y LMBTM5 de 72h:	P-valor de la razón-F
A 24 horas de decoloración	0.0000*
A 48 horas de decoloración	0.0000*
A 72 horas de decoloración	0.0000*
A 96 horas de decoloración	0.0000*

(*) Se concluye a un nivel de confianza del 95% que hay diferencias significativas entre los porcentajes de decoloración de Azul Brillante entre las biopelículas de LMBTM1 de 48h, LMBTM1 de 72 h, LMBTM5 de 48 h y LMBTM5 de 72h.

Para determinar cuáles medias son significativamente se efectuó Pruebas de Múltiples Rangos de Duncan.

- Test de Duncan

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Tratamiento	Horas de decoloración			
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
	Grupos homogéneos	Grupos homogéneos	Grupos homogéneos	Grupos homogéneos
LMBTM1-48h	X	X	X	X
LMBTM1-72h	X	X	X	X
LMBTM5-48h	X	X	X	X
LMBTM5-72h	X	X	X	X

Contraste	Horas de decoloración			
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
LMBTM1-48h - LMBTM1-72h	*	*	*	*
LMBTM1-48h - LMBTM5-48h	*	*	*	*
LMBTM1-48h - LMBTM5-72h	*	*	*	*
LMBTM1-72h - LMBTM5-48h	*	*	*	*
LMBTM1-72h - LMBTM5-72h	*	*	*	*
LMBTM5-48h - LMBTM5-72h		*	*	

(*) Indica que a un nivel de 95.0% de confianza existe una diferencia significativa entre los porcentajes de decoloración de un tratamiento y otro.

12.3.2 Decoloración de Levafix Amarillo

- ANOVA

H₀: NO existen diferencias significativas entre los tres medios de decoloración.

H₁: Existen diferencias significativas entre los tres medios de decoloración.

Porcentaje de decoloración de Remazol Rojo de las biopelículas de LMBTM1 de 48h, LMBTM1 de 72 h, LMBTM5 de 48 h y LMBTM5 de 72h:	P-valor de la razón-F
A 24 horas de decoloración	0.0643
A 48 horas de decoloración	0.1042
A 72 horas de decoloración	0.0176*
A 96 horas de decoloración	0.0012*

(*) Se concluye a un nivel de confianza del 95% que hay diferencias significativas entre los porcentajes de decoloración de Levafix Amarillo entre las biopelículas de LMBTM1 de 48h, LMBTM1 de 72 h, LMBTM5 de 48 h y LMBTM5 de 72h.

Para determinar cuáles medias son significativamente se efectuó Pruebas de Múltiples Rangos de Duncan.

- o Test de Duncan

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Tratamiento	Horas de decoloración	
	72 horas	96 horas
	Grupos homogéneos	Grupos homogéneos
LMBTM1-48h	X	X
LMBTM1-72h	X	X
LMBTM5-48h	X	X
LMBTM5-72h	X	X

<i>Contraste</i>	Horas de decoloración	
	72 horas	96 horas
LMBTM1-48h - LMBTM1-72h		
LMBTM1-48h - LMBTM5-48h		
LMBTM1-48h - LMBTM5-72h	*	*
LMBTM1-72h - LMBTM5-48h		
LMBTM1-72h - LMBTM5-72h	*	*
LMBTM5-48h - LMBTM5-72h	*	*

(*) Indica que a un nivel de 95.0% de confianza existe una diferencia significativa entre los porcentajes de decoloración de un tratamiento y otro.

12.3.3 Decoloración de Remazol Rojo

- ANOVA

H_0 : NO existen diferencias significativas entre los tres medios de decoloración.

H_1 : Existen diferencias significativas entre los tres medios de decoloración.

Porcentaje de decoloración de Rojo Profundo de las biopelículas de LMBTM1 de 48h, LMBTM1 de 72 h, LMBTM5 de 48 h y LMBTM5 de 72h:	P-valor de la razón-F
A 24 horas de decoloración	0.0000*
A 48 horas de decoloración	0.0000*
A 72 horas de decoloración	0.0000*
A 96 horas de decoloración	0.0000*

(*) Se concluye a un nivel de confianza del 95% que hay diferencias significativas entre los porcentajes de decoloración de Azul Brillante entre las biopelículas de LMBTM1 de 48h, LMBTM1 de 72 h, LMBTM5 de 48 h y LMBTM5 de 72h.

Para determinar cuáles medias son significativamente se efectuó Pruebas de Múltiples Rangos de Duncan.

- Test de Duncan

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Tratamiento	Horas de decoloración			
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
	Grupos homogéneos	Grupos homogéneos	Grupos homogéneos	Grupos homogéneos
LMBTM1-48h	X	X	X	X
LMBTM1-72h	XX	X	X	X
LMBTM5-48h	X	X	X	X
LMBTM5-72h	X	X	X	X

<i>Contraste</i>	Horas de decoloración			
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
LMBTM1-48h - LMBTM1-72h	*		*	*
LMBTM1-48h - LMBTM5-48h			*	*
LMBTM1-48h - LMBTM5-72h	*	*	*	*
LMBTM1-72h - LMBTM5-48h				
LMBTM1-72h - LMBTM5-72h	*	*	*	*
LMBTM5-48h - LMBTM5-72h	*	*	*	*

(*) Indica que a un nivel de 95.0% de confianza existe una diferencia significativa entre los porcentajes de decoloración de un tratamiento y otro.

12.3.4 Decoloración de Rojo Profundo

- ANOVA

H_0 : NO existen diferencias significativas entre los tres medios de decoloración.

H_1 : Existen diferencias significativas entre los tres medios de decoloración.

Porcentaje de decoloración de Rojo Profundo de las biopelículas de LMBTM1 de 48h, LMBTM1 de 72 h, LMBTM5 de 48 h y LMBTM5 de 72h:	P-valor de la razón-F
A 24 horas de decoloración	0.0000*
A 48 horas de decoloración	0.0000*
A 72 horas de decoloración	0.0000*
A 96 horas de decoloración	0.0000*

(*) Se concluye a un nivel de confianza del 95% que hay diferencias significativas entre los porcentajes de decoloración de Azul Brillante entre las biopelículas de LMBTM1 de 48h, LMBTM1 de 72 h, LMBTM5 de 48 h y LMBTM5 de 72h.

Para determinar cuáles medias son significativamente se efectuó Pruebas de Múltiples Rangos de Duncan.

- o Test de Duncan

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Tratamiento	Horas de decoloración			
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
	Grupos homogéneos	Grupos homogéneos	Grupos homogéneos	Grupos homogéneos
LMBTM1-48h	X	X	X	X
LMBTM1-72h	XX	X	X	X
LMBTM5-48h	X	X	X	X
LMBTM5-72h	X	X	X	X

Contraste	Horas de decoloración			
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
LMBTM1-48h - LMBTM1-72h		*		*
LMBTM1-48h - LMBTM5-48h	*	*	*	*
LMBTM1-48h - LMBTM5-72h	*	*	*	*
LMBTM1-72h - LMBTM5-48h			*	*
LMBTM1-72h - LMBTM5-72h	*	*	*	*
LMBTM5-48h - LMBTM5-72h	*	*	*	*

(*) Indica que a un nivel de 95.0% de confianza existe una diferencia significativa entre los porcentajes de decoloración de un tratamiento y otro.

12.3.5 Decoloración de Synozol Amarillo

- o ANOVA

H_0 : NO existen diferencias significativas entre los tres medios de decoloración.

H_1 : Existen diferencias significativas entre los tres medios de decoloración.

Porcentaje de decoloración de Rojo Profundo de las biopelículas de LMBTM1 de 48h, LMBTM1 de 72 h, LMBTM5 de 48 h y LMBTM5 de 72h:	P-valor de la razón-F
A 24 horas de decoloración	0.0000*
A 48 horas de decoloración	0.0000*
A 72 horas de decoloración	0.0000*
A 96 horas de decoloración	0.0000*

(*) Se concluye a un nivel de confianza del 95% que hay diferencias significativas entre los porcentajes de decoloración de Azul Brillante entre las biopelículas de LMBTM1 de 48h, LMBTM1 de 72 h, LMBTM5 de 48 h y LMBTM5 de 72h.

Para determinar cuáles medias son significativamente se efectuó Pruebas de Múltiples Rangos de Duncan.

- o Test de Duncan

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Tratamiento	Media	Horas de decoloración			
		24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
		Grupos homogéneos	Grupos homogéneos	Grupos homogéneos	Grupos homogéneos
LMBTM1-48h	2.675	X	X	X	X
LMBTM1-72h	23.65	X	X	X	X
LMBTM5-48h	92.445	X	X	X	X
LMBTM5-72h	95.99	X	X	X	X

(*) Indica que a un nivel de 95.0% de confianza existe una diferencia significativa entre los porcentajes de decoloración de un tratamiento y otro.

<i>Contraste</i>	Horas de decoloración			
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
LMBTM1-48h - LMBTM1-72h			*	*
LMBTM1-48h - LMBTM5-48h			*	*
LMBTM1-48h - LMBTM5-72h	*	*	*	*
LMBTM1-72h - LMBTM5-48h			*	*
LMBTM1-72h - LMBTM5-72h	*	*	*	*
LMBTM5-48h - LMBTM5-72h	*	*	*	*

12.3.6 Decoloración de Synozol Turquesa

○ ANOVA

H₀: NO existen diferencias significativas entre los tres medios de decoloración.

H₁: Existen diferencias significativas entre los tres medios de decoloración.

Porcentaje de decoloración de Rojo Profundo de las biopelículas de LMBTM1 de 48h, LMBTM1 de 72 h, LMBTM5 de 48 h y LMBTM5 de 72h:	P-valor de la razón-F
A 24 horas de decoloración	0.0000*
A 48 horas de decoloración	0.0000*
A 72 horas de decoloración	0.0000*
A 96 horas de decoloración	0.0000*

(*) Se concluye a un nivel de confianza del 95% que hay diferencias significativas entre los porcentajes de decoloración de Azul Brillante entre las biopelículas de LMBTM1 de 48h, LMBTM1 de 72 h, LMBTM5 de 48 h y LMBTM5 de 72h.

Para determinar cuáles medias son significativamente se efectuó Pruebas de Múltiples Rangos de Duncan.

○ Test de Duncan

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Tratamiento	Media	Horas de decoloración			
		24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
		Grupos homogéneos	Grupos homogéneos	Grupos homogéneos	Grupos homogéneos
LMBTM1-48h	2.675	X	X	X	X
LMBTM1-72h	23.65	X	X	X	X
LMBTM5-48h	92.445	X	X	X	X
LMBTM5-72h	95.99	X	X	X	X

Contraste	Horas de decoloración			
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
LMBTM1-48h - LMBTM1-72h	*	*	*	*
LMBTM1-48h - LMBTM5-48h	*	*	*	*
LMBTM1-48h - LMBTM5-72h	*	*	*	*
LMBTM1-72h - LMBTM5-48h	*	*	*	*
LMBTM1-72h - LMBTM5-72h	*	*	*	*
LMBTM5-48h - LMBTM5-72h	*	*	*	*

(*) Indica que a un nivel de 95.0% de confianza existe una diferencia significativa entre los porcentajes de decoloración de un tratamiento y otro.

12.3.7 Análisis global para efectos principales

Este análisis se efectuó con el propósito de determinar si a nivel global existen diferencias significativas en los porcentajes de decoloración:

- Al emplear la cepa LMBTM1 respecto a la cepa LMBTM5
- Al emplear una biopelícula de 48 horas respecto a una de 72 horas de crecimiento
- Al emplear tinte azoico respecto a otro tinte azoico.

o ANOVA Multifactorial

EFECTOS PRINCIPALES	P-Valor de la razón F			
	24 horas de decoloración	48 horas de decoloración	72 de horas de decoloración	96horas de decoloración
A:Cepa	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
B:Edad de Biopelícula en horas	0.0054*	0.0008*	0.00010*	0.0001*
C:Tinte azoico	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*

(*) Los valores-P son menores que 0.05 indican que estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre el porcentaje de decoloración con un 95.0% de nivel de confianza. Se efectuaron pruebas Duncan para cada uno de los factores en las distintas horas de decoloración para aquellos factores en los que hubo diferencias significativas.

- Test de Duncan para el factor “Cepa”

Cepa	Horas de decoloración			
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
	Grupos Homogéneos	Grupos Homogéneos	Grupos Homogéneos	Grupos Homogéneos
LMBTM1	X	X	X	X
LMBTM5	X	X	X	X

Contraste	Horas de decoloración			
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
LMBTM1-LMBTM5	*	*	*	*

(*) Indica que a un nivel de 95% de confianza hay diferencias significativas entre los porcentajes de decoloración de una cepa respecto a otra.

- Test de Duncan para el factor “Edad de Biopelícula”

Edad de Biopelícula	Horas de decoloración			
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
	Grupos Homogéneos	Grupos Homogéneos	Grupos Homogéneos	Grupos Homogéneos
Biopelícula de 48 horas	X	X	X	X
Biopelícula de 72 horas	X	X	X	X

Contraste	Horas de decoloración			
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
48 horas - 72 horas	*	*	*	*

(*) Indica que a un nivel de 95% de confianza hay diferencias significativas en los porcentajes de decoloración respecto a los días de crecimiento de biopelícula de 48 horas respecto a la de 72 horas de crecimiento.

- Test de Duncan para el factor “Tinte azoico”

Método: 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tinte azoico</i>	Horas de decoloración			
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
	<i>Grupos Homogéneos</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>	<i>Grupos Homogéneo</i>
Remazol Rojo	X	X	X	X
Synozol Amarillo	X	X	X	X
Levafix Amarillo	X	X	X	XX
Rojo Profundo	X	X	X	X
Synozol Turquesa	X	X	X	X
Azul Brillante	X	X	X	X

<i>Contraste</i>	Horas de decoloración			
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
Azul Brillante - Levafix Amarillo	*	*	*	*
Azul Brillante - Remazol Rojo	*	*	*	*
Azul Brillante - Rojo Profundo	*	*	*	*
Azul Brillante - Synozol Amarillo	*	*	*	*
Azul Brillante - Synozol Turquesa				
Levafix Amarillo - Remazol Rojo				
Levafix Amarillo - Rojo Profundo				*
Levafix Amarillo - Synozol Amarillo				
Levafix Amarillo - Synozol Turquesa	*	*	*	*
Remazol Rojo - Rojo Profundo				*
Remazol Rojo - Synozol Amarillo				
Remazol Rojo - Synozol Turquesa	*	*	*	*
Rojo Profundo - Synozol Amarillo				
Rojo Profundo - Synozol Turquesa	*	*	*	*
Synozol Amarillo - Synozol Turquesa	*	*	*	*

(*) Indica que a un nivel de 95% de confianza hay diferencias significativas en los porcentajes de decoloración de un tinte azoico respecto a otro.

ANEXO 12.4 CINÉTICA DE DECOLORACIÓN DE EFLUENTES SIMULADOS Y REALES

13.4.1 Efluente Simulado

12.4.1.1 Cepa LMBTM1

- ANOVA

H_0 : NO existen diferencias significativas entre los porcentajes de decoloración medios de los efluentes simulados.

H_1 : Existen diferencias significativas entre los porcentajes de decoloración medios de los efluentes simulados.

Porcentaje de decoloración de efluentes simulados de tres distintos pHs	P-Valor de la razón F
A las 24 horas	0.0000
A las 48 horas	0.0000
A las 72 horas	0.0000
A las 96 horas	0.0000

El P-Valor de la razón F es menor a 0.05 por lo que se concluye que a un nivel de confianza del 95% hay diferencias entre los porcentajes de decoloración de efluentes simulados de distinto pH por biopelículas de LMBTM1 en ninguna de las horas de decoloración.

- Test de Duncan

Método: 95.0 porcentaje Duncan

pH del efluente simulado	Horas de decoloración			
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
	<i>Grupos Homogéneos</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
9.4	X	X	X	X
7.7	X	X	X	X
6	X	X	X	X

Contraste	Horas de decoloración			
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
Efluente simulado de pH 6 - Efluente simulado de pH 7.7	*	*	*	*
Efluente simulado de pH 6 - Efluente simulado de pH 9.4	*	*	*	*
Efluente simulado de pH 7.7 - Efluente simulado de pH 9.4	*	*	*	*

(*) Indica que existe una diferencia significativa entre los porcentajes de decoloración de un efluente simulado de un pH respecto a otro.

12.4.1.2 Cepa LMBTM5

o ANOVA

H₀: NO existen diferencias significativas entre los porcentajes de decoloración medios de los efluentes simulados.

H₁: Existen diferencias significativas entre los porcentajes de decoloración medios de los efluentes simulados.

Porcentaje de decoloración de efluentes simulados de distintos pHs	P-Valor de la razón F
A las 24 horas	0.5509
A las 48 horas	0.0349
A las 72 horas	0.0001*
A las 96 horas	0.0000*

(*) El P-Valor de la razón F es menor a 0.05 por lo que se concluye que a un nivel de confianza del 95% hay diferencias entre los porcentajes de decoloración de efluentes simulados de distinto pH por biopelículas de LMBTM1 en ninguna de las horas de decoloración. Se efectuaron pruebas de comparación múltiples de Duncan para los porcentajes de decoloración.

- Test de Duncan

- Método: 95.0 porcentaje Duncan

pH del efluente simulado	Horas de decoloración		
	48 horas	72 horas	96 horas
	<i>Grupos Homogéneos</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
9.4	X	X	X
7.7	X X	X	X
6	X	X	X

<i>Contraste</i>	Horas de decoloración		
	24 horas	72 horas	96 horas
Efluente simulado de pH6 - Efluente simulado de pH 7.7		*	*
Efluente simulado de pH 6 - Efluente simulado de pH 9.4	*	*	*
Efluente simulado de pH 7.7 - Efluente simulado de pH 9.4		*	*

(*) Indica que existe una diferencia significativa entre los porcentajes de decoloración de un efluente simulado de un pH respecto a otro.

12.4.1.3 T de Student para comparación por cepas

Efluente		P-valor de la prueba de t de Student			
		24 horas de decoloración	48 horas de decoloración	72 de horas de decoloración	96horas de decoloración
Efluente pH 6	Cepa LMBTM1 vs LMBTM5	0.0000*	0.0017*	0.0000*	0.0000*
Efluente pH 7.7	Cepa LMBTM1 vs LMBTM5	0.0000*	0.0001*	0.0002*	0.0001*
Efluente pH 9.4	Cepa LMBTM1 vs LMBTM5	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*

(*) El P-Valor es menor a 0.05 por lo que hay diferencias significativas en los porcentajes de decoloración de la biopelícula de LMBTM1 respecto a la biopelícula de LMBTM5 a un el fuente de pH determinado.

12.4.2 Efluente Real

Prueba de T de Student

H₀: NO existen diferencias significativas entre los tres medios de decoloración.

H₁: Existen diferencias significativas entre los tres medios de decoloración.

Comparaciones de porcentajes de decoloración de Efluente Real entre:	P-valor de la prueba de t de Student			
	24 horas de decoloración	48 horas de decoloración	72 de horas de decoloración	96horas de decoloración
Biopelícula LMBTM1 de vs Biopelícula LMBTM5	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*

(*) Se concluye a un nivel de confianza de 95% que de decoloración hay diferencias entre los porcentajes de decoloración del efluente real a 24, 48, 72 y 96 horas de decoloración.

ANEXO 12.5 ANÁLISIS DE BIOMASAS DE BIOPELÍCULAS PARA CINÉTICAS DE CRECIMIENTO Y DECOLORACIÓN

12.5.1. Comparación de biomasa de biopelículas de 48 horas versus biopelículas de 72 horas

Se empleó una prueba t de Student para muestras relacionadas debido a que las biomاسas iniciales y finales son estados relacionados de la misma cepa.

Comparación de biopelículas en tela de poliéster	P-valor de t de Student
Biopelículas de LMBTM1 48 h - biopelículas LMBTM1 72 h	0.0071*
Biopelículas de LMBTM5 48 h - biopelículas LMBTM5 72 h	0.0016*

(*) Indica que existe a un nivel de confianza de 95% una diferencia significativa entre la biomasa de una biopelícula de 48 horas respecto a una biopelícula de 72 horas.

12.5.2. Comparación de biomasa inicial versus biomasa final en cinética de decoloración de tintes azoicos.

Se empleó una prueba t de Student para muestras relacionadas debido a que las biomásas iniciales y finales son estados relacionados de la misma cepa.

Tinte azoico	P-valor de T de Student			
	LMBTM1 de 48 horas	LMBTM1 de 72 horas	LMBTM5 de 48 horas	LMBTM5 de 72 horas
Azul Brillante	0.0040*	0.0004*	0.0003*	0.0008*
Levafix Amarillo	0.0001*	0.0204*	0.0000*	0.0003*
Levafix Rojo	0.0001*	0.0017*	0.0007*	0.0011*
Remazol Rojo	0.0000*	0.0017*	0.0005*	0.0010*
Rojo Profundo	0.0012*	0.0390*	0.0008*	0.0000*
Synozol Amarillo	0.0010*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
Synozol Turquesa	0.0021*	0.0008*	0.0000*	0.0004*

(*) A un nivel de confianza de 95% hay diferencias significativas entre la biomasa inicial y final del proceso de decoloración de tintes azoicos por biopelículas.

12.5.3. Comparación de biomasa inicial versus biomasa final en cinética de decoloración de efluentes.

Se empleó una prueba t de Student para muestras relacionadas debido a que las biomásas iniciales y finales son estados relacionados de la misma cepa.

Efluente	P-valor de T de Student	
	LMBTM1 de 72 horas	LMBTM5 de 72 horas
Simulado pH 6	0.0001*	0.0003*
Simulado pH 7.7	0.0000*	0.0004*
Simulado pH 9.4	0.0013*	0.0006*
Real	0.1336	0.1371

(*) A un nivel de confianza de 95% hay diferencias significativas entre la biomasa inicial y final del proceso de decoloración de efluentes por biopelículas.