

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotechnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotechnológica



Remoción biológica de taninos de quebracho mediante hongos filamentosos
aislados de efluentes de curtiembres del Parque Industrial Río Seco,
Arequipa

Tesis presentada por la bachiller:

Vera Coila, Desyree Raziel

ORCID: 0009-0000-4961-7616

Para optar el Título Profesional de Ingeniera Biotecnóloga

Asesor:

Dr. Jimenez Pacheco, Hugo Guillermo

ORCID: 0009-0001-5177-1126

Arequipa – Perú

2026

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

INGENIERIA BIOTECNOLOGICA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 02 de Octubre del 2025

Dictamen: 013733-C-EPIB-2025

Visto el borrador del expediente 013733, presentado por:

2018225832 - VERA COILA DESYREE RAZIEL

Titulado:

**REMOCIÓN BIOLÓGICA DE TANINOS DE QUEBRACHO MEDIANTE HONGOS FILAMENTOSOS
AISLADOS DE EFLUENTES DE CURTIEMBRES DEL PARQUE INDUSTRIAL RÍO SECO, AREQUIPA**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

Titulo Profesional/Titulo de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

INGENIERO BIOTECNOLOGO

**45482246 - ORTIZ ROMERO DERLY DAVID
DICTAMINADOR**



**45945764 - YUGRA CONDORI MONICA MEYLIN
DICTAMINADOR**



**72172854 - FLORES CALLA SUSAN SOFIA
DICTAMINADOR**



Remoción biológica de taninos de quebracho mediante hongos filamentosos aislados de efluentes de curtiembres del Parque Industrial Río Seco, Arequipa

INFORME DE ORIGINALIDAD

13%	12%	3%	3%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net	3%
	Fuente de Internet	
2	repositorio.unsa.edu.pe	1%
	Fuente de Internet	
3	Submitted to Universidad Católica de Santa María	1%
	Trabajo del estudiante	
4	repositorio.uaaan.mx:8080	<1%
	Fuente de Internet	
5	revistas.unimilitar.edu.co	<1%
	Fuente de Internet	
6	www.coursehero.com	<1%
	Fuente de Internet	
7	repositorio.unsaac.edu.pe	<1%
	Fuente de Internet	
8	eprints.uanl.mx	<1%
	Fuente de Internet	
9	repositorio.uta.edu.ec	<1%
	Fuente de Internet	
10	repositorio.ucv.edu.pe	<1%
	Fuente de Internet	
11	repositorio.lamolina.edu.pe	<1%
	Fuente de Internet	

DEDICATORIA

A mi hermanita, por ser mi apoyo incondicional, mi refugio en los días difíciles y una fuente infinita de risas, gracias por creer siempre en mí y recordarme que nunca estoy sola.

A Tambor, mi pequeño conejito, por acompañarme en cada desvelo con su infinita ternura y presencia reconfortante. Porque incluso en las noches más largas, estuvo ahí, haciéndome compañía sin pedir nada a cambio.



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Católica de Santa María y su institución: Instituto de Investigación e Innovación en Energías Renovables y Medio Ambiente (INNOVERGY) por el apoyo y soporte brindado.

A mis amigas, Alejandra y Camila y Alex, quienes me acompañaron y apoyaron durante todo este proyecto, por las conversaciones extrañas y las risas interminables.

A mi familia, a mi hermanita Sofia, por ser mi apoyo y mi refugio, gracias por tus palabras de ánimo, tu compañía no tan callada y por estar siempre, incluso cuando no sabías como ayudar y aun así te quedaste. Tu compañía me sostuvo en más momentos de lo que imaginas.

Y a mi padre, quien me brindó su apoyo y aliento incondicional en todo momento.

Este trabajo fue subvencionado por el proyecto de investigación: “Evaluación de la degradación de cromo y ácido tánico mediante el uso de surfactantes y solventes orgánicos usando un consorcio de hongos”, según resolución N°29002-R-2022.

RESUMEN

La industria de curtiembres genera efluentes residuales, característicos por su alta carga orgánica, compuestos fenólicos y metales pesados. Dentro de estos contaminantes, los taninos utilizados como agentes curtientes, destacan por su complejidad molecular y elevada recalcitrancia. Su vertimiento sin un tratamiento adecuado provoca alteraciones en la calidad del agua, lo que los convierte en un desafío crítico para la gestión ambiental. En particular, los taninos de quebracho (*Schinopsis balansae*), empleados de manera extensiva en la ciudad de Arequipa (PIRS), representan una fracción persistente en los efluentes industriales de esta ciudad.

Las pruebas iniciaron con la determinación del índice de tolerancia en medio sólido, ensayos de remoción de fenoles en medio líquido suplementado con Quebracho en solución (7,5, 10, 15 y 20 %), y la cuantificación de la actividad enzimática tanasa en medio líquido suplementado con ácido tánico en solución (7,5-20 %). Adicionalmente, se realizó la secuenciación de la región ITS (Internal Transcribed Spacer) para las cepas seleccionadas, así como el análisis estructural y químico mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

Se logró el aislamiento de 40 cepas, de las cuales se seleccionaron las dos con mayor tolerancia a los taninos de quebracho: E03-020-01 (25) y E03-017. Estas cepas fueron identificadas molecularmente como: *Aspergillus niger/awamori* y *Penicillium crustosum*, respectivamente. Los resultados demostraron la capacidad de ambas cepas para remover taninos a la concentración más alta de quebracho (20 %), a través de mecanismos mediados por actividad tanasa. *P. crustosum* alcanzó un valor máximo de remoción del 48,40 % con una actividad Tanasa de 3,70 U, mientras que *A. niger/awamori* logró una remoción del 31,26 % para con una actividad tanasa máxima de 3,58 U. En ambos casos, los valores más altos de remoción y actividad enzimática se registraron a las 288 horas de evaluación.

Los análisis estadísticos evidenciaron una respuesta sostenida y eficiente a concentraciones elevadas (20 %) por parte de *P. crustosum*. Los análisis de FTIR y SEM confirmaron alteraciones morfológicas en la membrana celular y químicas producto de la exposición a los taninos. Estos hallazgos sugieren que las cepas fúngicas seleccionadas presentan potencial para ser aplicadas en procesos de biorremediación de efluentes industriales de curtiduría abriendo la posibilidad de desarrollar estrategias sostenibles para la mitigación de estos contaminantes.

Palabras clave: Biodegradación, curtiembres, hongos.

ABSTRACT

The tanning industry generates effluents characterized by high organic load, phenolic compounds, and heavy metals. Among these contaminants, tannins used as tanning agents stand out due to their molecular complexity and high recalcitrance. Their discharge without proper treatment causes alterations in water quality, making them a critical challenge for environmental management. In particular, quebracho tannins (*Schinopsis balansae*), widely used in the city of Arequipa (PIRS), represent a persistent fraction in the industrial effluents of this region.

The tests began with the determination of the tolerance index on solid medium, phenol removal assays in liquid medium supplemented with quebracho in solution (7,5, 10, 15, and 20 %), and quantification of tannase enzymatic activity in liquid medium supplemented with tannic acid in solution (7,5–20 %). In addition, sequencing of the ITS (Internal Transcribed Spacer) region was performed for the selected strains, along with structural and chemical analyses through scanning electron microscopy (SEM) and Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR).

A total of 40 strains were isolated, from which the two with the highest tolerance to quebracho tannins were selected: E03-020-01 (25) and E03-017. These strains were molecularly identified as *Aspergillus niger/awamori* and *Penicillium crustosum*, respectively. Results demonstrated the ability of both strains to remove tannins at the highest quebracho concentration tested (20 %), through mechanisms mediated by tannase activity. *P. crustosum* achieved a maximum removal of 48,40 % with a tannase activity of 3,70 U, while *A. niger/awamori* reached a removal of 31,26 % with a maximum tannase activity of 3,58 U. In both cases, the highest values of removal and enzymatic activity were recorded at 288 hours of evaluation.

Statistical analyses evidenced a sustained and efficient response to high concentrations (20 %) by *P. crustosum*. Furthermore, FTIR and SEM analyses confirmed morphological alterations in the cell membrane and chemical changes resulting from tannin exposure. These findings suggest that the selected fungal strains present significant potential for application in the bioremediation of tannery effluents, opening the possibility of developing sustainable strategies for the mitigation of these pollutants.

Keywords: Biodegradation, tannery, effluents, fungus.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN 1

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO 4

1.1. La industria del cuero..... 5

1.2. El proceso de curtido 5

1.2.1. Etapa preparatoria 5

1.2.2. Fase inicial o “beam house” 5

1.2.3. Curtido 6

1.2.4. Post-curtido 8

1.3. Contaminación ambiental generada por la industria de la curtiembre 9

1.3.1. Contaminación atmosférica 9

1.3.2. Contaminación acústica 9

1.3.3. Contaminación del suelo 10

1.3.4. Contaminación del agua 10

1.3.5. Contaminación del agua generada por la industria del cuero 10

1.4. Parámetros de calidad del agua 11

1.4.1. Temperatura 11

1.4.2. pH 11

1.4.3. Oxígeno disuelto (OD) 11

1.4.4. Demanda biológica de oxígeno (DBO) 12

1.4.5. Sólidos totales disueltos (STD) y sólidos totales suspendidos (STS) 12

1.5. Taninos 12

1.5.1. Clasificación 13

1.5.2. Toxicidad por taninos 14

1.5.3. Contaminación por taninos en los efluentes de curtiembre 14

1.5.4. Degradación de taninos 14

1.5.5. Cuantificación de la degradación de taninos 15

1.6. Tecnologías actuales para el tratamiento de efluentes del cuero 15

1.6.1. Procesos avanzados de oxidación 15

1.6.2.	Tratamientos biológicos.....	16
1.6.3.	Adsorción.....	16
1.6.4.	Procesos de separación por membrana	16
1.6.5.	Coagulación/floculación	16
1.6.6.	Biorremediación.....	16
1.6.7.	Micorremediación.....	16
1.6.8.	Actividad tanasa.....	17
1.6.9.	Cuantificación de la actividad tanasa.....	18
1.6.10.	Análisis de FTIR y SEM.....	18
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS		20
2.1	Lugar de ejecución.....	21
2.2	Materiales.....	21
2.2.1	Material Biológico	21
2.2.2	Reactivos químicos	21
2.2.3	Material de laboratorio.....	21
2.2.4	Aparatos y equipos.....	22
Métodos.....		22
2.2.5	Aislamiento de a partir de efluentes de curtido y recurtido	22
2.2.6	Evaluación de la tolerancia	25
2.2.9	Diseño experimental	31
2.2.10	Identificación molecular de las cepas seleccionadas	31
2.2.11	Determinación de cambios químicos y morfológicos (FTIR y SEM)	32
2.3	Diagrama de flujo de actividades.....	33
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN		34
3.1	Aislamiento de hongos filamentosos de efluentes de taninos de curtiembre.....	35
3.2	Evaluación de la tolerancia	35
3.3	Identificación molecular de las cepas seleccionadas capaces de degradar taninos	46
3.4	Determinación de la capacidad de remoción de taninos	48
3.5	Evaluación de la actividad tanasa	54
3.6	Determinación de la eficiencia de la biodegradación	64
3.6.1	Determinación del porcentaje de remoción de fenoles	64
3.6.2	Eficiencia de la biodegradación	69
3.7	Determinación de cambios químicos y morfológicos (FTIR y SEM)	75
3.8	SEM	80

CONCLUSIONES	83
RECOMENDACIONES.....	84
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Proporciones de tanino de quebracho para determinar la tolerancia de las cepas	27
Tabla 2. Proporción de quebracho y medio de cultivo por frasco de 50 mL	28
Tabla 3. Proporciones empleadas de ácido gálico.	28
Tabla 4. Proporción de ácido tánico (g) por frasco de 50 mL.	29
Tabla 5. Elaboración de las soluciones estándar.....	30
Tabla 8. Evaluación y contraste de la tolerancia de las cepas por porcentaje de quebracho ..	43
Tabla 9. Valores de absorbancia obtenidos para las soluciones estándar de ácido gálico.....	49
Tabla 10. Evaluación y comparación de la concentración de ácido gálico producido.	50
Tabla 11. Evaluación y contraste de la concentración de ácido gálico producido.....	52
Tabla 12. Absorbancias obtenidas para cada solución estándar de ácido gálico.	54
Tabla 13. Evaluación y contraste de la actividad enzimática tanasa.	56
Tabla 14. Evaluación y contraste de actividad tanasa de <i>A. niger/awamori</i> y <i>P. crustosum</i> ..	60
Tabla 15. Evaluación y contraste del porcentaje de remoción.....	64
Tabla 16. Evaluación y contraste de la remoción de <i>A. niger/awamori</i> y <i>P. crustosum</i>	67
Tabla 17. Eficiencia de biodegradación <i>A. niger/awamori</i> al 20% de concentración.	69
Tabla 18. Eficiencia de biodegradación <i>P. crustosum</i> al 20% de concentración.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Maquinaria empleada en la etapa “beam house”.....	6
Figura 2. Taninos empelados para el curtido de pieles.....	7
Figura 3. Sales de Cr_2O_3 empleadas en el procedo de curtido.....	8
Figura 4. Diagrama de el proceso inicial de curtido “beam house”.	8
Figura 5. Diagrama de post curtido.	9
Figura 6. Clasificación de los taninos y su estructura química.....	12
Figura 7. Mapa del PIRS.....	23
Figura 8. Toma de muestras líquidas y sólidas.....	24
Figura 9. Purificación de las cepas mediante 5 repliques.....	25
Figura 10. Preparación del medio de cultivo.	26
Figura 11. Cortes de micelio sembrados en medio solido con ácido tánico (10 g/L).....	26
Figura 12. Soluciones estándar de ácido gálico luego de la incubación.....	29
Figura 13. Soluciones estándar de ácido gálico luego de la reacción con rhodanina	31
Figura 14. Diagrama de flujo de actividades.	33
Figura 15. Purificación de las cepas fúngicas.....	35
Figura 16. Cepas sembradas en medio con ácido tánico (10 g/L) a las 216 h.....	35
Figura 17. Comparación del crecimiento entre las cepas en medio mínimo.....	39
Figura 18. Crecimiento micelial de las cepas a las 216 h de evaluacion.....	41
Figura 19. Comparación del crecimiento de las cepas en relación al quebracho	42
Figura 20. Contraste del índice de tolerancia de las cepas	45
Figura 21. Porcentajes de similitud de las especies analizadas con la cepa E03-020-01 (25)47	
Figura 22. Árbol filogenético de la cepa E03-020-01 (25).....	47
Figura 23. Porcentajes de similitud de las especies analizadas con la cepa E03-017.....	48
Figura 24. Árbol filogenético de la cepa E03-020-01 (25).....	48
Figura 25. Curva de calibración.....	49
Figura 26. Desarrollo de color de las muestras extraídas	50

Figura 27. Comparación de la concentración de ácido gálico (mg/mL).....	51
Figura 28. Contraste de la concentración de ácido gálico producido por las cepas.	53
Figura 29. Curva de calibración de ácido gálico	55
Figura 30. Comparación de la actividad tanasa de las cepas	56
Figura 31. Contraste de actividad enzimática tanasa de las cepas.....	57
Figura 32. Curvas de actividad enzimática de las cepas.....	58
Figura 33. Comparación de actividad enzimática tanasa de las cepas.....	61
Figura 34. Contraste del porcentaje de remoción de las cepas	65
Figura 35. Comparación del porcentaje de remoción de las cepas.....	68
Figura 36. Porcentaje de remoción de <i>A. niger/awamori</i> por U enzimáticas	70
Figura 37. Porcentaje de remoción por parte de <i>P. crustosum</i> por U enzimáticas	72
Figura 38. Espectros FTIR de la cepa <i>A. niger/awamori</i>	76
Figura 39. Espectros FTIR de la cepa <i>P. crustosum</i>	78
Figura 40. Micrografías SEM cepa <i>A. niger/awamori</i>	80
Figura 41. Micrografías SEM cepa <i>P. crustosum</i>	81

INTRODUCCIÓN

Se le conoce como “curtiembre” (*tanning* en inglés, de ahí el término “*tanino*”) al proceso de transformación de las pieles de animales en cuero para el uso humano mediante la utilización de extractos de plantas específicas¹. Para obtener un cuero duradero y no sujeto a descomposición, pasa por 3 etapas generales, pre curtido, curtido, y acabado².

La mayoría de los procesos de curtiembre se realizan en medio acuoso y se calcula que se pueden llegar a utilizar entre 50 y 100 L de agua por cada Kg de piel salada y el contenido de contaminantes presentes en las aguas residuales generadas por esta industria es difícil de conocer y puede variar dependiendo del proceso que se utilice, sin embargo, la mayoría de estos procesos poseen elementos comunes, como la materia suspendida, presencia de proteínas, componentes oxidables, además del color y olor desagradables. Es importante mencionar que dentro del proceso de curtiembre, los procesos de ribera son responsables del 60 % de materia suspendida y del 80 % de la carga contaminante total expresada en DBO³.

Los taninos o polifenoles vegetales se encuentran en la naturaleza en forma de metabolitos secundarios, son abundantes en ciertas partes de la planta como hojas, frutos y semillas. Son el segundo grupo de fenoles presentes en las plantas más abundante después de la lignina, difieren de otros compuestos fenólicos debido a que poseen la capacidad de precipitar proteínas a partir de soluciones formando fuertes complejos y reaccionando con otras macromoléculas⁴. Es a causa de su naturaleza polifenólica y a la presencia de iones cloruro y sulfato que no logran adherirse por completo a las pieles y son liberados a los efluentes⁵. Al emplear grandes cantidades de taninos, la industria de las curtiembres eleva considerablemente en sus aguas residuales la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), la demanda química de oxígeno (DQO) y los sólidos disueltos totales (STD). Por otro lado, estudios recientes han demostrado que durante el proceso de curtiembre solo el 20 % de los componentes aplicados, incluyendo los taninos son absorbidos por la piel animal, siendo el resto descartado a los cuerpos de agua⁶.

Actualmente, el panorama mundial de la producción de cuero ubica a Europa y Asia como los principales productores⁶⁻⁸. Se estima que el mercado europeo del cuero mueve alrededor de 8 billones de euros al año, teniendo como epicentro de producción en Italia, ya que posee aproximadamente el 60 % de las compañías de curtiembre y exporta más del 70 % de su producción total al resto del continente, debido a su gran importancia se aplica un riguroso control ambiental y también aplican tecnologías que permiten disminuir el impacto ambiental⁷. En Asia, se considera a la India como el principal productor de cuero y sus sub productos, se

estima que los residuos de esta industria presentan un promedio de 4300 mg/L de DBO y ~6200 mg/L de DQO, con niveles de Cr que oscilan entre los 23 y 46 mg/L⁸.

El panorama latinoamericano es, por otro lado, muy distinto, el país que domina el mercado del cuero es Argentina, altamente reconocido por su importancia en la ganadería y por lo tanto en la industria del cuero, en la región Matanza-Riachuelo, en la provincia de Buenos Aires, se encuentran alrededor de 24,000 negocios industriales dentro de los cuales, el negocio de las curtiembres es el responsable del 50 % de la contaminación de cuerpos de agua y se estima que este negocio utiliza en promedio 1 m³ de agua por cada cuero a tratar, según Martínez y Romero⁷ los principales parámetros que se utilizan para la cuantificación de la contaminación generada son: demanda biológica de oxígeno (DBO), demanda química de oxígeno (DQO), sólidos en suspensión (SS), Sólidos totales (ST), Cromo total (Cr), sulfuros (S), Amonio, Nitrógeno Orgánico, Flujo volumétrico, PH y alcalinidad. Se identifican como sustancias peligrosas: Cromo hexavalente, Aril-aminas, Pentaclorofenol (PCP), Formaldehído; productos con contenido de tributilestaño (TBT) y metales pesados como mercurio, Cadmio y Zirconio⁶. En el Perú, la industria de la curtiembre se desarrolla principalmente en las regiones de Trujillo, Lima y Arequipa. En Agosto del 2023 se aprueba el decreto supremo D.S N.º 010-2023-MINAM⁹ donde se señalan los Límites Máximos Permisibles para efluentes de las actividades de curtido y adobo de cuero, así como adobo y teñido de pieles, en este documento se indica que todas las empresas, nacionales o privadas que se dediquen a la manufactura del cuero deben cumplir con las especificaciones indicadas en dicho dispositivo legal y de lo contrario deberán ser sancionadas⁹. En la región de Arequipa, las empresas de curtiembres se localizan en la zona del Parque Industrial de Río Seco, en el distrito de Cerro Colorado y han formado la Asociación de Empresas de Curtiembres, Fabricantes de Calzado y Derivados del Cuero (Apymeco). En Mayo del 2023 los agremiados de esta asociación indicaron que debido a la carencia de una planta de tratamiento de aguas residuales, los límites máximos permisibles indicados por el Organismo de Evaluación y Fiscalización Ambiental (OEFA) no se encontraban acordes a la realidad de esta industria en el país y por ello aseguran que es imposible cumplir con estos límites¹⁰.

La tanin acil hidrolasa (TAH) o tanasa es una glicoproteína que posee actividad esterasa y despsidasa, se encarga de hidrolizar solamente los enlaces éster contenidos en galotaninos, elagitaninos y ésteres del ácido gálico sin comprometer la integridad de los enlaces carbono carbono. La mayoría de las enzimas tanasas que han sido caracterizadas poseen una temperatura ideal entre 30 °C y 40 °C y su máxima actividad oscila entre los pH 4,3-6,5¹¹. Existe una amplia

variedad de microorganismos capaces de producir esta enzima, entre ellos cepas bacterianas de *Bacillus pumilus*, *B. polymyxa*, *Corynebacterium sp*, *Klebsiella pneumoniae*, entre otros. Así también, algunos hongos también son capaces de producir esta enzima para la degradación del ácido tánico, entre ellos, hongos filamentosos como *Aspergillus Penicillium*, levaduras del género *Candida*, *Trichoderma*, *Fomes*, *Polyporus* y *Trametes*¹²

La industria del cuero ha ocupado históricamente un lugar importante a nivel global y está estrechamente vinculada al estilo de vida humano. En la actualidad, el cuero se considera casi un material de lujo, lo que ha generado un consumo masivo y, en consecuencia, un notable incremento en el impacto ambiental. En este contexto, la presente investigación tiene como objetivo evaluar la remoción biológica de taninos empleando quebracho en solución como modelo contaminante de estos efluentes por medio de cepas fúngicas nativas de los efluentes curtientes del Parque Industrial de Rio Seco en la ciudad de Arequipa.



CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1. La industria del cuero

El curtido de pieles es un procedimiento que se ha venido desarrollando desde hace miles de años, existe evidencia sobre el periodo neolítico en el que el hombre hacía uso de especies vegetales como cortezas, vainas y hojas con el objetivo de evitar la putrefacción de las pieles y a la vez brindarles una mayor resistencia, además, se han descubierto piezas de cuero procesadas por los egipcios por medio del método de curtido en aceite, aún en condiciones aceptables al día de hoy, sin embargo, es en el siglo XVIII en el que la alta demanda de pieles y la creciente industrialización generó el desarrollo de nuevas y mejores tecnologías para procesamiento del cuero a nivel industrial, así, para fines del siglo XIX ya se habían descubierto nuevos agentes curtientes que procesaban el cuero de manera más eficiente como el cromo y el alumbre².

1.2. El proceso de curtido

La industria del cuero tiene como meta transformar la piel animal en una materia prima que posea estabilidad y flexibilidad para así poder generar otros productos de alta calidad para fines diversos. Para obtener el cuero que todos conocemos, este pasa por 4 procesos generales: pre curtido, curtido y acabado, además también se suele emplear otro proceso al final llamado recubrimiento de superficie¹³.

1.2.1. Etapa preparatoria

- **Almacén o “ware house”**

En este proceso se almacenan las pieles para su tratamiento, considerándose a bajas temperaturas y cubiertas en sal^{13,14}.

- **Salazón húmeda**

Se realiza con el objetivo de salar las pieles. Las pieles son concentradas en una pila y son remojadas en sal, este proceso se realiza durante un periodo de 30 días para conseguir una absorción completa de la sal por parte de las pieles^{13,14}.

- **Curado con salmuera**

Este método es más común y más eficiente que la salazón húmeda. En este proceso las pieles son colocadas en pozos contenidos con soluciones de sal y posteriormente se les aplica un surfactante líquido, en este proceso las pieles deberán ser conservadas en dicha solución durante 16 horas para asegurar la curación absoluta^{13,14}.

1.2.2. Fase inicial o “beam house”

- **Remojo**

Las pieles son remojadas en agua con el objeto de eliminar materia no deseada (sangre, tierra, polvo, estiércol, etc.)^{13,14}

- **Encalado**

En este proceso las pieles se someten a remojo en una solución de cal, sodio y sulfuro durante 1 día y medio, esto, con la finalidad de eliminar completamente el pelo y uñas, además, sirve para eliminar ciertas proteínas y grasas^{13,14}.

- **Despellejamiento**

Sirve para eliminar tejidos innecesarios como carne y tejido adiposo, este procedimiento se realiza por medio de una cuchilla giratoria^{13,14}.

- **Descalcificación**

Se emplea cloruro de amonio. Se realiza para conseguir la eliminación de los restos alcalinos y así remover la hinchazón de las fibras^{13,14}.

- **Rendido**

Esta etapa se lleva a cabo con el objeto de brindar flexibilidad al cuero y eliminar proteínas no deseadas^{13,14}.

- **Encurtido**

También denominado decapado, es la etapa final previo al curtido de las pieles, durante este proceso se añade sal a las pieles y posteriormente ácido sulfúrico, la sal es añadida con el propósito de evitar la hinchazón del ácido y así conseguir el equilibrio químico¹³. Al realizar este paso se podrán almacenar las pieles durante largos periodos de tiempo sin comprometer la integridad de las mismas^{13,14}.



Figura 1. Maquinaria empleada en la etapa “beam house”¹⁴.

1.2.3. **Curtido**

En el proceso de curtido se les confiere durabilidad a las pieles y evita su descomposición, en este proceso las pieles son cargadas en un tambor y son sumergidas en la solución curtiente que puede ser vegetal o de cromo^{13,14}.

- ***Curtido vegetal***

El curtido vegetal es el método más antiguo para la manufactura del cuero, se extraen los componentes químicos a partir de extractos de plantas llamados “taninos”, cada planta produce taninos con sus propias características (color, suavidad, etc.)^{14,16}.

Consiste en sumergir las pieles en recipientes de madera en una solución con elevadas concentraciones de taninos en agitación con el objeto de saturar la piel con estos compuestos, químicamente, los taninos reaccionan con las proteínas de la piel del animal (colágeno) generando una unión fuerte y atribuyendo firmeza a la piel, mayor resistencia al calor y a la contaminación, este método se lleva a cabo en dos etapas que buscan penetrar el interior de la piel con la solución de taninos y fijar el agente sobre las fibras de colágeno¹⁵. El proceso se realiza bajo las condiciones de pH y temperatura de 3-6 y 38 °- 40 °C respectivamente. Para un buen curtido, es necesario agregar alrededor de un 60 % del tanino. Este proceso se realiza con la finalidad de otorgar a las pieles la resistencia al desarrollo de microorganismos, dureza y respirabilidad^{2,15,16}.



Figura 2. Taninos empelados para el curtido de pieles. Castaño (izquierda), Tara (medio) y quebracho (derecha)¹⁷.

- ***Curtido al cromo***

El curtido al cromo se realiza mediante la adición de sulfato y sales de cromo, este método brinda una mayor flexibilidad y resistencia a la pérdida de color, este proceso empela sales de cromo (III), produciendo pieles de tonos azulados (wet blue) que posteriormente pueden ser tenidas de cierta variedad de colores, produciendo pieles de temple medio a suave, el curtido al cromo usualmente emplea un estándar de cromo (Cr_2O_3), un polvo verde azulado al 26 % del compuesto^{14,16}. Los cueros “wet blue” pueden ser almacenados por largos periodos de tiempo, sin embargo, estos deben ser almacenados húmedos (60 % de humedad), esta etapa de almacén húmedo es sumamente importante para mantener la uniformidad de las pieles¹⁴.



Figura 3. Sales de Cr_2O_3 empleadas en el proceso de curtido¹⁸.

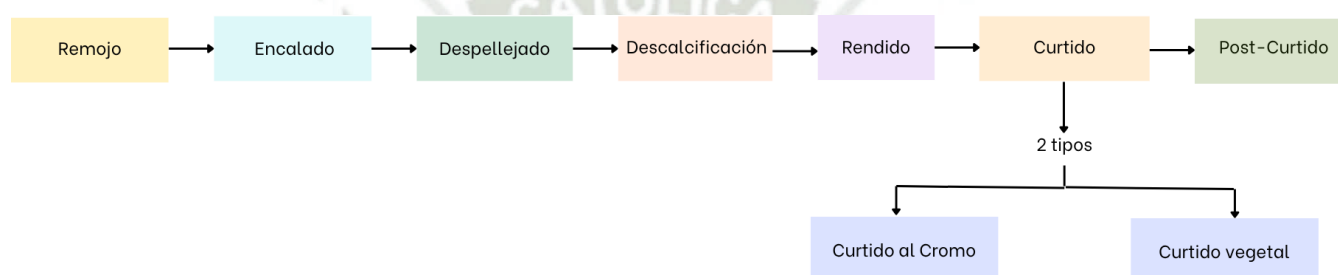


Figura 4. Diagrama del proceso inicial de curtido “beam house”.

1.2.4. *Post-curtido*

- **“Sammig”**

Las pieles pasan por unos rollos que se encargan de escurrir el agua acumulada^{2,15,16}.

- **División**

Las pieles son divididas en piel flor y piel carne^{2,15,16}.

- **Desbaste**

En este proceso la piel flor o cuero flor se procesa mediante presión por rodillos de acero para obtener un grosor uniforme^{2,15,16}.

- **Neutralización**

Se neutralizan todos los ácidos restantes por medio de la acciones de álcalis suaves para la prevención de posibles daños al cuero durante el secado y así prepararlo para las etapas siguientes^{2,15,16}.

- **Teñido**

Esta es la etapa final y de acabado de las pieles, en este proceso se tiñen las pieles de una gran variedad de colores de acuerdo a la demanda y tendencia del mercado^{2,14-16}.



Figura 5. Diagrama de post curtido.

1.3. Contaminación ambiental generada por la industria de la curtiembre

Se denomina contaminación a la acción de alteración de un ecosistema, ya sea en sus elementos abióticos o bióticos, esto por medio de la inserción de un nuevo compuesto al entorno ambiental o al aumento desmesurado de cierto componente ya existente en dicho hábitat, supone el consecuente deterioro de los recursos naturales, la salud de las especies animales y vegetales e incluso la de los seres humanos que ahí habitan así, la contaminación es un proceso, en el que se acumulan o insertan componentes (contaminantes) que alteran el equilibrio de un ecosistema y se mantienen en el mismo hasta ocasionar daños en el ambiente¹⁹.

Por otro lado, se define como contaminante al compuesto ajeno al ecosistema o cuyas concentraciones han sido elevadas por encima de los parámetros normales cuya presencia ejerce daños y altera el equilibrio ambiental, cabe destacar que el mecanismo de acción de un contaminante es la difusión, concentración y transformación, ya que, al ser liberado a la naturaleza, estos, son absorbidos por los propios ciclos naturales, entonces, al no poder degradar los agentes contaminantes, estos se concentran y se almacenan en el ecosistema¹⁹.

1.3.1. Contaminación atmosférica

El término contaminación atmosférica se refiere a la presencia de agentes dañinos dentro de la atmósfera cuyas concentraciones se encuentran por encima de los límites normales, ocasionando, de este modo, daños en la salud de la fauna del ecosistema y de las personas que en este habitan²⁰. La literatura señala a este tipo de contaminación como una de las más peligrosas y nocivas para la salud pública, además, todas las actividades realizadas por el hombre son causantes de la liberación de agentes contaminantes a la atmósfera terrestre, siendo las principales el transporte aéreo y vehicular, el cubismo doméstico de gas propano y las actividades de carácter industrial²¹. Sin embargo, dentro de la naturaleza también son liberadas sustancias biogénicas (ej. erupciones volcánicas) las cuales también contribuyen a la contaminación atmosférica, aunque en menor concentración^{21,22}.

1.3.2. Contaminación acústica

Este tipo de contaminación es uno de los que presenta más problemas de salud a la población, debido al ruido, el cual implica un daño considerable al bienestar de las personas y es un factor causante de estrés. Además, se ha demostrado que el ruido de las calles, principalmente el del transporte público, contribuye al aumento de riesgo de padecer un accidente cardiovascular,

por otro lado, el ruido generado por el tráfico nocturno puede generar trastornos en el sueño, aumentando los niveles de cortisol y, por ende, el estrés oxidativo en el cerebro y vasos sanguíneos²⁰.

1.3.3. Contaminación del suelo

La contaminación de los suelos es definida como la inserción de compuestos xenobióticos en los suelos y como la alteración de los componentes naturales de la tierra, es ocasionada principalmente por la industria agrícola sin supervisión y la deficiente eliminación de desechos por parte de las industrias, ya que se realizan prácticas insostenibles lo que propicia la propagación de contaminantes hacia los productos vegetales y por consecuencia hacia la industria alimentaria²⁰. Los contaminantes más nocivos para los suelos son los metales pesados, pesticidas, excipientes de productos farmacéuticos, etc. que generalmente son liberados en solución con el agua, los cuales se asientan en la tierra y posteriormente precipitan al subsuelo, contaminando así también las aguas subterráneas²².

1.3.4. Contaminación del agua

Se define como contaminación a la inserción de cualquier sustancia ya sea en estado sólido, líquido o gaseoso al ambiente a una velocidad mucho mayor comparado con lo que podría hacerse de manera natural, el agua es uno de los recursos más importantes y vitales para el desarrollo de la vida en el planeta²². Se considera que el agua se encuentra contaminada cuando se altera su calidad y se insertan nuevos componentes alterando sus propiedades, la contaminación de los cuerpos de agua que son ocasionados por la mano humana se produce principalmente por causa de las actividades económicas, industriales, domésticas, etc²¹. La descarga de materia ajena y/o sustancias nocivas por parte de empresas es lo que se define como contaminación industrial y es actualmente la mayor causante de la liberación de agentes tóxicos a los cuerpos de agua²⁰⁻²².

1.3.5. Contaminación del agua generada por la industria del cuero

Los mecanismos utilizados para obtener un cuero de alta calidad generan cantidades considerables de desechos de todo tipo (sólidos, líquidos y gaseosos), por ende, el proceso de curtido lleva consigo una producción inevitable de residuos sólidos, entre ellos, restos de pieles, conjuntos de pelo y polvos producto del pulido. Dowland et al¹³. indica que al menos el 80% de los desechos sólidos son generados en la etapa de pre curtido y el 20 % restante es generado en el post curtido¹³. Debido a que el propio proceso de curtido se realiza con la finalidad de brindar durabilidad y estabilidad a los cueros, el manejo y la gestión de los residuos sólidos presenta muchas dificultades al momento de lidiar con la generación de los lodos producidos por esta industria los cuales inevitablemente traen problemas y generan un impacto negativo

en la agricultura y ganadería, por otra parte, la mayoría de industrias se deshacen del pelo resultante por medio de incineraciones o es llevado a los vertederos lo que genera daños y contaminación del aire, agua y suelos¹³.

Las aguas residuales generadas por las curtiembres son un problema que ha ido creciendo de la mano con esta industria. Para el procesamiento de una tonelada métrica de cuero crudo (húmedo) son necesarios 40 m³ de agua y solo 72 Kg de 452 Kg de químicos empleados son absorbidos por las pieles, siendo los 380 restantes vertidos en el efluente, por otra parte, el 90 % de la contaminación causada es generada en la etapas de pre curtido y recurtido, el precurtido ocasiona grandes cambios de pH lo que provoca un aumento significativo en la demanda química de oxígeno (DQO), los sólidos disueltos totales, cloruros, etc. además, los compuestos empleados durante la remoción de pelo (cal y sulfuro) contribuyen con el 75 % de la DQO y el 84 % de la DBO²³.

1.4. Parámetros de calidad del agua

Las propiedades químicas, físicas y biológicas del agua son lo que le confieren su nivel de calidad y esta se determina de acuerdo a la finalidad de su uso (consumo humano, agricultura, industrial)²⁴.

1.4.1. Temperatura

Si la temperatura del agua aumenta de forma drástica genera una disminución en el oxígeno disuelto además de otros compuestos gaseosos a causa de la caída en las fuerzas de atracción a nivel molecular, por otro lado, si esta disminuye ocasiona un aumento en la concentración de oxígeno disuelto lo que, en consecuencia, altera la diversidad biológica del agua²⁴.

1.4.2. pH

Los cambios en el potencial de hidrógeno (pH) propicia el aumento de iones de hidrógeno (acidez), también, las alteraciones en el pH de los cuerpos de agua alteran las reacciones biológicas y vías metabólicas de los organismos que habitan en ella a su vez alterando la producción de CO₂²⁴.

1.4.3. Oxígeno disuelto (OD)

Este parámetro indica directamente los niveles de contaminación que posee un cuerpo de agua ya que los niveles de oxígeno disuelto disminuyen de acuerdo a los cambios ocasionados en las características del agua (color, sabor, olor, etc.), las reacciones de fotosíntesis tienen un lugar importante ya que de ellas depende la liberación de oxígeno en la superficie de los cuerpos de agua²⁴.

1.4.4. *Demanda biológica de oxígeno (DBO)*

Al igual que los niveles de oxígeno disuelto, la demanda biológica de oxígeno es otro indicador esencial para la determinación del grado de contaminación del agua (contaminación orgánica ya que, si los niveles de DBO aumentan, indicaría un mayor grado de contaminación orgánica²⁴.

1.4.5. *Sólidos totales disueltos (STD) y sólidos totales suspendidos (STS)*

Indica la cantidad de materia sólida presente en el agua ya sea de naturaleza orgánica o inorgánica. El aumento de estos parámetros es directamente proporcional al aumento de los niveles de turbidez en los cuerpos de agua²⁴.

1.5. Taninos

Los compuestos polifenólicos constituyen un gran gama de compuestos cuya característica principal es la presencia de al menos un grupo hidroxilo (-OH) unido a 1 o más de sus anillos fenólicos, se encuentran dentro del grupo de los metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino Plantae y están en casi el 20 % del peso de las plantas en general y en plantas utilizadas para la producción de taninos se encuentran en casi 40 % de su peso total²⁵. Son compuestos polifenólicos solubles y se clasifican en condensados, hidrolizables y florotaninos, los taninos hidrolizables se dividen en elagitaninos y galotaninos (ácido tánico)^{25,26}.

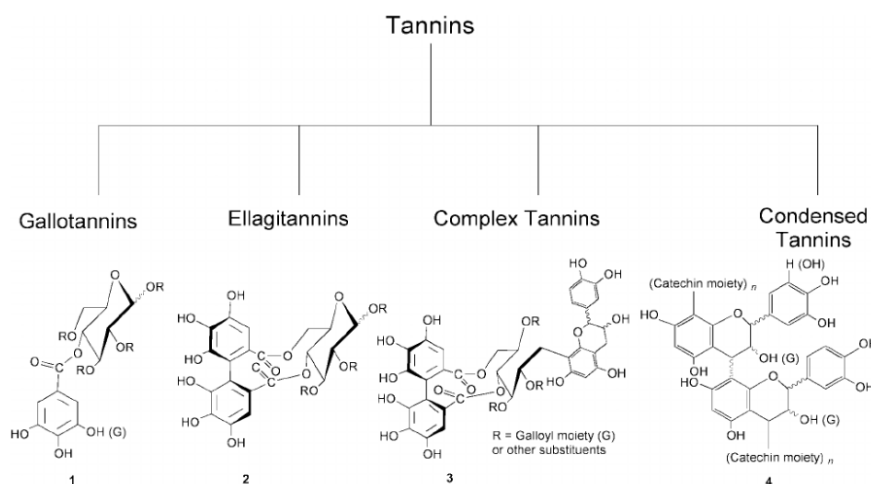


Figura 6. Clasificación de los taninos y su estructura química²⁷.

Los galotaninos son el tipo de taninos que se caracterizan por presentar uniones entre sus unidades de galoilo o derivados metapepsídicos con diferentes unidades de poliol, catequina o triterpenoides. Los elagitaninos son todos los taninos que presentan por lo menos 2 unidades de galoilo acopladas con enlaces C-C entre sí y no poseen una unión glucosídica de catequina²⁷.

Los taninos complejos se definen así por la presencia de una unión glicosídica entre una unidad de catequina y un galotanino o un elagitanino, finalmente, los taninos condensados son todas aquellas proantocianidinas (oligoméricas y poliméricas) formadas por medio de la unión C-4 a una catequina con C-8 o C-6 de la consecuente catequina monomérica²⁷.

1.5.1. *Clasificación*

- ***Galotaninos***

Los galotaninos son considerados como las formas más simples dentro de la clasificación de los taninos hidrolizables, se caracterizan por presentar un residuo de poliol o de polifenol, aunque la mayoría de los galotaninos suelen presentar un residuo de poliol derivado de la D-glucosa los grupos hidroxilo presentes en los residuos de poliol pueden ser sustituidas por unidades de galilo ya sea de forma parcial o completa²⁷.

- ***Elagitaninos***

Los elagitaninos constituyen el grupo más grande de taninos conocido en la actualidad. Estos, son formados partiendo de los galotaninos a los que se le acopla por lo menos 2 unidades de galilo de manera oxidativa produciendo de esta manera una unidad denominada dihidroxifenil (HHDP) axialmente quiral²⁷.

- ***Taninos complejos***

Las diferentes estructuras de los taninos complejos se caracterizan por la formación de una unidad de galotanino o elagitanino y una unidad de catequina²⁷.

- ***Taninos condensados***

Los taninos condensados están formados por proantocianidinas (oligoméricas y poliméricas) que consisten en unidades de flavan-3-ol, lo que también se le conoce como catequinas, la síntesis de los taninos condensados se lleva a cabo mediante la condensación sucesiva de los bloques básicos, alcanzando un grado de polimerización de hasta más de 50 bloques, cabe destacar que la producción mundial de taninos para el procesamiento del cuero se centra en este tipo (90% de la producción comercial)^{27,28}.

Uno de los tipos de taninos condensados más comunes es el quebracho, derivados de las especies *Schinopsis balansae* y *Schinopsis lorentzii*, nativas de Sudamérica. Se obtiene por lixiviación bajo presión a temperaturas altas (~110 °C), posteriormente, la solución obtenida se evapora al vacío, obteniendo como producto final un polvo fino, soluble en agua tibia y pH ligeramente alcalino, se le atribuyen funcionalidades carboxílicas y fenólicas con núcleos fenólicos, sin embargo, el quebracho no posee una composición fija²⁸.

1.5.2. *Toxicidad por taninos*

Actúan como inhibidores del crecimiento sobre microorganismos por lo que también se les utiliza como agentes antimicrobianos, sin embargo, son agentes recalcitrantes a la degradación biológica y altamente dañinos para las poblaciones acuáticas ya que disminuyen significativamente el metabolismo de proteínas y en general el crecimiento de los animales⁸. En la industria del cuero, los taninos son uno de los compuestos más comunes y abundantes liberados en sus efluentes, lo que significa que su adición a los cuerpos de agua genera un aumento en la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), los sólidos disueltos totales, y la demanda química de oxígeno⁶.

1.5.3. *Contaminación por taninos en los efluentes de curtiembre*

La industria del cuero puede llegar a consumir un promedio de 80 m³ de agua para cada tonelada de piel cruda, lo que a su vez genera la liberación de enormes cantidades de contaminantes a los cuerpos de agua, entre ellos, taninos vegetales y sintéticos⁸.

Los taninos vegetales más utilizados durante el proceso de curtido vegetal son: Quebracho, Mimosa y Tara, estos, son compuestos polifenólicos que presentan pesos moleculares que van de 500 a 20000 Da cuya presencia atrae dificultades en los procesos convencionales de tratamiento de aguas, por ejemplo, en procedimientos como la coagulación/floculación dificultan la eficiencia del tratamiento debido a su alta solubilidad en agua lo que genera la necesidad de emplear elevadas concentraciones de coagulantes metálicos para lograr una adecuada sedimentación, elevando así las concentraciones de contaminantes metálicos en el agua²⁹.

Además, a causa de la naturaleza y la compleja composición química de los taninos es muy difícil conseguir su biodegradación bajo condiciones naturales y es en el proceso de recurtido donde se observa la mayor cantidad de taninos sintéticos y naturales liberados al efluente, esto, a causa de que ciertos tipos de taninos (vegetales y sintéticos) que presentan en su estructura iones cloruro y sulfato, los cuales no logran adherirse a las fibras de colágeno del cuero y terminan siendo liberados al efluente³⁰, por ello, las aguas residuales resultantes del proceso de curtido presentan concentraciones de sulfatos y cloruros de hasta 2409 mg/L y 5002 mg/L respectivamente⁵.

1.5.4. *Degradación de taninos*

Los taninos son compuestos capaces de inhibir el crecimiento de un gran número de microorganismos y se comportan como recalcitrantes ante la biodegradación³¹. Los taninos hidrolizables presentan una menor resistencia a ataques microbianos en comparación con los de tipo condensado y por esta razón la degradación natural de taninos en suelos y agua suele

ser interrumpida o alargada³². A pesar de su toxicidad en varias especies de microorganismos, los taninos pueden ser degradados en taninos oligoméricos y otros compuestos secundarios como el ácido gálico y el pirogalol³³ por medio de microorganismos productores de la enzima tanasa, la cual cataliza la hidrólisis del enlace éster de galileo presente en los taninos^{8,32}.

Cómo métodos biológicos está el empleo de distintas especies fúngicas y bacterianas para realizar un proceso de biodegradación de taninos, las cuales deben su capacidad a la producción de la enzima tanasa, encargada de hidrolizar estos compuestos³¹. Se ha nombrado el empleo de bacterias como *Lactobacillus plantarum*³³, *Enterococcus faecalis*³⁴, *Serratia spp.* y *Pantoea sp.*⁴; por otro lado, también se ha reportado el uso de especies del género *Aspergillus* y *Penicillium* en cuanto a hongos microscópicos³⁵.

En cuanto a los métodos químicos y electroquímicos, se mencionan métodos de electrocoagulación y Procesos de Oxidación Avanzada: en cuanto a métodos de electrocoagulación se ha mencionado su empleo en aguas residuales sintéticas, con una alta eliminación de taninos presentes en el agua residual; por otro lado, también se ha comparado la eficiencia de electrocoagulación con nanopartículas de alumbre (AINPs), obteniendo remociones máximas de ácido tánico del 89,79 % y 96,33 % respectivamente^{36,37}. Es importante mencionar que se reportó a su vez que el empleo de electrocoagulación genera cantidades considerables de Carbono Orgánico Total (COT), dando la opción de poder optar por métodos más eficientes y de menor costo, por el lado de los Procesos de Oxidación Avanzada, se han empleado métodos como el foto-Fenton así como también al UV/Persulfato, logrando excelentes resultados en la literatura³⁶⁻³⁹.

1.5.5. *Cuantificación de la degradación de taninos*

La cuantificación de taninos se realiza por diversos métodos, los cuales toman en consideración la especificidad con respecto al analito dentro de todo el grupo de taninos, además de si el tanino es hidrosoluble o condensado, en tal caso, se ha reportado en la bibliografía métodos como HPLC⁴⁰, métodos basados en quimioluminiscencia^{41,42}, fluorométricos⁴³, inyección en flujo⁴⁴ y el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu²⁵.

1.6. *Tecnologías actuales para el tratamiento de efluentes del cuero*

1.6.1. *Procesos avanzados de oxidación*

Esos procesos abarcan métodos químicos, electroquímicos y fotoquímicos con el fin de generar radicales hidroxilo (OH⁻) y emplearlo como principal agente oxidante, son conocidos por gran versatilidad y eficiencia en la degradación de agentes contaminantes, dentro de estos procesos, los más estudiados comprenden: Oxidación electroquímica, degradación sono-electroquímica, oxidación fotoelectrocatalítica, tratamientos fotocatalíticos, métodos con ozono y la oxidación

con óxido de cloro, los cuales han demostrado la remoción eficiente de diferentes parámetros, entre ellos, DQO, Cr (VI), DBO, turbidez, STD y STS⁴⁵.

1.6.2. Tratamientos biológicos

Dentro de la gran diversidad de procedimientos de tratamiento biológico para la remediación de aguas destacan los métodos aeróbicos (lodos activados), métodos que emplean algas, bacterias, hongos y enzimas capaces de reducir los niveles de DQO, DBO, Cr (VI), colorantes industriales, entre otros presentes en las aguas residuales de esta industria⁴⁵.

1.6.3. Adsorción

Método muy eficiente para el tratamiento y remoción de metales pesados, colorantes y compuestos aromáticos, presenta costos bajos y facilidad de operación, este proceso ha sido muy estudiado para la remoción de colorantes industriales⁴⁵.

1.6.4. Procesos de separación por membrana

Estos métodos tienen la capacidad de separar sustancias disueltas presentes en los efluentes. Se tienen: microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración y ósmosis (directa e inversa), los estudios han demostrado que la utilización de estos procesos permite la disminución de los niveles de DQO, remoción de color, DBO, disminución de la dureza del agua, STD, STS y Cr (VI)⁵.

1.6.5. Coagulación/floculación

El método permite la separación de partículas de 0,1 a 100 μm , presenta facilidad de operación, bajo costo y una muy buena eficiencia, dentro de estos métodos se incluye a la electrocoagulación y la oxidación/coagulación, se ha probado un gran variedad de potenciales floculantes para el tratamiento de efluentes de curtido que han evidenciado la disminución de DQO, SST y Cr (III)³⁰.

1.6.6. Biorremediación

Se define como biorremediación a la disminución del impacto ambiental generado por la mano humana mediante el aprovechamiento de la facilidad que poseen ciertos organismos biológicos de eliminar diversos contaminantes, hoy en día es posible modificar condiciones de crecimiento y propiciar la degradación de un contaminante específico, esta técnica adquiere diferentes nombres dependiendo del agente biológico que se vaya a emplear, fitorremediación (plantas), micro remediación (bacterias), micorremediación (hongos), además existe otra alternativa a la fitorremediación en la que se utiliza algas como agente remediante llamada ficorremediación²³.

1.6.7. Micorremediación

Se le conoce como micorremediación al aprovechamiento de la capacidad de estos organismos de secretar enzimas capaces de hidrolizar diversas sustancias poliméricas de interés para la

disminución de los niveles de un contaminantes como metales tóxicos y otros compuestos inorgánicos presente en un efluente de agua⁴⁶.

Los hongos permiten la absorción o biorreducción de sustancias contaminantes orgánicas e inorgánicas, este proceso se basa en la captura pasiva de la sustancia de interés en medios acuosos a través de la biomasa fúngica, lo que propicia la remoción segura y eficaz de diversos contaminantes^{46,47}. Las paredes celulares de los hongos son ricas en grupos funcionales (amina, hidroxilo, carboxilo, etc.) con capacidad de unión a metales y complejos inorgánicos permitiendo la captura y contención de estos contaminantes en la biomasa fúngica, estos procesos se pueden clasificar como: sorción en la superficie celular, acumulación intracelular y precipitación/acumulación extracelular⁴⁷.

- ***Micorremediación de efluentes de taninos presentes en efluentes de curtiembre***

La micorremediación es definida como un método que permite la remoción de contaminantes en un cuerpo de agua o efluente por medio del aprovechamiento de la capacidad que tienen los hongos de absorber contaminantes, el uso de hongos para la remoción de taninos aprovecha la producción de enzimas reductoras de ácido tánico (tanasa) con el fin de disminuir la concentración de estos contaminantes en el efluente⁴⁸.

El género *Aspergillus* es uno de los productores de enzima tanasas más estudiados debido a su interés industrial, existe evidencia de la producción eficiente de tanasa por especies de *A. oryzae*, *A. flavus* y *A. japonicus* en comparación con *Penicillium*, siendo *A. oryzae*, *A. niger*, *A. boltshauseri* e *A. viciae* los mayores productores de tanasa⁴⁹.

1.6.8. Actividad tanasa

La tanin acil hidrolasa (E.C.3,1,1,20) es una enzima producida por una gran variedad de microorganismos, es inducible y se encarga de catalizar la reacción de rompimiento entre los taninos hidrolizables y los ésteres de ácido gálico, generando como productos glucosa y ácido gálico, en las plantas, esta enzima se encuentra en abundancia en especies con alto contenido de taninos (frutas, hojas y corteza), sin embargo, la fuente más confiable de esta enzima es la microbiana, dependiendo del organismo empleado y las condiciones dadas, esta enzima puede expresarse de forma inducida o constitutiva, para los microorganismos con resistencia a los taninos se les puede inducir la expresión de esta enzima aumentando los niveles de ácido tánico en su ambiente^{50,51}. Las tanasas poseen sus propios niveles óptimos de temperatura que varían entre 40 ° a 80 °C o 30 ° a 70 °C y sus rangos de pH óptimo oscilan entre 3 y 8. Se emplean diversos compuestos como sustrato, pero los más eficientes son el ácido tánico y el galato de metilo encontrando valores de Km óptimos de 0,445 a 32 mM y de 0,2 a 14 mM para cada sustrato respectivamente, su peso molecular oscila entre 31 a 90 kDa, para las tanasas

bacterianas y 45 a 310 kDa, además, posee un sin número de aplicaciones industriales (alimentos, cuero, bebidas, productos farmacéuticos, etc.), es empleada para la industria alimentaria en la producción de ácido gálico (té), se utiliza como clarificador de cerveza y jugos y en la remediación es utilizada para el tratamiento de efluentes industriales⁵¹. Como se ha mencionado anteriormente, esta enzima se puede inducir en presencia de ácido tánico y es producida por un extenso número de microorganismos, géneros de bacterias como: *Bacillus*, *Lactobacillus* y clases de hongos filamentosos como *Aspergillus*, y *Penicillium*^{6,8,25,52}.

Para la detección de microorganismos capaces de producir esta enzima se hace uso de medios de cultivo enriquecidos con ácido tánico para su utilización como sustrato, generando así la sobreexpresión del gen para tanasa, esta degrada el ácido tánico en el medio, generando glucosa y ácido gálico que posteriormente se incorporan en el ciclo del TCA (ciclo de Krebs). Al degradar el ácido tánico se genera una zona “de hidrólisis” que actúa como indicador de la presencia de esta enzima. En el caso de los hongos, es recomendable que se utilice un medio selectivo con la adición de ácido tánico en concentraciones de 1 % a 3 %^{8,52}

1.6.9. Cuantificación de la actividad tanasa

Para la determinación de actividad enzimática de tanin acil hidrolasa se han descrito una gran variedad de métodos como: titrimetría, espectrofotometría UV, cromatografía de gas, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cada uno con sus propias limitaciones metodológicas, económicas y de demanda de tiempo, sin embargo, el método más empleado por los investigadores en la actualidad es el método colorimétrico propuesto por Mondal et al⁵³. se basa en el cambio generado en la densidad óptica del ácido tánico (sustrato) posterior a la digestión enzimática a 530 nm, permitiendo definir la actividad enzimática como la cantidad de enzima capaz de hidrolizar 1 mM de sustrato en 1 minuto⁵³.

1.6.10. Análisis de FTIR y SEM

• Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia infrarroja por la transformada de Fourier (FTIR) es un método que permite la observación de todo el espectro presente en la región infrarroja, en este equipo, la luz infrarroja es dividida por medio de espejos semi reflectantes (divisor de haz), mientras tanto, parte de la luz atraviesa la muestra y la otra es reflejada por medio de espejos, al llegar al detector, un patrón es registrado con diferencias destructivas y constructivas de acuerdo a las longitudes de trayectoria de los haces, lo que forma un interferograma, este posee el espectro de la fuente de luz excluyendo el espectro proveniente de la muestra, posterior a ello, el interferograma es transformado en un espectro por medio de un análisis de Fourier³¹. De esta manera, el espectro permite describir la intensidad de las longitudes de onda presentes en el

interferograma. Las unidades de las longitudes de onda se expresan como números de onda y con unidades de cm^{-1} para el eje de x y la transmitancia $T(= 10^{-A})$ en el eje y, los grupos funcionales pueden identificarse como bandas específicas o grupos de ellas en un espectro FTIR, así, se produce la absorción a causa de la energía emitida por los enlaces químicos y posteriormente, esta energía se transforma en energía cinética (vibraciones)³¹. Las bandas serán posicionadas de acuerdo al tipo de enlace y de los átomos que lo conforman, de este modo permite la identificación cualitativa de los grupos funcionales que se encuentran en una determinada muestra³¹.

El análisis por FTIR permite la evaluación de una gran número de características en especies fúngicas, como la demostración de diferencias en la composición de las hifas, la composición química de las paredes celulares y citoplasmas y sus cambios a lo largo del desarrollo del hongo, consecuencias bioquímicas de mutaciones y cambios composicionales de las hifas debido al estrés ambiental, la degradación enzimática de especies fúngicas también puede ser visualizada por medio de FTIR, además de los cambios químicos en las cadenas poliméricas⁵⁴.

- ***Microscopía electrónica de barrido (SEM)***

La microscopía electrónica de barrido se fundamenta en la utilización de un haz de electrones cuidadosamente enfocado con el objeto de proveer una revelación de las características detalladas de la superficie de determinada muestra y a su vez proveer información sobre su estructura tridimensional^{55,56}.

Al enfocar un haz de electrones (muy fino) sobre la superficie de determinada muestra se genera una emisión de electrones, al compilar estas interacciones se realiza una amplificación resultando en la generación de una imagen de la superficie de la muestra en cuestión, esta amplificación se genera a causa del barrido del haz de electrones en una determinada área haciéndola cada vez más pequeña⁵⁵. De este modo, esta técnica se emplea en estudios de biodegradación con el objetivo de observar cambios estructurales en la superficie del microorganismo luego de su actividad⁵⁶.



CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Lugar de ejecución

La investigación se desarrolló en las instalaciones de la Universidad Católica de Santa María, utilizando los laboratorios del centro de Investigación, Desarrollo e Innovación INNOVERGY (Instituto de Investigación en Innovación en Energías Renovables y Medio Ambiente).

2.2 Materiales

2.2.1 *Material Biológico*

- Consorcio de hongos

2.2.2 *Reactivos químicos*

- Agar Sabouraud
- Nitrato de sodio NaNO_3
- Cloruro de potasio
- Sulfato de magnesio heptahidratado
- Fosfato monopotásico KH_2PO_4
- Nitrato de amonio NH_4NO_3
- Fosfato disódico Na_2HPO_4
- Sulfato de magnesio heptahidratado $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- Extracto de levadura
- Glucosa
- Agar
- Ácido gálico
- Agua desionizada
- Reactivo de Folin-Ciocalteu
- Carbonato de sodio al 20 %
- Citrato de trisodio dihidratado $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- Ácido cítrico $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$
- Metil galato
- Cloruro de sodio
- Rhodanina metanólica
- Hidróxido de potasio
- Bromuro de potasio grado infrarrojo
- Extracto de quebracho

2.2.3 *Material de laboratorio*

- Frascos estériles de tapa rosca de 100 y 200 mL
- Probetas de 50, 100 y 200 mL
- Beakers
- Pipetas
- Matraces Erlenmeyer
- Placas de petri
- Espátulas
- Picetas
- Micropipetas
- Placas porta objetos
- Cubreobjetos
- Vernier
- Columna de celulosa DEAE
- Mortero de ágata

2.2.4 Aparatos y equipos

- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- Incubadora New Brunswick S41i
- Cocinilla eléctrica
- Thermo mixer Eppendorf PESACON ThermoMixer C
- Centrifugadora Eppendorf Centrifuge 5430 R
- Espectrofotómetro BOECO Germany S-220 Spectrofotometer
- Agitador eppendorf Innova S44I
- Balanza analítica
- Espectrómetro FTIR Nicolet iN10 FT-IR Microscope
- Liofilizador CHRIST Alpha 1-2 Ldplus
- Nicolet In10 FT-IR Microscope
- Microscopio electrónico de barrido (SEM)

Métodos

2.2.5 Aislamiento de a partir de efluentes de curtido y recurtido

Ubicación de los puntos de muestreo para la obtención de hongos filamentosos

El aislamiento de las cepas fúngicas se realizó a partir de efluentes industriales recolectados en el Parque Industrial Río Seco (PIRS), ubicado en la ciudad de Arequipa, Perú. Los efluentes

fueron obtenidos del sistema común de descarga utilizado por diversas curtiembres que operan en la zona. Esta zona concentra una alta actividad del rubro curtidor, lo cual garantiza la presencia de taninos y otros compuestos propios del proceso de curtido y recurtido de pieles. Las coordenadas de los puntos de muestreo se registraron con un sistema GPS bajo el datum WGS84 y posteriormente se transformaron al sistema de coordenadas UTM, zona 19S (hemisferio sur). Los puntos se localizaron en las siguientes posiciones:

- Punto 1: E = 208 592 m, N = 8 090 981 m
- Punto 2: E = 208 683 m, N = 8 090 963 m
- Punto 3: E = 208 449 m, N = 8 090 673 m

En la Figura 7 se muestra el mapa de ubicación del PIRS, indicando el punto aproximado de muestreo.

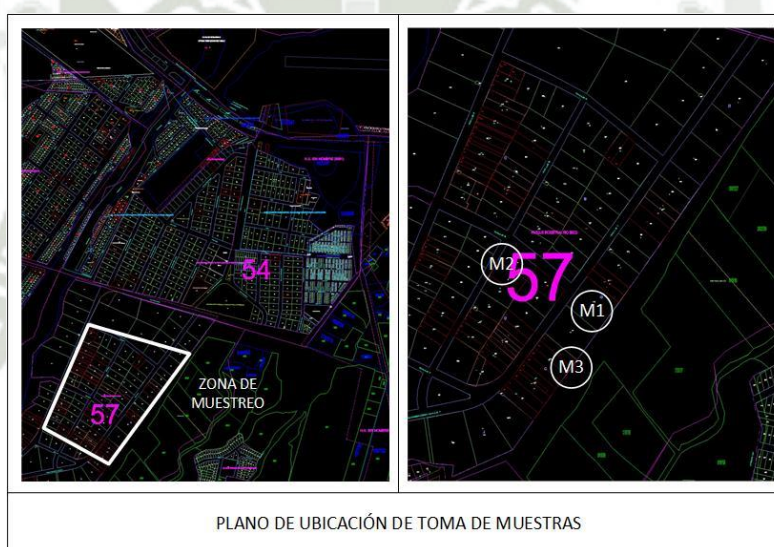


Figura 7. Mapa del PIRS, se señala con la viñeta la ubicación aproximada de los efluentes de curtiembre donde se realizó el muestreo.

Se tomaron muestras a partir de las zonas de contacto entre el efluente y la superficie sólida de los alrededores de pozas, canaletas y lagunas formadas, en donde se evidencian asentamientos biológicos (Figura 8). Las muestras (sólidas y líquidas) se almacenaron en frascos estériles de plástico, 50 mL y 50 g para las muestras líquidas y sólidas respectivamente. Finalmente, fueron conservadas a 4°C durante su transporte.



Figura 8. Toma de muestras líquidas y sólidas (izquierda) Zona de muestreo (canaleta) (derecha).

Cultivo de las cepas de hongos filamentosos de efluentes de curtiembre

Aislamiento

El aislamiento se realizó a partir de las muestras sólidas y líquidas:

- a) Líquidas:** Se llevaron a cabo diluciones seriadas (hasta 10^{-5} (v/v)), posterior a ello, se tomaron 50 μ L y se sembraron por triplicado en placas Petri de agar Sabouraud por el método de agotamiento.
- b) Sólidas:** Se realizó una dilución previa 1:10 (p/v), para lo cual, se pesó 1 g de materia sólida y se diluyó con 9 mL de agua destilada estéril, se agitó vigorosamente y a partir de esta solución se hicieron diluciones posteriores (hasta 10^{-5} (v/v)). Finalmente, se tomaron 50 μ L y se sembraron por triplicado en placas Petri de agar Sabouraud⁵⁷.

Purificación

La purificación de las muestras se llevó a cabo mediante 05 repiques en placas de agar Sabouraud y se seleccionaron los mejores inóculos.



Figura 9. Purificación de las cepas mediante 5 replices.

2.2.6 Evaluación de la tolerancia

Pre-tolerancia: Selección de hongos filamentosos con mayor crecimiento en medio agar enriquecido con ácido tánico al 10 % de concentración

Para la determinación del índice de tolerancia de las cepas encontradas se llevó a cabo un prueba preliminar denominada Pre-tolerancia, con el propósito de seleccionar la cepas que muestren un mayor crecimiento en presencia de taninos (ácido tánico).

- Preparación del medio de cultivo

Para la selección de hongos filamentosos capaces de degradar taninos, se utilizó un medio de cultivo preparado para que el hongo utilice el tanino (ácido tánico) como única fuente de carbono (medio mínimo). Se prepararon 2 L y 500 mL de medio que contenía (g/L): 3 g de NaNO_3 , 0,5 g de KCl , 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g de KH_2PO_4 , 0,01 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 30 g de agar. El medio fue preparado en 2 matraces de 1L y 1 de 500 mL, se sometieron a calentamiento utilizando una cocinilla eléctrica para disolver completamente los componentes mencionados anteriormente, finalmente, las soluciones se pasaron a frascos borosilicato y se esterilizaron en autoclave a 121 °C y 15 Psi durante 15 minutos. Una vez finalizado el proceso de esterilización, los frascos se enfriaron ligeramente por medio de un baño maría para la adición del ácido tánico.

Posterior a ello, dentro de una cabina de flujo laminar se añadieron 25 g de ácido tánico al medio preparado (10 g/L) y se agitó vigorosamente para favorecer su disolución, a

continuación, se vertieron 20 mL en placas Petri de vidrio previamente esterilizadas en autoclave, finalmente, se dejaron enfriar y cuajar durante un periodo de 30 minutos.



Figura 10. Preparación del medio de cultivo.

- ***Siembra de las cepas de hongos filamentosos aisladas del efluente de curtiembre***

Se seleccionaron las cepas fúngicas que evidenciaron el mejor crecimiento en medio Sabouraud, se realizaron cortes cuadrados de medio de cultivo con micelio de 0,5 cm² y se sembraron en las placas con medio enriquecido con ácido tánico (la cara del corte con el micelio se posicionó en contacto directo con el agar). Se realizaron 3 repeticiones por cada cepa, y se midió el crecimiento del micelio cada 3 días durante un periodo de 15 días, la medición se realizó con un vernier y finalmente se seleccionaron aquellas cepas capaces de crecer y formar una zona de aclaración alrededor de sus colonias (evidencia de la hidrólisis de taninos)⁵⁸.



Figura 11. Cortes de micelio sembrados en medio solido con ácido tánico (10 g/L).

- ***Índice de tolerancia de hongos filamentosos a diferentes concentraciones de Quebracho utilizado en el proceso de curtido***

- ***Preparación del medio de cultivo enriquecido con Quebracho***

Se preparó 600 mL del medio mencionado anteriormente sin la adición del agar, una vez diluidos todos los componentes se distribuyó el medio en 5 matraces de 100 mL y se les añadió tanino de quebracho para formar soluciones al 7,5, 10, 15 y 20 % de concentración (controles incluidos), La proporciones de quebracho empleadas para cada concentración se muestran en la tabla 1. A continuación, se sometieron a calentamiento a través de una cocinilla eléctrica con el objetivo de disolver completamente el quebracho, una vez disuelto se enfriaron a temperatura ambiente para realizar una toma de pH por medio de un multiparámetro, se ajustó el pH a 6 con la adición de 30 μ L de NaOH 5N, posterior a ello, se les añadió el agar, se esterilizaron en autoclave y se realizó el plaqueo dentro de una cabina de flujo laminar.

Tabla 1. Proporciones de tanino de quebracho empleadas para determinar la tolerancia de las cepas fúngicas.

Concentración de Quebracho (%)	Quebracho (g)	Volumen de medio (mL)
7,5	9	120
10	12	120
15	18	120
20	24	120

- ***Siembra de las cepas de hongos filamentosos seleccionadas***

Las cepas se sembraron en las placas enriquecidas con quebracho a diferentes concentraciones utilizando el método mencionado anteriormente. Se realizaron 3 repeticiones para cada ensayo, asimismo, las mediciones del crecimiento micelial se realizaron cada 3 días durante un periodo de 15 días.

- ***Evaluación del índice de tolerancia***

Para la determinación del índice de tolerancia se utilizó la siguiente fórmula:

$$IT = \text{Diámetro del hongo en medio con efluente} / \text{Diámetro del hongo en medio sin efluente}^{59}$$

2.2.7 Determinación de la capacidad de remoción de taninos

Las cepas fúngicas seleccionadas fueron inicialmente pre-cultivadas en medio nutritivo con (g/L): 10 g de glucosa, 1 g de NH_4NO_3 , 0,8 g de KH_2PO_4 , 0,2 g Na_2HPO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 2 g de extracto de levadura, en 50 mL de volumen final, se inocularon fragmentos de agar de 0,5 cm^2 con micelio activo. La incubación se realizó durante 10 días. Posteriormente, se retiró

el medio nutritivo y se reemplazó cuidadosamente por un medio líquido conteniendo diferentes concentraciones de Quebracho (7,5, 10, 15 y 20 %) (Tabla 2), manteniendo el micelio en el mismo recipiente. Esta estrategia permitió evaluar la biotransformación de taninos por micelio previamente desarrollado bajo condiciones favorables de crecimiento. Una vez inoculados los frascos se incubaron a 22,5 °C con agitación a 110 rpm durante un periodo de 15 días.

Tabla 2. Proporción de quebracho y medio de cultivo por frasco de 50 mL

Concentración de Quebracho (%)	Quebracho (g)	Volumen de medio (mL)
7,5	3,75	50
10	5	50
15	7,5	50
20	10	50

- *Cuantificación de taninos por el método de Folin-Ciocalteu*
- *Elaboración de la curva de calibración*

Para la elaboración de la curva, se prepararon 5 mL de soluciones de ácido gálico, las concentraciones y proporciones usadas se muestran en la tabla 3:

Tabla 3. Proporciones empleadas para la preparación de soluciones estándar de ácido gálico.

Reactivos	Concentración de ácido gálico (mg/mL)							
	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,2
Ac. gálico (mL)	0	0,25	0,5	1	1,5	2	2,5	3
Agua (mL)	5	4,75	4,5	4	3,5	3	2,5	2

Para la determinación de polifenoles se utilizaron beakers de 10 mL a los cuales se les añadieron 20 µL de cada muestra de ácido gálico, 3160 µL de agua desionizada y 200 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu, se agitaron bien y se dejaron en reposo durante 1 minuto, después, se añadieron 600 µL de carbonato de sodio al 20 % y se incubaron en oscuridad durante un periodo de 2 horas para el desarrollo de color (figura 12). Finalmente, se leyeron las muestras en un espectrofotómetro UV-Visible (Thermo scientific EVOLUTION 201) a 727 nm⁵⁷.

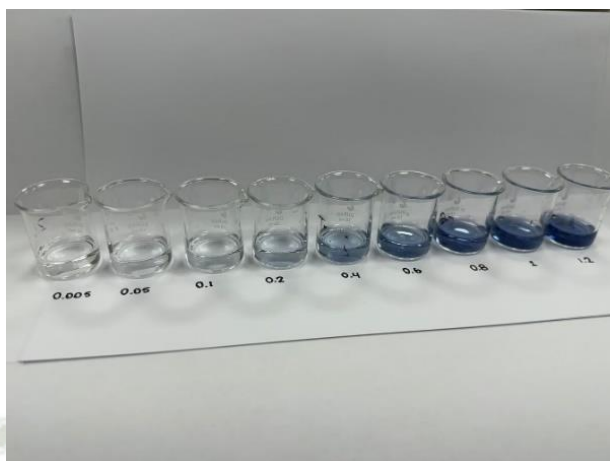


Figura 12. Soluciones estándar de ácido gálico luego de la incubación.

- ***Cuantificación de polifenoles para la determinación de la capacidad de degradación de los hongos filamentosos nativos aislados sobre el tanino de quebracho***

Se realizaron 5 evaluaciones mediante la extracción de alícuotas de 100 μ L cada 3 días a partir de los frascos inoculados y en solución con quebracho. La cuantificación se realizó por medio del método de Folin-Ciocalteu mencionado en el párrafo anterior, las muestras fueron diluidas previamente en relación 1:100, utilizando fiolas de 10 mL.

2.2.8 Evaluación de la actividad tanasa

- ***Siembra de los hongos en medio líquido enriquecido con ácido tánico.***

Se prepararon frascos de 50 mL con medio líquido que contenía (g/L): 10 g de glucosa, 1 g de NH_4NO_3 , 0,8 g de KH_2PO_4 , 0,2 g Na_2HPO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 2 g de extracto de levadura (medio autoclavado previamente), a los cuales se les añadió ácido tánico para formar soluciones (7,5, 10, 15 y 20 %), además de los controles y se inocularon con las cepas seleccionadas para la evaluación de la actividad enzimática, todos los ensayos se realizaron por triplicado, las proporciones de ácido tánico empleadas se muestran en la tabla 4:

Tabla 4. Proporción de ácido tánico (g) por frasco de 50 mL.

Concentración de Ac. Tánico (%)	Acido Tánico (g)	Volumen de medio (mL)
7,5	3,75	50
10	5	50
15	7,5	50
20	10	50

- **Ensayo de tanasa**
- ***Elaboración de la curva de calibración***

Se utilizará el método basado en la formación de un cromóforo producto de la interacción de ácido gálico con rhodanine propuesto por Srivastava y Kar⁶⁰. Para la elaboración de la curva de calibración se preparó previamente una solución madre de 100 µg/ mL, se pesaron 0,02 g de ácido gálico y se añadió agua ultrapura hasta llegar a un volumen final de 200 mL por medio de una fiola. A partir de la solución madre se prepararon soluciones estándar de ácido gálico en concentraciones de 5 a 50 µg/mL, los volúmenes empleados se muestran en la tabla 5:

Tabla 5. Elaboración de las soluciones estándar.

Concentración de Ac. gálico (µg/mL)	Volumen de solución madre (mL)	Agua (mL)
5	0,5	9,5
10	1	9
20	2	8
30	3	7
40	4	6
50	5	5

Para la preparación del buffer citrato de sodio 0,05 M se pesaron 0,935 g de citrato de trisodio dihidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y 0,349 g de ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) y se diluyeron en 100 mL de agua ultrapura. Seguido de eso, se adicionaron 0,18415 g de galato de metilo para la formación de la solución galato de metilo 0,01 M en buffer citrato 0,05 M establecido por los autores. Finalmente, la reacción estándar se llevó a cabo mediante la mezcla de 0,5 mL de solución de ácido gálico, 0,3 mL de rhodanine (Sigma-Aldrich), 0,2 mL de KOH 0,5 M y 4 mL de agua ultrapura, las muestras se incubaron en un thermomixer (eppendorf PESACON ThermoMixer C) a 30 °C por 10 minutos para el desarrollo de color (figura 13) y se leyeron en un espectrofotómetro UV-Visible (BOECO Germany S-220 Spectrofotometer) a 520 nm. La obtención de la curva de calibración y el valor de R^2 se realizó por medio del programa MS Excel. Se definió una unidad de tanasa como la cantidad de enzima que libera 1 mol de ácido gálico en un minuto, de acuerdo a lo propuesto por los autores⁶⁰.

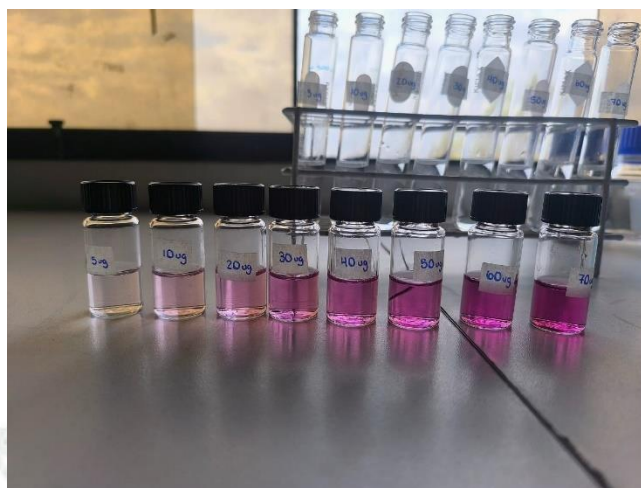


Figura 13. Soluciones estándar de ácido gálico luego de la reacción con rhodanina, se evidencia el desarrollo de color

- *Determinación de la actividad tanasa de las cepas fúngicas seleccionadas*

Se realizaron 5 evaluaciones mediante la extracción de alícuotas de 100 μ L cada 3 días a partir de los frascos inoculados y en solución con ácido tánico. La cuantificación se realizó por medio del método mencionado en el párrafo anterior, las muestras fueron diluidas previamente en relación 1:100.

2.2.9 Diseño experimental

Para el análisis de los resultados se utilizó un diseño completamente al azar (DCA). Se aplicó un ANOVA de un factor para determinar diferencias significativas entre los tratamientos. Para comparar el rendimiento entre cepas se realizaron comparaciones de medias mediante la prueba *t* de Student ($p < 0.05$).

2.2.10 Identificación molecular de las cepas seleccionadas

La identificación molecular de las cepas seleccionadas se llevó a cabo mediante la amplificación y posterior secuenciación de la región ITS1-5,8S-ITS2 del rDNA. Para ello, se extrajo DNA genómico empleando el kit MasterPure™ DNA Purification Kit, siguiendo las recomendaciones del fabricante. La región ITS se amplificó mediante PCR con los primers universales:

- *Forward:* ITS-1 5'-TCCGTAGGTAACCTGCGG
- *Reverse:* ITS-4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC
- *Temperatura de hibridación:* 52°C

Los productos de PCR (~600 pb) se purificaron mediante el kit Qiagen PCR Purification Kit y se secuenciaron por medio del método Sanger, se utilizaron los colorantes Big Dye v3,1 y un

equipo de secuenciación 3730xl. Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante el software BLASTn del NCBI, comparándolas con la base de datos del GenBank.

2.2.11 Determinación de cambios químicos y morfológicos (FTIR y SEM)

- ***Preparación de la muestra para el análisis por FTIR en estado sólido y SEM***

Las cepas de hongos filamentosos se sometieron a un proceso de liofilización para su adecuado procesamiento, para ello, las cepas (control y tratamiento) fueron congeladas durante 24 h en tubos falcon de 50 mL. Pasado el tiempo se llevaron las cepas al equipo de liofilización (CHRIST Alpha 1-2 LDplus) durante 48 h.

- ***Análisis por FTIR***

Para el análisis por FTIR se trituro la cepa fúngica ya liofilizada en un mortero de ágata, se tomó una alícuota de 400 mg, se sometió a presión (6,6 Pa) durante 5 minutos para la obtención de los discos, los cuales fueron analizados por el equipo Nicolet In10 FT-IR Microscope⁶¹ (Región infrarroja: 500 a 4000 cm^{-1} , velocidad de escaneo: 16)⁶²

- ***Microscopía electrónica de barrido (SEM) para la observación de la morfología del hongo antes y después de la degradación de taninos.***

Para el análisis se trituro la cepa fúngica ya liofilizada en un mortero de ágata y se tomó una alícuota de 400 mg. La observación en el SEM se realizó a un diámetro de apertura del objetivo de 4 μm y un voltaje de operación de 15 keV⁶³.

2.3 Diagrama de flujo de actividades

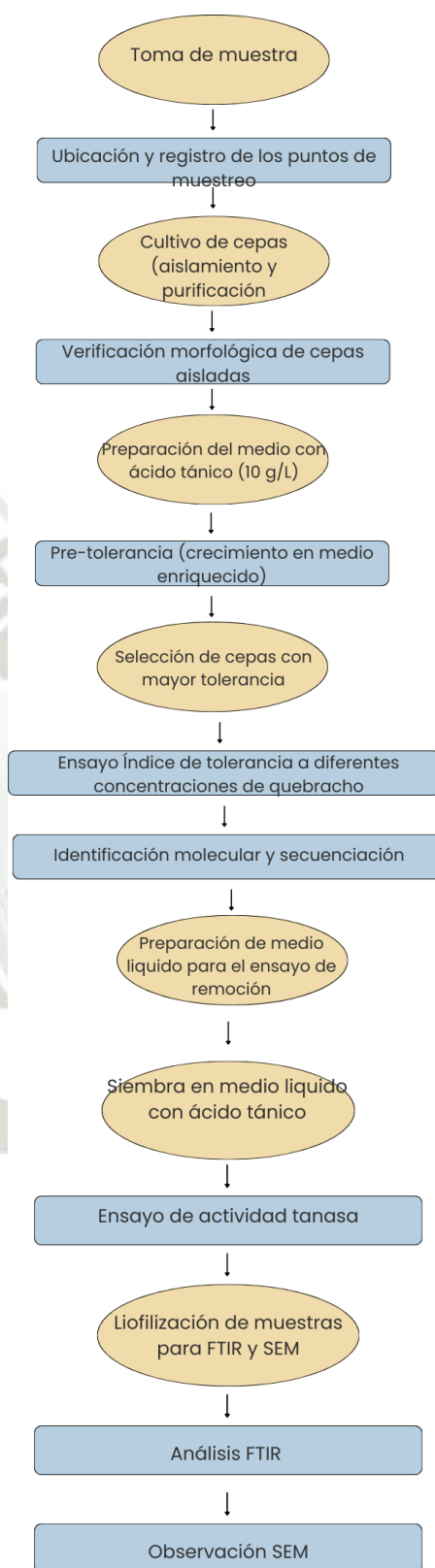
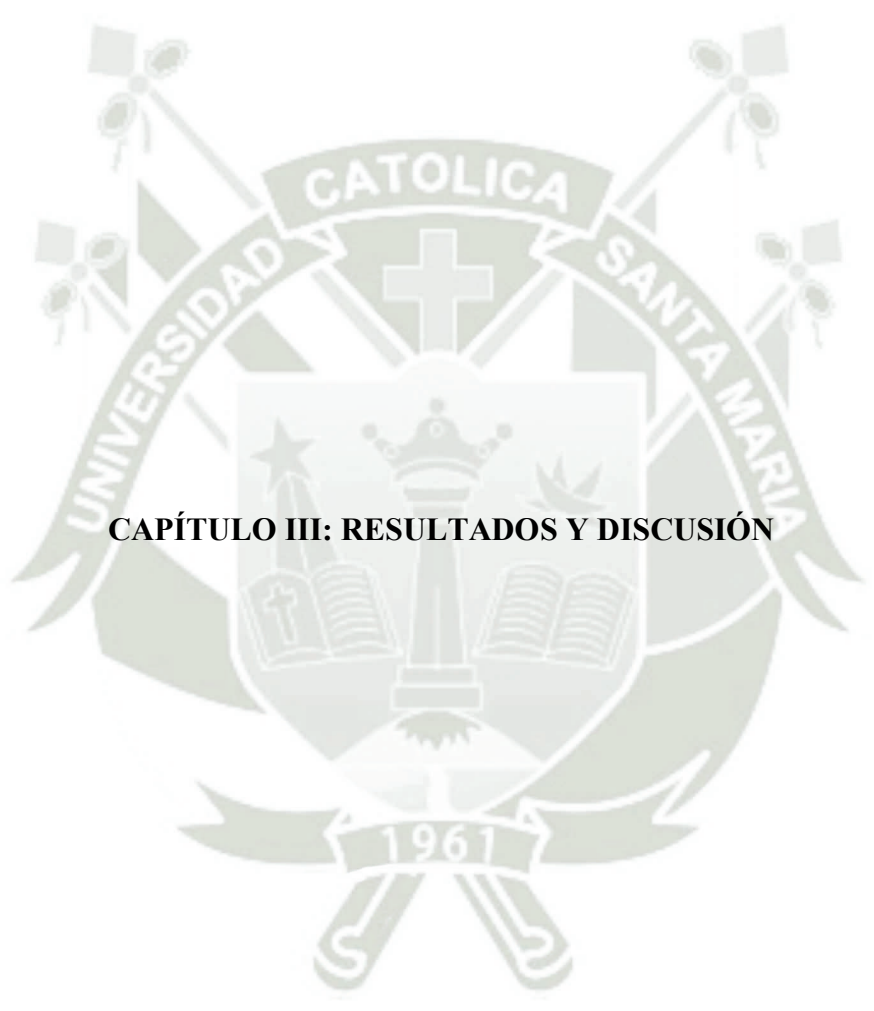


Figura 14. Diagrama de flujo de actividades.



CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Aislamiento de hongos filamentosos de efluentes de taninos de curtiembre.

- *Cultivo de las cepas de hongos filamentosos de efluentes de curtiembre*

Luego del aislamiento y purificación se obtuvieron 40 cepas fúngicas en total (figura 15).



Figura 15. Purificación de las cepas fúngicas presentes en las muestras de los efluentes del PIRS.

3.2 Evaluación de la tolerancia

- *Pre tolerancia: Selección de hongos filamentosos con mayor crecimiento en medio sólido enriquecido con ácido tánico (10 g/L)*

El ensayo de pre-tolerancia se realizó con el propósito de seleccionar las cepas con mayor capacidad de degradación de taninos mediante de la evaluación del crecimiento en medio mínimo de cultivo sólido enriquecido con ácido tánico (10 g/L) (Figura 16). Se evidenció que 2 cepas demostraron el mayor crecimiento (E03-020-01 (25) y E03-017).

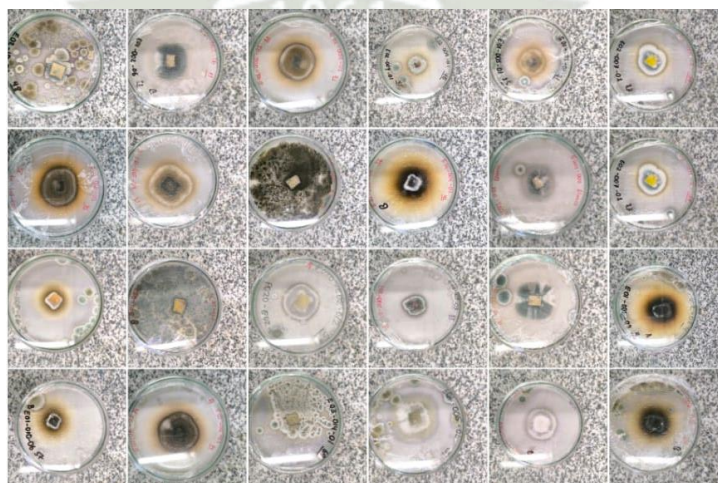


Figura 16. Cepas sembradas en medio con ácido tánico (10 g/L) a las 216 h de crecimiento.

El presente estudio evaluó la capacidad de remediación de taninos de Quebracho empleando hongos aislados a partir de los efluentes de curtido del Parque Industrial de Río Seco. A diferencia de otros trabajos que emplean ácido tánico o efluente real proveniente de la industria de curtido, el uso de un efluente sintético basado en el tanino de Quebracho permitió el estudio de la biodegradación de estos taninos sin la interferencia de otros componentes presentes en los efluentes reales. De este modo, se facilita la comprensión del metabolismo de las cepas fúngicas frente a los taninos condensados presentes en el quebracho ya que presentan una estructura más compleja que los taninos hidrolizables como el ácido tánico.

El aislamiento de las cepas fúngicas se llevó a cabo a partir del efluente de curtido vegetal de una empresa curtidora y el efluente general localizado en el Parque Industrial de Río Seco (PIRS), zonas que se caracterizan por la presencia de elevadas concentraciones de materia orgánica recalcitrante. Este método permitió la recuperación de una diversidad considerable de cepas fúngicas, logrando aislarse 40 cepas diferentes. Este enfoque metodológico es comparable al descrito por Palacio et al.⁶ los cuales consiguieron el aislamiento de microorganismos tanino-resistentes a partir de efluentes de curtiembre a través de la siembra directa y en diluciones de sus muestras en medio Agar Tripticosa Soya (TSA). Por otro lado, Prigione et al.²⁵ diseñaron una alternativa para el aislamiento de especies fúngicas que consistió en la exposición de placas que contenían directamente el sustrato de taninos comerciales (tara, quebracho, acacia y castaño) en concentraciones de hasta 50 % (p/v) como fuente única de carbono, lograron el aislamiento de 125 cepas de hongos filamentosos, siendo *Aspergillus niger* y *Penicillium spinulosum* los más recurrentes. Del mismo modo, demostraron que la composición de especies fúngicas varía notablemente de acuerdo al tipo de tanino empleado donde se encontró una alta similitud entre las cepas encontradas en los taninos de quebracho y acacia. El enfoque empleado en el presente estudio permitió el aislamiento de especies fúngicas presumiblemente adaptadas a las condiciones y características del efluente lo que representa un punto de partida sólido para la siguiente evaluación de pre-tolerancia a taninos, etapa clave en la selección de cepas con alto potencial en procesos de biorremediación. El aislamiento de cepas fúngicas a partir de ambientes naturalmente ricos en taninos ha demostrado ser una estrategia eficaz para la obtención de microorganismos con capacidad de degradación de los mismos, así, en el estudio de Thakur et al.⁶⁴ se aislaron cepas fúngicas a partir de suelos de pinares y huertos del Himalaya noroccidental y se seleccionaron aquellas que presentaron el mayor índice enzimático ($EI \geq 2,0$) en medio con adición de ácido tánico al 0,5 %.

Chaudhary et al.⁶⁵ emplearon un medio de sales mínimas suplementado con ácido tánico y dicromato de potasio en conjunto con el fin de selección de microorganismos capaces de resistir

tanto Cr (VI) y taninos. En contraste con el presente estudio se aplicó un aislamiento directo de hongos filamentosos a partir de un efluente real de curtiembre priorizando la tolerancia a taninos de quebracho, sin imponer presión selectiva ante metales pesados. Esta diferencia metodológica refleja enfoques complementarios, el trabajo de Chaudhary et al. buscó microorganismos multirresistentes, y el presente estudio se enfocó en la búsqueda de cepas con potencial de biotransformación de taninos naturales específicos de la industria del curtido vegetal.



Tabla 6. Evaluación del crecimiento de las cepas fúngicas, empleando ácido tánico (10 g/L).

CEPA	Crecimiento micelial (mm)				
	72 h	144 h	216 h	288 h	360 h
	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
E001-002 Blanca	17,00 $\pm$ 2,00	27,67 $\pm$ 2,52	33,33 $\pm$ 2,08	37,33 $\pm$ 1,53	40,33 $\pm$ 1,53
E01-002 Blanca 01	0,00 $\pm$ 0,00	30,33 $\pm$ 2,52	41,00 $\pm$ 2,00	52,00 $\pm$ 2,00	52,33 $\pm$ 2,08
E01-002-01 Blanca 2	0,00 $\pm$ 0,00	22,00 $\pm$ 2,65	32,00 $\pm$ 3,61	40,67 $\pm$ 1,15	43,00 $\pm$ 3,61
E01-002-02 (4)	32,00 $\pm$ 3,60	44,33 $\pm$ 2,08	59,33 $\pm$ 2,08	76,67 $\pm$ 1,52	80,67 $\pm$ 2,52
E01-002-06 (11)	16,33 $\pm$ 1,53	30,33 $\pm$ 1,53	42,00 $\pm$ 2,00	49,33 $\pm$ 5,03	53,00 $\pm$ 3,61
E01-002-10 (19)	0,00 $\pm$ 0,00	27,67 $\pm$ 2,08	30,00 $\pm$ 1,00	34,33 $\pm$ 1,15	34,33 $\pm$ 1,15
E01-002-10 (20)	0,00 $\pm$ 0,00	12,00 $\pm$ 1,73	19,00 $\pm$ 1,00	23,67 $\pm$ 1,52	30,33 $\pm$ 3,06
E01-005-01(21)	12,00 $\pm$ 1,73	39,33 $\pm$ 2,08	44,00 $\pm$ 1,73	48,33 $\pm$ 4,73	54,33 $\pm$ 4,04
E01-005-02 (23,24)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
E01-005-04 (27)	19,33 $\pm$ 2,08	39,33 $\pm$ 1,15	52,67 $\pm$ 1,53	55,33 $\pm$ 3,21	55,33 $\pm$ 3,21
E01-005-05 (29)	18,33 $\pm$ 2,89	32,33 $\pm$ 2,52	48,33 $\pm$ 1,55	49,67 $\pm$ 0,58	51,33 $\pm$ 1,15
E01-005-05 (39)	15,00 $\pm$ 1,73	29,33 $\pm$ 1,15	32,67 $\pm$ 1,55	48,33 $\pm$ 2,52	47,67 $\pm$ 5,86
E01-005-06 (31)	12,67 $\pm$ 1,53	38,33 $\pm$ 2,08	50,00 $\pm$ 3,00	57,33 $\pm$ 2,08	61,00 $\pm$ 1,73
E01-005-07 (33)	0,00 $\pm$ 0,00	19,33 $\pm$ 2,08	26,33 $\pm$ 1,53	35,67 $\pm$ 1,53	40,67 $\pm$ 2,08
E01-010-06 (57)	17,33 $\pm$ 1,53	33,33 $\pm$ 2,89	46,00 $\pm$ 1,73	57,67 $\pm$ 2,51	63,67 $\pm$ 2,52
E02-002-10 (20)	11,67 $\pm$ 1,53	17,33 $\pm$ 2,51	59,00 $\pm$ 2,00	66,33 $\pm$ 1,52	72,67 $\pm$ 2,53
E02-007-01 (37)	0,00 $\pm$ 0,00	31,33 $\pm$ 3,21	40,33 $\pm$ 2,52	44,00 $\pm$ 2,00	50,33 $\pm$ 2,52
E02-007-01 (38)	0,00 $\pm$ 0,00	32,67 $\pm$ 2,52	41,67 $\pm$ 2,51	57,00 $\pm$ 2,00	68,33 $\pm$ 3,06
E02-008-01 (39,40)	22,33 $\pm$ 2,08	28,67 $\pm$ 1,15	39,00 $\pm$ 1,00	53,33 $\pm$ 2,51	60,33 $\pm$ 3,05
E02-008-02 (42)	33,33 $\pm$ 1,53	52,33 $\pm$ 2,52	66,00 $\pm$ 1,00	72,33 $\pm$ 3,05	78,67 $\pm$ 2,08
E02-009	0,00 $\pm$ 0,00	22,00 $\pm$ 2,00	30,00 $\pm$ 2,65	41,00 $\pm$ 1,73	47,67 $\pm$ 3,21
E02-009-01 (45)	12,00 $\pm$ 1,73	29,33 $\pm$ 1,15	36,33 $\pm$ 1,53	38,33 $\pm$ 2,51	40,00 $\pm$ 2,00
E02-009-01 (46)	17,00 $\pm$ 1,73	29,33 $\pm$ 4,04	45,33 $\pm$ 1,53	48,00 $\pm$ 2,64	52,33 $\pm$ 2,51
E02-10-01 (48)	15,67 $\pm$ 1,15	26,33 $\pm$ 2,89	29,00 $\pm$ 2,65	47,33 $\pm$ 2,51	64,67 $\pm$ 1,53
E02-13 Verde	0,00 $\pm$ 0,00	12,33 $\pm$ 2,52	16,33 $\pm$ 2,52	24,67 $\pm$ 2,51	30,67 $\pm$ 2,52
E03-014-01 (69)	19,67 $\pm$ 1,53	58,67 $\pm$ 1,53	63,00 $\pm$ 1,73	66,00 $\pm$ 1,00	71,33 $\pm$ 1,53
E03-016-01 (71)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
E03-016-03 (74)	23,33 $\pm$ 1,53	44,33 $\pm$ 1,15	52,67 $\pm$ 2,52	53,00 $\pm$ 2,00	53,67 $\pm$ 2,31
E03-016-03 (75)	20,00 $\pm$ 2,00	42,67 $\pm$ 2,52	54,33 $\pm$ 9,29	51,00 $\pm$ 2,65	52,33 $\pm$ 3,05
E03-016-04 (76)	0,00 $\pm$ 0,00	62,67 $\pm$ 2,52	71,00 $\pm$ 2,00	74,67 $\pm$ 1,53	70,00 $\pm$ 1,00
E03-017	27,67 $\pm$ 4,93	89,00 $\pm$ 1,00	90,00 $\pm$ 0,00	90,33 $\pm$ 0,57	90,00 $\pm$ 0,00
E03-018-P.P. Raspado parrilla	0,00 $\pm$ 0,00	25,00 $\pm$ 8,66	31,67 $\pm$ 4,16	35,33 $\pm$ 3,51	39,33 $\pm$ 3,06
E03-019-P.P.	0,00 $\pm$ 0,00	17,00 $\pm$ 2,64	29,00 $\pm$ 1,00	69,00 $\pm$ 4,00	86,33 $\pm$ 2,08
E03-019-02	0,00 $\pm$ 0,00	32,67 $\pm$ 2,52	37,00 $\pm$ 3,00	43,00 $\pm$ 2,65	62,67 $\pm$ 3,51
E03-020-01 (25)	32,67 $\pm$ 2,52	88,00 $\pm$ 1,00	90,00 $\pm$ 0,00	90,33 $\pm$ 0,58	90,00 $\pm$ 0,00
E04-001-01 (59)	19,00 $\pm$ 2,00	26,33 $\pm$ 3,21	40,67 $\pm$ 2,08	45,00 $\pm$ 2,00	50,67 $\pm$ 2,08
E04-001-02 Amarilla pura (60)	11,00 $\pm$ 7,62	30,25 $\pm$ 1,26	38,50 $\pm$ 3,42	47,75 $\pm$ 4,79	53,00 $\pm$ 3,92
E04-001-03 Amarilla pura (60)	0,00 $\pm$ 0,00	30,50 $\pm$ 2,12	39,00 $\pm$ 1,41	44,00 $\pm$ 1,41	51,00 $\pm$ 1,41
E04-002-01 Amarilla pura (61)	16,67 $\pm$ 1,53	34,33 $\pm$ 1,55	42,33 $\pm$ 5,86	47,67 $\pm$ 9,07	50,33 $\pm$ 8,50
ANOVA F	70,924	155,326	147,754	132,677	139,822
Significancia (P)	0,000 (P<0,01)	0,000 (P<0,01)	0,000 (P<0,01)	0,000 (P<0,01)	0,000 (P<0,01)

La tabla 6 muestra los promedios y desviaciones estandar del crecimiento de las 41 cepas aisladas desde las 72 h hasta las 360 h de evaluación en medio mínimo enriquecido con ácido tánico (10 g/L), además, se muestran los valores obtenidos de la prueba estadística de ANOVA, se presentan diferencias altamente significativas ($p < 0,01$) en el crecimiento de las cepas desde la primera hasta la última evaluación.

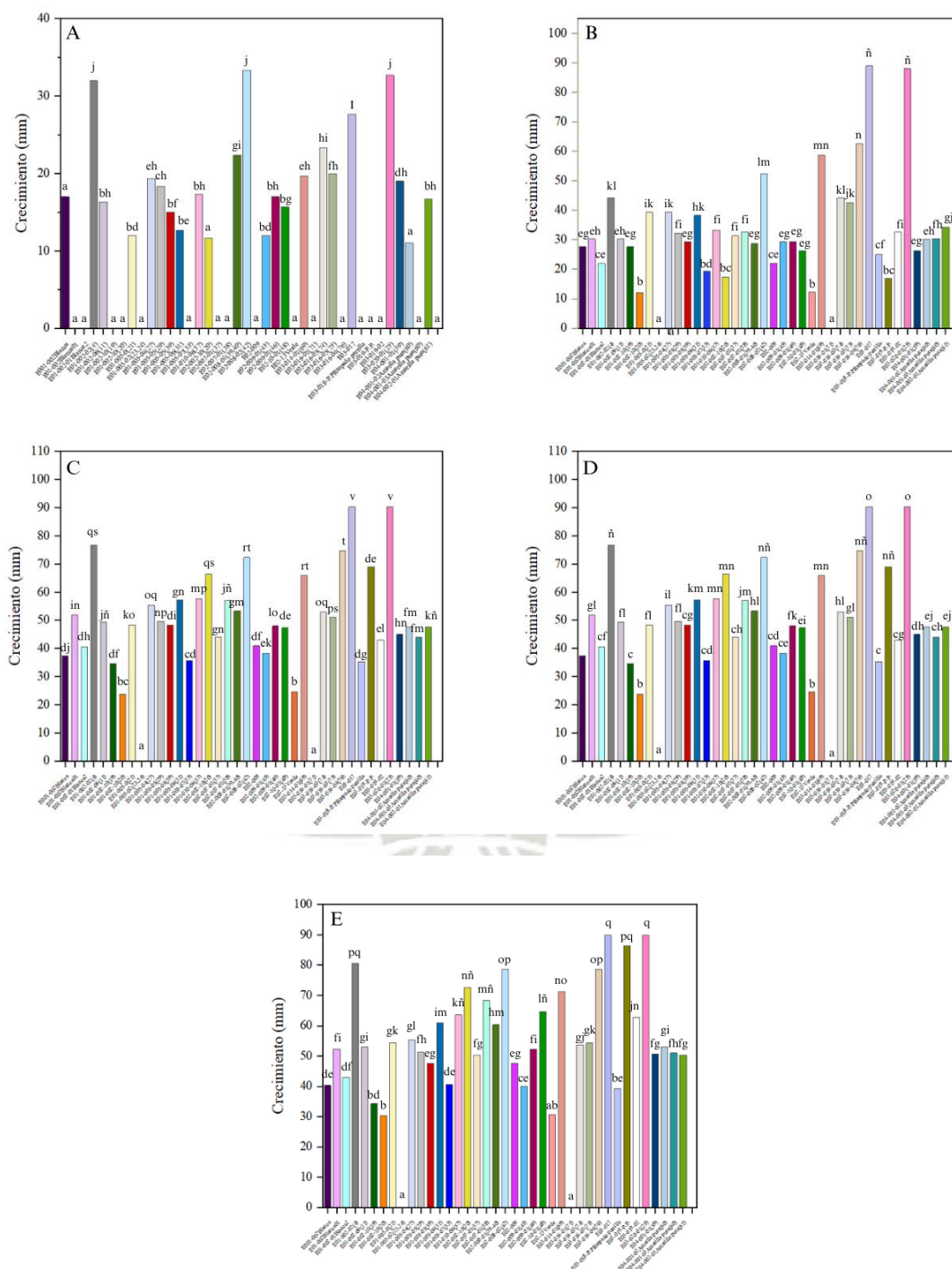


Figura 17. Comparación del crecimiento entre las cepas en medio mínimo con ácido tánico (10 g/L) a diferentes tiempos de evaluación.

En la figura 17 se observa el crecimiento de las cepas fúngicas a diferentes tiempos de evaluación en medio enriquecido con ácido tánico (10 g/L): **A)** crecimiento de las cepas fúngicas a las 72 h, la prueba de comparación múltiple de Tukey (a-j) muestra a la cepa E02-008-02 (42) con el mayor crecimiento promedio (j) ($33,33 \pm 1,53$). **B)** Crecimiento a las 144 h, en esta evaluación la prueba de comparación múltiple de Tukey (a-ñ) muestra a las cepas E03-020-01 (25) y E03-017 con el mayor crecimiento promedio ($88,00 \pm 1,00$ y $89,00 \pm 1,00$, respectivamente) (ñ). **C)** Crecimiento a las 216 h en medio con ácido tánico (10 g/L), para esta evaluación la prueba de Tukey (a-v) muestra nuevamente a las cepas E03-020-01 (25) y E03-017 con el mayor crecimiento promedio (v) ($90,00 \pm 0,00$ y $90,00 \pm 0,00$, respectivamente). **D)** Crecimiento de las cepas fúngicas a las 288 h, la prueba de Tukey (a-o) indica mayor crecimiento promedio para las cepas E03-020-01 (25) y E03-017. **E)** Última evaluación de crecimiento de las cepas fúngicas a las 360 h, la prueba de comparación múltiple de Tukey (a-q) indica mayor crecimiento promedio de las cepas E03-020-01 (25) y E03-017 (k).

Este método permitió evaluar la resistencia inicial de los aislados a taninos en condiciones de estrés, en este ensayo todas las cepas aisladas del efluente mostraron crecimiento, sin embargo, destacaron 2 cepas (E03-020-01 (25) y E03-017) posteriormente identificadas como *Aspergillus niger/awamori* y *Penicillium crustosum*, respectivamente, por su velocidad de crecimiento y aparente tolerancia a compuestos fenólicos por lo que fueron seleccionadas para los ensayos posteriores. Se describió un enfoque metodológico similar por Prigione et al.²⁵ donde se evaluó la capacidad de crecimiento de cepas de hongos filamentosos en medio de cultivo suplementados con taninos industriales (tara, quebracho, acacia y castaño) como única fuente de carbono, se emplearon concentraciones de estos taninos de hasta 50 % p/v. A través de este procedimiento se logró el aislamiento de 125 especies fúngicas. A pesar de existir diferencias metodológicas (tipo y concentración de los taninos utilizados y el origen de las cepas) este estudio y el trabajo de Prigione et al. comparten el objetivo de la identificación de las cepas con capacidad de tolerar taninos, lo cual, representa un paso clave en la selección de microorganismos eficaces para la biorremediación de efluentes con altas concentraciones de taninos. Del mismo modo, Thakur et al.⁶⁴ emplearon un método similar al utilizar medios con ácido tánico al 0,5 % en el aislamiento inicial de las cepas provenientes de suelos ricos en taninos para posteriormente evaluar y seleccionar las cepas con mayor índice enzimático. En comparación con el presente estudio, esta estrategia de preselección y evaluación específica permitió identificar cepas robustas frente a taninos, asimismo, se destaca la pertinencia del uso del ácido tánico como paso previo para la selección de cepas tolerantes.

- **Índice de tolerancia de hongos filamentosos a diferentes concentraciones de tanino de Quebracho utilizado en el proceso de curtido**

Para las pruebas de tolerancia se seleccionaron las cepas E03-020-01 (25) y E03-017, tras presentar un mayor crecimiento promedio en el ensayo de pre-tolerancia. Las cepas fueron sembradas en placas de medio mínimo con quebracho al 7,5, 10, 15 y 20 %, se midió el diámetro micelial (figura 18) y se calculó el índice de tolerancia.

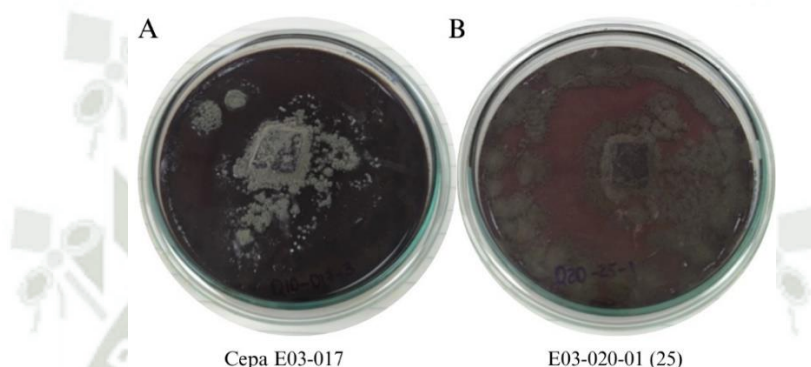


Figura 18. Crecimiento micelial de las cepas E03-017 (A) y E03-020-01(25) (B) a las 216 h de evaluación.

Tabla 7. Evaluación y comparación del índice de tolerancia de las concentraciones de quebracho por cepa.

		Crecimiento micelar (mm)				
CEPA	Concentración	72 h	144 h	216 h	288 h	360 h
		$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
E03-020-01 (25)	7,5%	$1,49 \pm 0,40$	$1,04 \pm 0,15$	$0,99 \pm 0,09$	$1,02 \pm 0,04$	$1,01 \pm 0,02$
	10%	$1,63 \pm 0,52$	$0,99 \pm 0,21$	$0,95 \pm 0,10$	$0,99 \pm 0,03$	$0,96 \pm 0,06$
	15%	$0,98 \pm 0,50$	$1,18 \pm 0,07$	$1,02 \pm 0,03$	$0,99 \pm 0,05$	$1,04 \pm 0,02$
	20%	$0,72 \pm 0,11$	$1,22 \pm 0,00$	$1,04 \pm 0,00$	$1,02 \pm 0,03$	$0,99 \pm 0,04$
ANOVA F		3,138	2,016	1,004	0,492	2,49
SIGNIFICANCIA (P)		0,087	0,190	0,439	0,697	0,134
		$P>0,05$	$P>0,05$	$P>0,05$	$P>0,05$	$P>0,05$
E03-017	7,5%	$0,27 \pm 0,08$	$0,70 \pm 0,17$	$0,70 \pm 0,05$	$0,63 \pm 0,07$	$0,64 \pm 0,03$
	10%	$0,14 \pm 0,12$	$1,00 \pm 0,68$	$1,03 \pm 0,22$	$0,90 \pm 0,04$	$0,81 \pm 0,06$
	15%	$0,04 \pm 0,03$	$0,86 \pm 0,21$	$0,61 \pm 0,15$	$0,55 \pm 0,07$	$0,52 \pm 0,15$
	20%	$0,00 \pm 0,00$	$0,24 \pm 0,09$	$0,18 \pm 0,05$	$0,15 \pm 0,02$	$0,12 \pm 0,01$
ANOVA F		7,57	2,41	19,73	103,32	40,62
SIGNIFICANCIA (P)		0,01	0,14	0,000	0,000	0,000
		$P<0,05$	$P>0,05$	$P<0,001$	$P<0,001$	$P<0,001$

La tabla 7 muestra los promedios y desviaciones estándar de la tolerancia de las 2 cepas en medio mínimo en solución con quebracho a diferentes concentraciones y en los diferentes tiempos de evaluación (72, 144, 216, 288 y 360 horas). También se muestran los valores de la prueba estadística ANOVA.

Para la cepa E03-020-01 (25) se muestran valores de $P>0,05$ para todas las evaluaciones, lo cual indica que no hay diferencias significativas en las diferentes concentraciones de quebracho, se puede observar que al inicio (primera medición) existe una cierta variabilidad entre las concentraciones, sin embargo, con el paso del tiempo estas diferencias desaparecen, entonces, se puede concluir que esta cepa fúngica parece tener una respuesta inicial ante el tanino de quebracho pero con el tiempo se adapta y mantiene un índice de tolerancia similar ante las diferentes concentraciones.

Por otro lado, para la cepa E03-017 existe un patrón muy diferente. En la primera evaluación se nota una diferencia significativa entre las concentraciones de quebracho ($P<0,05$) y en la segunda medición no se presentan diferencias significativas ($P>0,05$), sin embargo, en la tercera evaluación existe una diferencia altamente significativa, lo que puede indicar que la respuesta del hongo ante las concentraciones de quebracho se vuelve más marcada con el paso del tiempo, lo cual, se puede observar en la cuarta y quinta evaluación con diferencias altamente significativas ($P<0,001$). Estos resultados parecen indicar que la influencia del quebracho para esta cepa de hongo, aumenta con el paso del tiempo, aunque también podría llegar a estabilizarse, ya que en la última medición la diferencia sigue siendo significativa, pero es menor que en la cuarta.

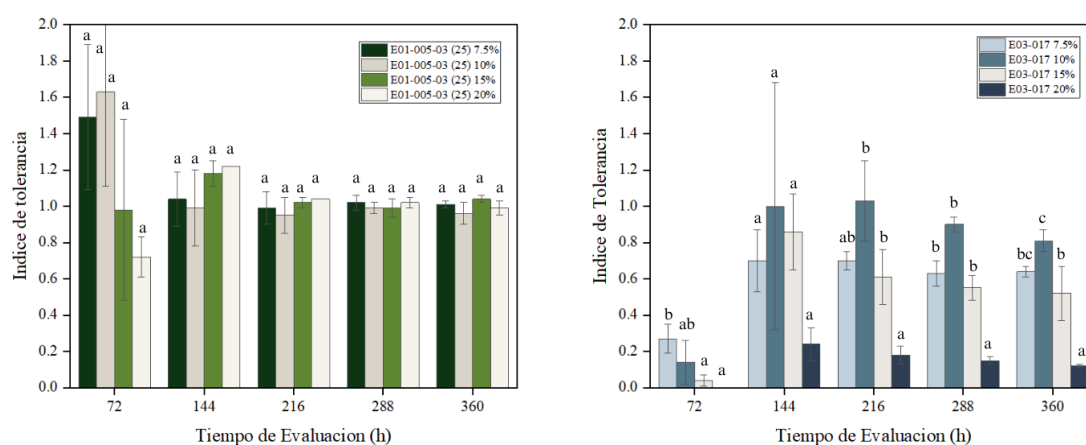


Figura 19. Comparación del crecimiento de las cepas E03-017 y E03-020-01 (25) en relación a la concentración de quebracho (7,5, 10, 15, y 20 %)

En la figura 19 se observa: **A)** crecimiento de la cepa E03-017 a diferentes concentraciones de quebracho, demostrando diferencias altamente significativas ($P < 0,01$) hasta las 360 horas de evaluación (ANOVA), por otro lado, la prueba de comparación múltiple de Tukey (a, b, c) indica el mayor crecimiento promedio desde las 144 horas hasta las 360 para la concentración de quebracho del 10 % (b y c). **B)** Crecimiento de la cepa E03-020-01 (25), no se muestran diferencias significativas ante las concentraciones de quebracho ($P > 0,05$) a lo largo de cada evaluación, por otro lado, la prueba de comparación múltiple de Tukey indica el mayor crecimiento de la cepa con una concentración de quebracho del 15 % para la última evaluación (360 h) (a).

Tabla 8. Evaluación y contraste de la tolerancias de las cepas fúngicas por porcentaje de quebracho

Concentración	Cepa	Concentración/índice de tolerancia				
		72 h	144 h	216 h	288 h	360 h
		$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
7,5 %	E03-020-01 (25)	1,49 $\pm$ 0,40	1,04 $\pm$ 0,15	0,99 $\pm$ 0,09	1,02 $\pm$ 0,04	1,01 $\pm$ 0,02
	E03-017	0,27 $\pm$ 0,08	0,70 $\pm$ 0,17	0,70 $\pm$ 0,05	0,63 $\pm$ 0,07	0,66 $\pm$ 0,03
	t	5,17	2,62	5,07	9,00	18,18
	SIGNIFICANCIA (P)	0,007 $P < 0,05$	0,059 $P > 0,05$	0,007 $P < 0,05$	0,001 $P < 0,05$	0,000 $P < 0,05$
10 %	E03-020-01 (25)	1,63 $\pm$ 0,52	0,99 $\pm$ 0,21	0,95 $\pm$ 0,10	0,99 $\pm$ 0,03	0,96 $\pm$ 0,06
	E03-017	0,14 $\pm$ 0,12	1,00 $\pm$ 0,68	1,03 $\pm$ 0,22	0,90 $\pm$ 0,04	0,84 $\pm$ 0,06
	t	4,788	0,032	0,555	3,274	2,352
	SIGNIFICANCIA (P)	0,009 $P < 0,05$	0,976 $P > 0,05$	0,609 $P > 0,05$	0,031 $P < 0,05$	0,078 $P > 0,05$
15 %	E03-020-01 (25)	0,98 $\pm$ 0,50	1,18 $\pm$ 0,07	1,02 $\pm$ 0,03	0,99 $\pm$ 0,05	1,04 $\pm$ 0,02
	E03-017	0,04 $\pm$ 0,03	0,86 $\pm$ 0,21	0,61 $\pm$ 0,15	0,55 $\pm$ 0,07	0,54 $\pm$ 0,15
	t	3,218	2,543	4,727	8,514	5,668
	SIGNIFICANCIA (P)	0,032 $P < 0,05$	0,064 $P > 0,05$	0,009 $P < 0,05$	0,001 $P < 0,05$	0,005 $P < 0,05$
20 %	E03-020-01 (25)	0,72 $\pm$ 0,11	1,22 $\pm$ 0,00	1,04 $\pm$ 0,00	1,02 $\pm$ 0,03	0,99 $\pm$ 0,04
	E03-017	0,00 $\pm$ 0,00	0,24 $\pm$ 0,09	0,18 $\pm$ 0,05	0,15 $\pm$ 0,02	0,13 $\pm$ 0,01
	t	11,509	19,6	32,505	43,5	37,925
	SIGNIFICANCIA (P)	0,000 $P < 0,05$	0,000 $P < 0,05$	0,000 $P < 0,05$	0,000 $P < 0,05$	0,000 $P < 0,05$

En la tabla 8 se muestran los promedios y desviaciones estándar de la tolerancia de las cepas E03-017 y E03-020-01 (25) en medio mínimo en solución con quebracho a las diferentes

concentraciones y en los diferentes tiempos de evaluación (72, 144, 216, 288 y 360 horas). También se muestran los valores de la prueba estadística *t* de student.

Para el 7,5 % de concentración de quebracho, durante la primera evaluación existe una diferencia significativa entre ambas cepas ($P<0,05$), indicando que una de estas creció mejor en comparación con la otra (E03-020-01 (25)), posteriormente no existen diferencias significativas (144 h) presentando valores de $P>0,05$, esto sugiere que, aunque la cepa E03-020-01 (25) presenta una mayor tolerancia, no es estadísticamente significativa, a las 216 h se vuelven a reforzar las diferencias ($P<0,05$), la cepa E03-020-01 (25) sigue manteniendo una tolerancia considerablemente mayor, el crecimiento parece estabilizarse entre cepa y cepa pero las diferencias persisten. A las 288 h se presentan diferencias altamente significativas ($P=0,001$), siendo nuevamente la cepa E03-020-01 (25) quien mantiene su capacidad de crecer en presencia de quebracho, al finalizar la evaluación (360 h) las diferencias llegan a su punto más alto ($P<0,00$) la tolerancia de la cepa E03-020-01 (25) se ve completamente diferenciada de la cepa E03-017 con un crecimiento estable y constante en Quebracho.

Al 10 % de concentración, la cepa E03-020-01 (25) muestra una tolerancia significativamente mayor que la cepa E03-017 ($P=0,009$) para las primeras horas de evaluación, posteriormente (144 y 216 h), las cepas parecen presentar índices de tolerancia similares ya que no existen diferencias significativas, sin embargo, para la cuarta evaluación, la cepa E03-020-01 (25) vuelve a presentar una mayor tolerancia ($P=0,031$). Finalmente, las diferencias disminuyen para la última evaluación, indicando que al 10 % de quebracho ambas cepas presentan una tolerancia similar.

Al 15 % de quebracho, la cepa E03-020-01 (25) muestra una tolerancia significativamente mayor durante las primeras horas de evaluación ($P=0,032$), durante la segunda evaluación ambas cepas parecen alcanzar tolerancias similares ya que no se presentan diferencias significativas, las diferencias se vuelven a marcar para la tercera evaluación ($P=0,009$), siendo la cepa E03-020-01 (25) quien presenta una mayor tolerancia. A las 288 h las diferencias se marcan aún más ($P=0,001$), la cepa E03-020-01 (25) parece crecer sin problemas mientras que la cepa E03-017 parece verse inhibida. Al finalizar el experimento la cepa E03-017 mantiene un mayor crecimiento, pero sigue siendo significativamente bajo en comparación con la cepa E03-020-01 (25). Durante todas las evaluaciones

Al 20 % la cepa E03-020-01 (25) supera de manera consistente y altamente significativa a la cepa E03-017 durante todos los tiempos evaluados, la magnitud de las diferencias y los valores de *t* reflejan una respuesta muy estable y claramente diferenciada entre ambas cepas.

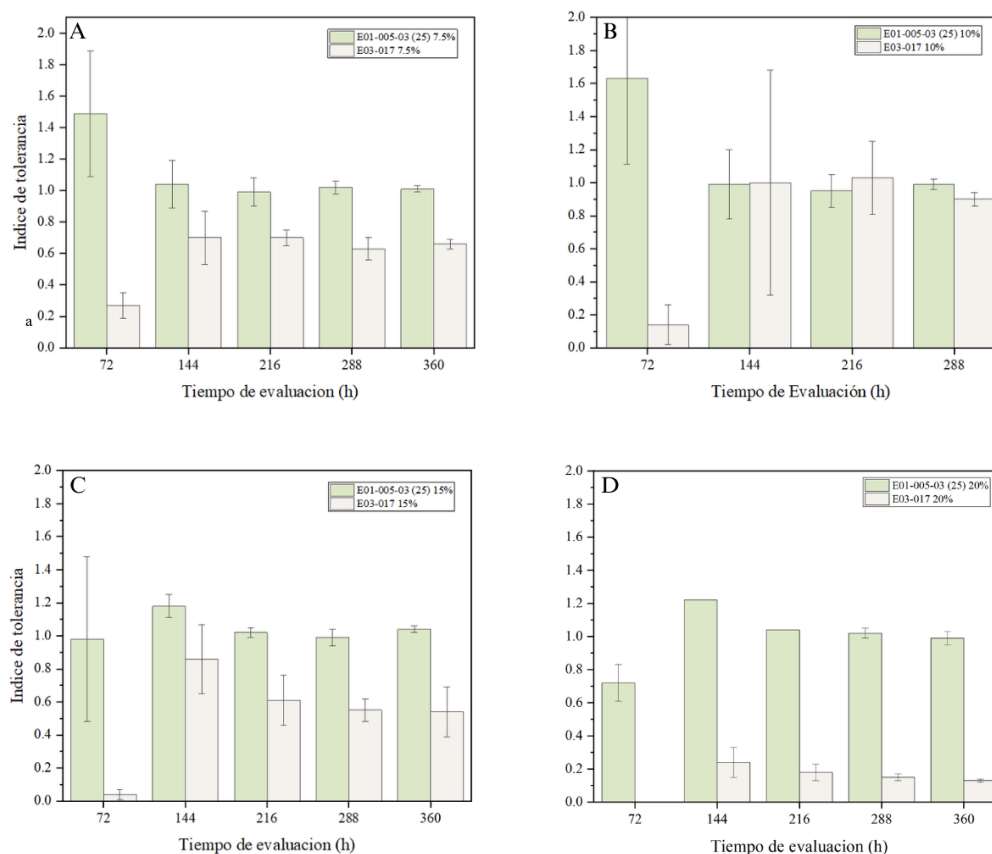


Figura 20. Contraste del índice de tolerancia de las cepas E03-017 (beige) y E03-020-01 (25) (verde) según el porcentaje de quebracho desde las 72 horas hasta las 360 horas de evaluación.

En la figura 20, se observa: **A)** Crecimiento de las cepas E03-017 (beige) y E03-020-01 (25) (verde) sembradas en medio mínimo al 7,5 % de quebracho, siendo la cepa E03-020-01 (25) quien presenta un mejor crecimiento en comparación con la cepa E03-017. **B)** Crecimiento al 10 % de concentración de quebracho, la cepa E03-020-01 (25) tiene un máximo de crecimiento a las 72 horas de evaluación, y la cepa E03-017 a las 244 horas. **C)** Crecimiento al 15 % de concentración de quebracho, la cepa E03-020-01 (25) muestra su mayor crecimiento a las 144 horas al igual que la cepa E03-017. **D)** Crecimiento al 20 % de concentración de quebracho, la cepa E03-020-01 (25) muestra un crecimiento notablemente mayor en comparación con la cepa E03-017, mostrando su mayor crecimiento a las 144 horas de evaluación.

Los resultados mostraron que la capacidad de crecimiento varió significativamente de acuerdo a la concentración de taninos, sugiriendo que la concentración del taninos de quebracho puede comprometer la viabilidad de estas especies fúngicas. En estudios previos, se ha empleado el índice enzimático como criterio de selección de cepas con capacidad taninolítica, por ejemplo,

Thakur et al.⁶⁴ evaluaron el crecimiento de las cepas fúngicas en medio con ácido tánico mediante la formación de halos de hidrólisis o zonas de aclaramiento, el Índice Enzimático se definió como la razón entre el diámetro del halo y el diámetro de la colonia, posteriormente se seleccionaron las cepas $EI \geq 2,0$ como las más prometedoras. Si bien en el presente trabajo no se hizo la determinación del índice enzimático, se aplicó un enfoque complementario basado en la evaluación de la tolerancia a diferentes concentraciones de tanino de quebracho, empleando un Índice de Tolerancia (IT) definido como la relación entre el crecimiento en medio con quebracho entre el medio sin él (control). Dicho índice permitió la evaluación de las cepas y su capacidad de mantener su crecimiento y desarrollo en condiciones de estrés, representando una ventaja en un contexto de remediación de efluentes reales. Si bien estos cálculos miden fenómenos distintos (EI =capacidad enzimática e IT =resistencia al estrés) ambos representan una herramienta clave en la selección y evaluación del comportamiento de cepas con potencial remediador en este tipo de efluentes. Por otro lado, la tolerancia fúngica a taninos fue evaluada por Bhat et al.⁶⁶ evaluaron la tolerancia de *Aspergillus niger* frente al tanino de quebracho mediante la determinación de biomasa micelial en medio líquido con el tanino (quebracho y ácido tánico) como única fuente de carbono. La producción de micelio se interpretó como un indicador de tolerancia, encontrando una máxima tolerancia por *A. niger* de 150 g/L. Este indicador de tolerancia se interpretó como una posible utilización metabólica del tanino por medio de la cepa. Si bien este enfoque permite realizar una estimación de la tolerancia fúngica, no proporciona información sobre el grado de eficiencia del proceso de remoción.

3.3 Identificación molecular de las cepas seleccionadas capaces de degradar taninos

- **Cepa E03-020-01 (25)**

El análisis de comparación con la secuencia ITS1 con la base de datos de GenBank por medio del software BLAST mostro un 100 % de similitud con la especie *Aspergillus niger* y *Aspergillus awamori* (Figura 21). Del mismo modo, se llevó a cabo un análisis filogenético (Figura 22) empelando el modelo Fast Minimum Evolution donde la secuencia evaluada presento mayor acercamiento a las cepas *Aspergillus niger* y *Aspergillus awamori*

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 8

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
☒ <i>Aspergillus awamori</i> NBRC 4120 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 and 28S rRNA, partial and complete sequence	1031	1031	100%	0.0	100.00%	LC573565.1
☒ <i>Aspergillus niger</i> strain 1901NT-1.4.4 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1031	1031	100%	0.0	100.00%	MN585763.1
☒ <i>Aspergillus awamori</i> strain CIRM-BRFM 827 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S rRNA gene, partial sequence	1031	1031	100%	0.0	100.00%	PV108056.1
☒ <i>Aspergillus niger</i> isolate UASWS2528 PB-14 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1031	1031	100%	0.0	100.00%	MW793375.1
☒ <i>Aspergillus niger</i> strain G1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1031	1031	100%	0.0	100.00%	OR821802.1
☒ <i>Aspergillus niger</i> isolate 3110 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1031	1031	100%	0.0	100.00%	MT074422.1
☐ <i>Aspergillus niger</i> strain FM 2019 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1031	1031	100%	0.0	100.00%	MK377324.1
☐ <i>Aspergillus</i> sp. strain SS3 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1031	1031	100%	0.0	100.00%	KX928746.1

Figura 21. Porcentajes de similitud de las especies analizadas con la cepa E03-020-01 (25)

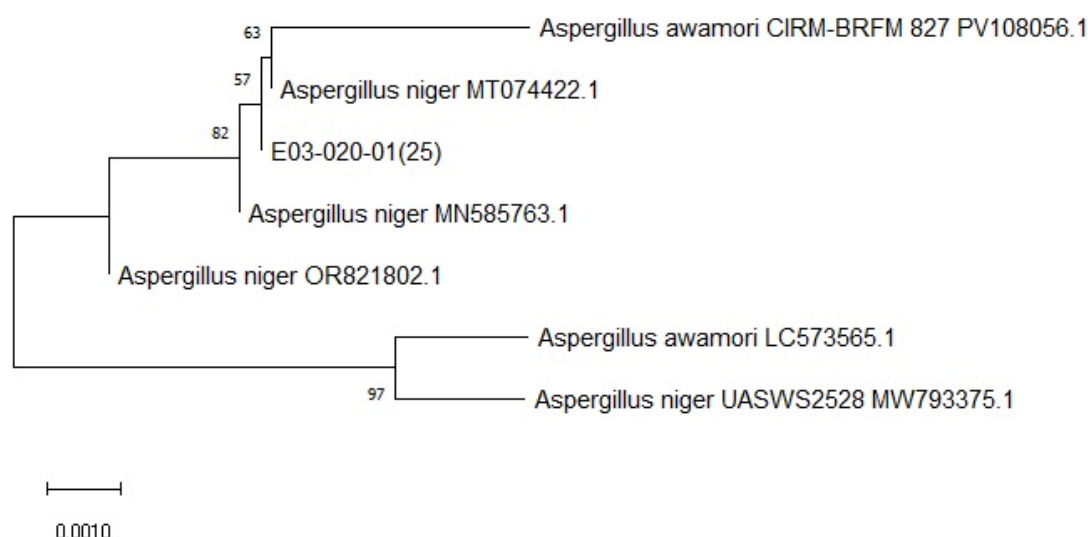


Figura 22. Árbol filogenético de la cepa E03-020-01 (25)

• Cepa E03-017

El análisis de comparación con la secuencia ITS1 con la base de datos de GenBank por medio del software BLAST mostro un 100 % de similitud con la especie *Penicillium crustosum* (Figura 23). Del mismo modo, se llevó a cabo un análisis filogenético (Figura 24) empelando el modelo Fast Minimun Evolution donde la secuencia evaluada presentó mayor acercamiento a las cepas *Penicillium crustosum*

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:10

Alignments	Download	GenBank	Graphics	Distance tree of results							
					Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
☒					Penicillium crustosum isolate P93A_R internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and large	1002	1002	100%	0.0	100.00%	OR005645.1
☒					Penicillium crustosum isolate APC-10 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and large	1002	1002	100%	0.0	100.00%	MW538312.1
☒					Penicillium commune strain H09-127 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete	1002	1002	100%	0.0	100.00%	KC0009833.1
☒					Penicillium sp. isolate OUCMDZ-5369 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete	1002	1002	100%	0.0	100.00%	OR994070.1
☒					Penicillium crustosum strain 86P 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete	1002	1002	100%	0.0	100.00%	EU128607.1
☒					Penicillium commune strain GHAE86 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete	1002	1002	100%	0.0	100.00%	KY174328.1
☐					Penicillium sp. isolate R2-001 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete	1002	1002	100%	0.0	100.00%	PQ876694.1
☒					Penicillium crustosum isolate Rae18 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete	1002	1002	100%	0.0	100.00%	PQ216307.1
☐					Penicillium crustosum strain CNUP0045 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete	1002	1002	100%	0.0	100.00%	HQ225710.1
☒					Penicillium christenseniae strain D63A2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete	1002	1002	100%	0.0	100.00%	PQ836312.1
☒					Uncultured Penicillium clone CE085401 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete	1002	1002	100%	0.0	100.00%	KC143756.1
☒					Penicillium commune strain H09-118 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete	1002	1002	100%	0.0	100.00%	KC0009828.1

Figura 23. Porcentajes de similitud de las especies analizadas con la cepa E03-017

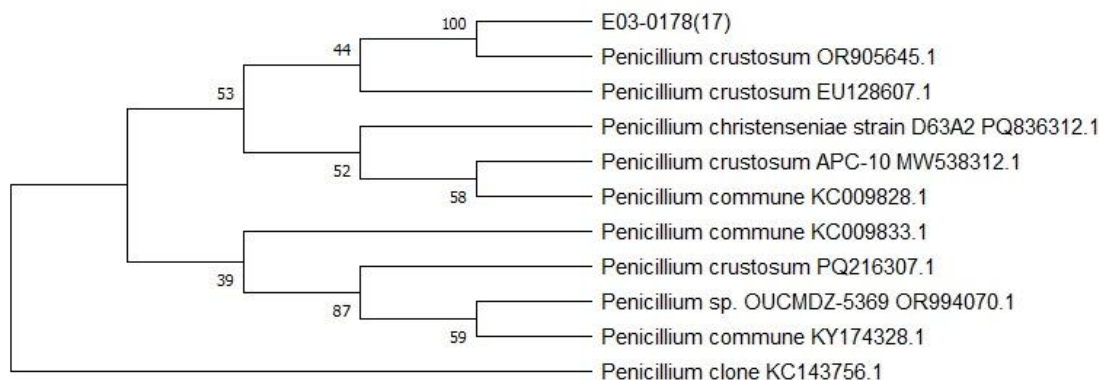


Figura 24. Árbol filogenético de la cepa E03-020-01 (25)

3.4 Determinación de la capacidad de remoción de taninos

- Cuantificación de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu**

Elaboración de la curva de calibración

Se procesaron las muestras de ácido gálico a concentraciones conocidas (0,1 - 1,2 mg/mL) y se leyeron las absorbancias a 727 nm (Tabla 9). La curva fue realizada por medio del programa MS Excel (Figura 25), obteniéndose un valor de R^2 de 0,9998, lo que indica una buena linealidad, demostrando la buena capacidad del método para predecir la concentración de fenoles en las muestras de quebracho. Asimismo, se obtuvo la ecuación de la recta: $y = 1,3568 - 0,0648x$, la cual se usó para determinar la concentración de polifenoles en las muestras de quebracho para cada evaluación.

Tabla 9. Valores de absorbancia obtenidos para las soluciones estándar de ácido gálico.

Concentración de ácido gálico (mg/mL)	Absorbancia (727 nm)
01	0,062
02	0,216
04	0,482
0,6	0,738
0,8	1,030
1	1,289
1,2	1,562

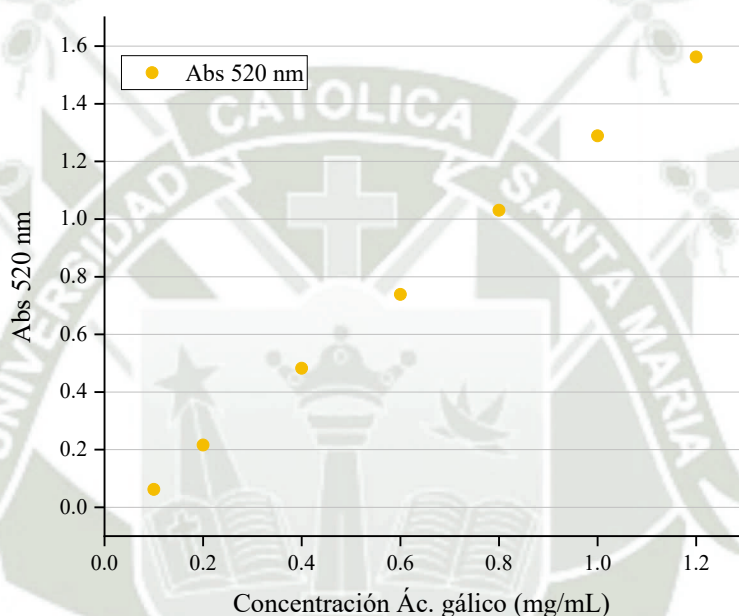


Figura 25. Curva de calibración.

- ***Cuantificación de polifenoles para la determinación de la capacidad de degradación de los hongos filamentosos nativos aislados sobre el tanino de quebracho***

Se llevó a cabo la cuantificación de polifenoles por el método de Folin ciocalteau (figura 26) para cada evaluación utilizando la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración. Se utilizó el factor de corrección x4 para las primeras 4 evaluaciones.

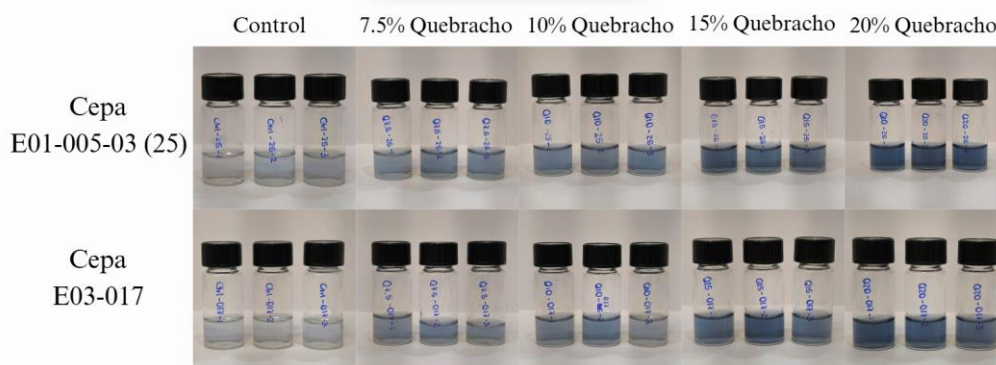


Figura 26. Desarrollo de color de las muestras extraídas de las cepas *A.niger/awamori* y *P. crustosum* a las 360 horas de evaluación

Tabla 10. Evaluación y comparación de la concentración de ácido gálico (mg/mL) producido por las cepas fúngicas en las diferentes concentraciones de quebracho.

Cepa	Concentración	72 h	144 h	216 h	288 h	360 h
		$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
<i>A. niger/awamori</i>	Ctrl	29,76 $\pm$ 2,92	24,63 $\pm$ 1,52	25,92 $\pm$ 1,48	27,27 $\pm$ 0,56	14,68 $\pm$ 1,17
	7,5 %	33,28 $\pm$ 0,67	33,15 $\pm$ 0,84	31,50 $\pm$ 1,38	29,52 $\pm$ 1,29	24,66 $\pm$ 1,40
	10 %	47,57 $\pm$ 0,77	43,80 $\pm$ 0,89	40,88 $\pm$ 0,28	38,47 $\pm$ 1,14	32,60 $\pm$ 0,63
	15 %	59,97 $\pm$ 1,34	56,07 $\pm$ 0,91	53,19 $\pm$ 0,78	49,86 $\pm$ 0,65	47,31 $\pm$ 0,13
	20 %	83,59 $\pm$ 0,70	75,90 $\pm$ 0,18	70,50 $\pm$ 0,50	61,39 $\pm$ 1,98	67,92 $\pm$ 0,71
ANOVA F		608,634	1310,124	953,905	406,339	1527,778
SIGNIFICANCIA (P)		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
		$P<0,01$	$P<0,01$	$P<0,01$	$P<0,01$	$P<0,01$
<i>P. crustosum</i>	Ctrl	29,46 $\pm$ 1,09	19,30 $\pm$ 0,27	24,70 $\pm$ 0,78	24,25 $\pm$ 0,73	9,90 $\pm$ 0,81
	7,5 %	36,92 $\pm$ 0,67	34,34 $\pm$ 0,24	33,39 $\pm$ 0,76	30,85 $\pm$ 0,96	21,40 $\pm$ 0,41
	10 %	47,16 $\pm$ 0,80	45,60 $\pm$ 1,07	45,52 $\pm$ 0,64	34,22 $\pm$ 1,70	26,38 $\pm$ 1,12
	15 %	59,23 $\pm$ 0,66	58,64 $\pm$ 1,54	55,29 $\pm$ 0,77	42,20 $\pm$ 0,95	54,37 $\pm$ 0,49
	20 %	71,29 $\pm$ 1,67	66,31 $\pm$ 0,45	62,69 $\pm$ 1,19	50,76 $\pm$ 0,26	46,08 $\pm$ 0,88
ANOVA F		761,326	1460,137	1007,232	299,637	1627,031
SIGNIFICANCIA (P)		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
		$P<0,01$	$P<0,01$	$P<0,01$	$P<0,01$	$P<0,01$

En la tabla 10, se muestran los promedios y desviaciones estándar de la concentración de ácido gálico obtenida por cada evaluación (72, 144, 216, 288 y 360 horas). Para *A. niger/awamori* se muestran diferencias altamente significativas de acuerdo con la prueba estadística de comparación ANOVA ($P<0,01$) en las diferentes concentraciones de quebracho. Estas

diferencias se observan desde el inicio del experimento con un valor ya muy alto de F (608,634), y encuentran su punto máximo al final del experimento ($F=1527,778$) demostrando que las diferencias de vuelven aún más marcadas en esta etapa lo que a su vez indica que las condiciones de concentración afectan de manera acumulativa.

En cuanto a la cepa *P. crustosum* también se muestran diferencias significativas entre las concentraciones de quebracho ($P<0,01$) para todos los casos, pero, el desarrollo de los valores de F sigue un patrón diferente al de la otra cepa. Ya que los valores de F comienzan siendo altos hasta la cuarta evaluación donde se observa un deceso notable en las diferencias, esto podría iniciar una menor variabilidad entre las concentraciones, sin embargo, se obtiene el mayor valor de F al final del experimento, confirmando que la concentración de quebracho determina claramente el comportamiento de producción de ácido gálico por esta cepa.

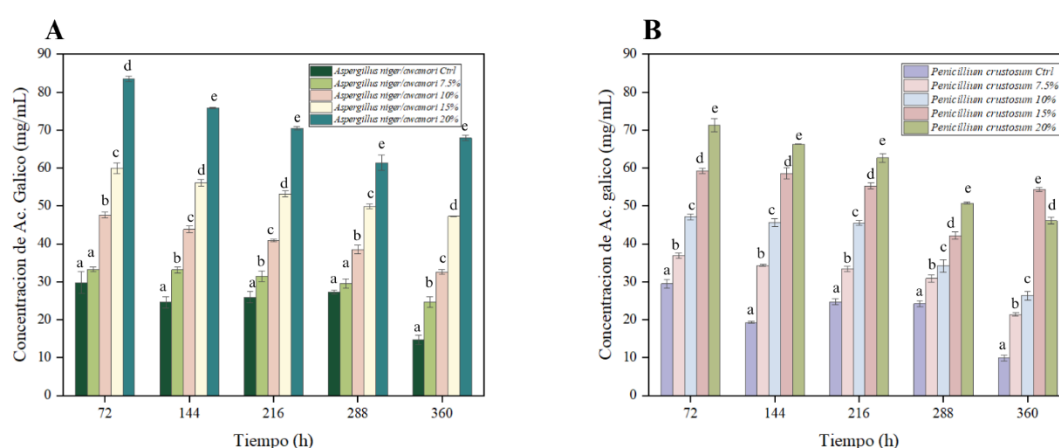


Figura 27. Comparación de la concentración de ácido gálico (mg/mL) presente en las diferentes concentraciones de quebracho (7,5, 10, 15 y 20 %) a lo largo de las evaluaciones (A: *A. niger/awamori*, B: *P. crustosum*)

En la figura 27 se observa: **A)** Se muestran las pruebas de comparación múltiple de Tukey para la cepa *A. niger/awamori* ante las diferentes concentraciones quebracho. Se observa la mayor liberación de ácido gálico durante la primera evaluación (72 h), al 20 % de quebracho (d) y la menor liberación al 7,5 % (excluyendo el control). En la segunda evaluación, las diferencias entre concentraciones se remarcan, siendo al 20 % donde se encuentra la mayor liberación de ácido gálico (e), las diferencias se mantienen marcadas para cada concentración a lo largo de la siguientes evaluaciones, teniendo a la concentración del 20 % de quebracho donde se libera una mayor cantidad de fenoles (e). **B)** Se muestran las pruebas de comparación múltiple de Tukey para la cepa *P. crustosum* ante las diferentes concentraciones quebracho. Se muestran diferencias significativas entre cada concentración de quebracho desde el inicio del

tratamiento, se muestra un mayor liberación de ácido gálico al 20 % de concentración de quebracho para todas las evaluaciones (e), sin embargo, durante la quinta evaluación la cepa libera una mayor cantidad de ácido gálico al 15 % de concentración de quebracho.

Tabla 11. Evaluación y contraste de la concentración de ácido gálico (mg/mL) liberado por las cepas fúngicas en relación al % de quebracho

Cepa	Concentración	72 h	144 h	216 h	288 h	360 h
		$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
7,5 %	<i>A. niger/awamori</i>	33,28 $\pm$ 0,67	33,15 $\pm$ 0,84	31,50 $\pm$ 1,39	29,52 $\pm$ 1,29	24,65 $\pm$ 1,40
	<i>P. crustosum</i>	36,92 $\pm$ 0,67	34,34 $\pm$ 0,25	33,39 $\pm$ 0,76	30,85 $\pm$ 0,96	21,40 $\pm$ 0,41
	<i>t</i>	6,673	2,369	2,076	1,446	3,860
	SIGNIFICANCIA (P)	0,003	0,077	0,107	0,222	0,018
		$P < 0,05$	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P < 0,05$
10 %	<i>A. niger/awamori</i>	47,57 $\pm$ 0,77	43,81 $\pm$ 0,89	40,88 $\pm$ 0,28	38,47 $\pm$ 1,14	32,60 $\pm$ 0,63
	<i>P. crustosum</i>	47,16 $\pm$ 0,80	45,60 $\pm$ 1,07	45,60 $\pm$ 0,64	34,22 $\pm$ 1,70	26,39 $\pm$ 1,12
	<i>t</i>	0,640	2,243	11,529	3,614	8,396
	SIGNIFICANCIA (P)	0,557	0,088	0,000	0,022	0,001
		$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P < 0,05$	$P < 0,05$	$P < 0,05$
15 %	<i>A. niger/awamori</i>	59,97 $\pm$ 1,34	56,07 $\pm$ 0,91	53,19 $\pm$ 0,78	49,86 $\pm$ 0,65	47,31 $\pm$ 0,13
	<i>P. crustosum</i>	59,23 $\pm$ 0,66	58,64 $\pm$ 1,54	55,29 $\pm$ 0,77	42,20 $\pm$ 0,95	54,37 $\pm$ 0,49
	<i>t</i>	0,854	2,491	3,324	11,536	24,437
	SIGNIFICANCIA (P)	0,441	0,067	0,029	0,000	0,000
		$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P < 0,05$	$P < 0,05$	$P < 0,05$
20 %	<i>A. niger/awamori</i>	83,59 $\pm$ 0,70	75,90 $\pm$ 0,18	70,50 $\pm$ 0,50	61,39 $\pm$ 1,98	67,92 $\pm$ 0,71
	<i>P. crustosum</i>	71,29 $\pm$ 1,70	66,31 $\pm$ 0,05	62,69 $\pm$ 1,19	50,76 $\pm$ 0,26	46,08 $\pm$ 0,88
	<i>t</i>	11,614	89,545	10,513	9,240	33,669
	SIGNIFICANCIA (P)	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000
		$P < 0,05$	$P < 0,05$	$P < 0,05$	$P < 0,05$	$P < 0,05$

En la tabla 11 se muestran los promedios y desviaciones estándar del contenido de ácido gálico liberado por las 2 cepas fúngicas ante las diferentes concentraciones de quebracho, del mismo modo se muestran los valores de la prueba estadística de t de Student. Al 7,5 % de concentración no se observan diferencias significativas ($P > 0,05$) durante la mayoría de las evaluaciones, salvo al inicio (72 h) y al final del experimento (360 h), esto indica que ambas cepas poseen un comportamiento similar a esta concentración, aunque cabe resaltar que *P. crustosum* aumenta su producción de ácido gálico hacia el final. Al 10 % se muestran

diferencias significativas a partir de las 216 h, donde *P. crustosum* muestra una producción progresiva con el tiempo. Al 15 % nuevamente se presentan diferencias significativas a partir de la tercera evaluación y se amplían desde las 288 h en adelante. Al 20 % se presentan diferencias altamente significativas ($P<0,01$) en todos los tiempos confirmándose que *P. crustosum* posee una mayor tolerancia y capacidad de procesar concentraciones altas de taninos.

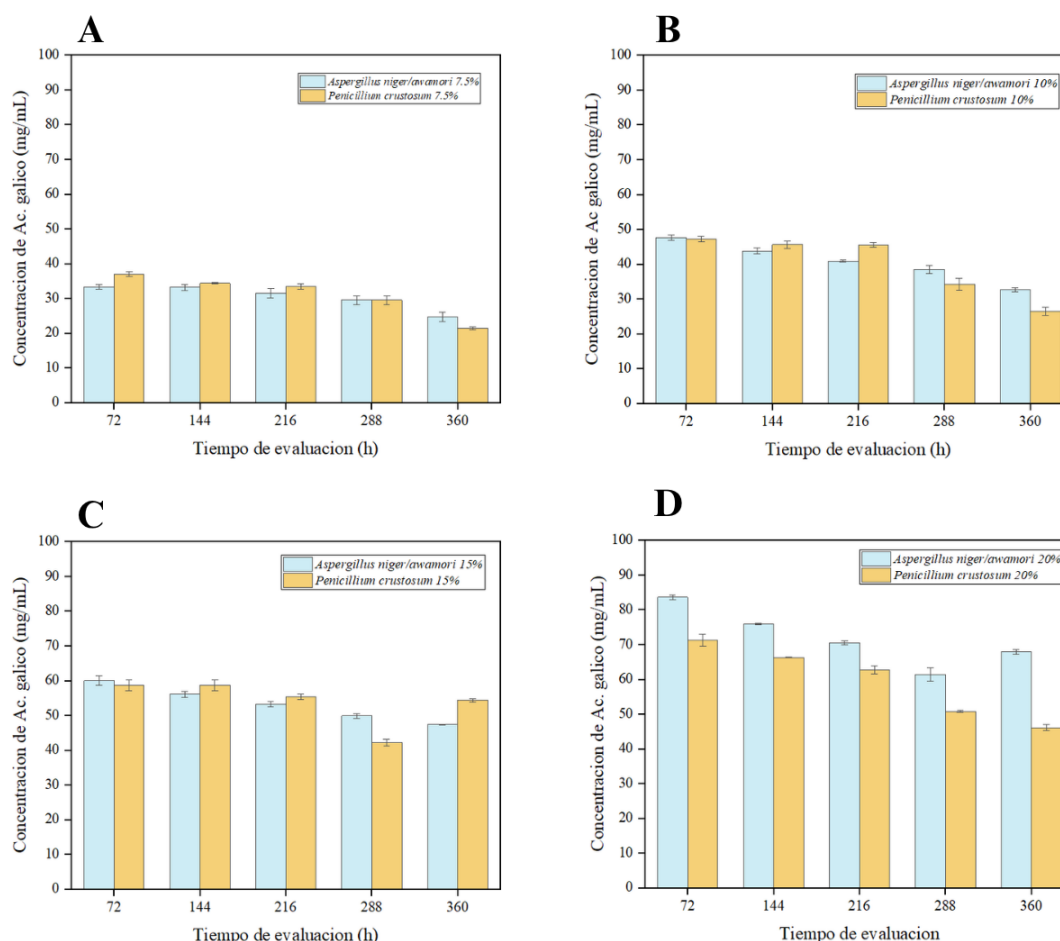


Figura 28. Contraste de la concentración de ácido gálico (mg/mL) producido por *A. niger/awamori* (celeste) y *P. crustosum* (naranja) según el porcentaje de quebracho desde las 72 horas hasta las 360 horas de evaluación.

En la figura 28, se observa: **A)** Degradación de taninos a ácido gálico por medio de las cepas *A. niger/awamori* (celeste) y *P. crustosum* (naranja) sembradas en medio líquido al 7,5 % de quebracho, la cepa *A. niger/awamori* presenta un pico de mayor producción a las 72 horas de trabajo (33,28 mg/mL), al igual que *P. crustosum* (36,92 mg/mL) llegando a superar a la cepa *A. niger/awamori*, la cantidad de ácido gálico librado por ambas cepas disminuye al final del experimento. **B)** Degradación de taninos al 10 % de concentración de quebracho, ambas cepas

A. niger/awamori y *P. crustosum* alcanzan su mayor producción o a las 72 horas de evaluación (47,57 y 47,16 mg/mL, respectivamente), del mismo modo, la cantidad de ácido gálico librado por ambas cepas disminuye al final del experimento. **C)** Producción de ácido gálico al 15 % de concentración de quebracho, las cepas parecen mantener una producción similar de ácido gálico, *A. niger/awamori* alcanza la mayor producción nuevamente a las 72 h (59,97 mg/mL) seguida de la cepa *P. crustosum* que también alcanza su máxima producción de ácido gálico durante esta evaluación (59,23mg/mL) **D)** Producción de ácido gálico de las cepas fúngicas al 20 % de concentración de quebracho, la cepa *A. niger/awamori* muestra una mayor producción en comparación con la cepa *P. crustosum* a lo largo de todas las horas de trabajo, alcanzando su pico de mayor producción a las 72 h (83,59 mg/mL), por otro lado, *P. crustosum* presenta una mayor producción de ácido gálico también a las 216 horas (71,29 mg/mL).

3.5 Evaluación de la actividad tanasa

- *Ensayo de tanasa*
- *Elaboración de la curva de calibración*

Se procesaron las muestras de ácido gálico a concentraciones conocidas (5 – 70 µg/mL) y se leyeron las absorbancias a 520 nm (Tabla 12). La curva se obtuvo por medio del programa MS Excel (Figura 29), obteniéndose un valor de R^2 de 0,9903. Asimismo, se obtuvo la ecuación de la recta: $y = 0,0094x - 0,005$

Tabla 12. Absorbancias obtenidas para cada solución estándar de ácido gálico.

Concentración de ácido gálico (µg/mL)	Absorbancia (520 nm)
0,1	0,041
0,2	0,101
0,4	0,184
0,6	0,283
0,8	1,355
1	0,417
1,2	0,664

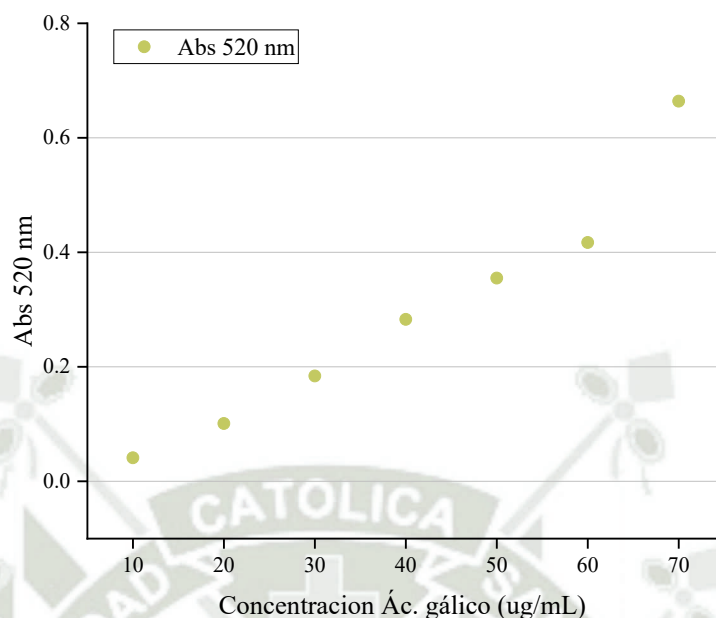


Figura 29. Curva de calibración de ácido gálico obtenida del programa MS Excel, se evidencian los valores de R^2 y de ecuación de la recta.

En la figura 29 se muestra la curva de calibración conseguida a partir de las soluciones estándar de ácido gálico, se obtuvo un valor de R^2 de 0,9903 indicando que la relación entre la concentración de ácido gálico y las absorbancias obtenidas es bastante fuerte, lo que demuestra que es muy precisa para medir los valores desconocidos de ácido gálico producidos por las cepas fúngicas a las diferentes concentraciones de ácido tánico.

- ***Determinación de la actividad tanasa de las cepas fúngicas seleccionadas***

Se llevó a cabo la cuantificación de ácido gálico para cada evaluación utilizando el protocolo de tanasa para el desarrollo de color (Figura 30), asimismo se empleó la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración, seguido de eso, se cuantificaron las unidades enzimáticas.

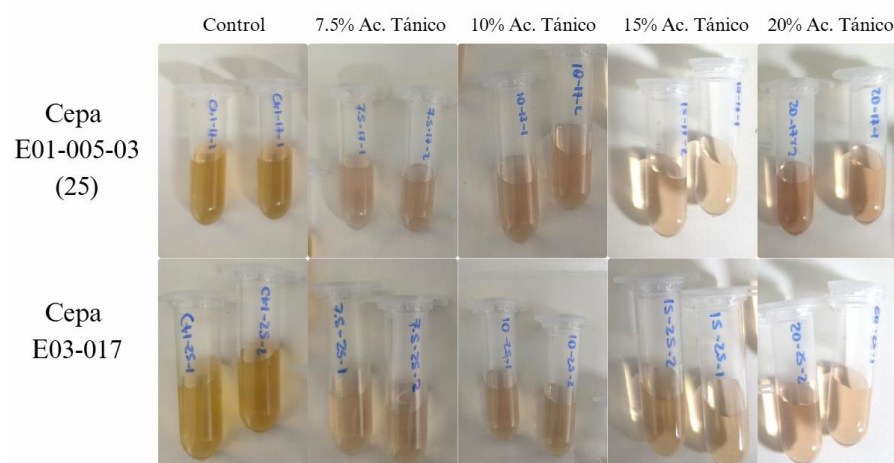


Figura 30. Comparación de la actividad enzimática tanasa de las cepas *A. niger/awamori* y *P. crustosum* a diferentes concentraciones de quebracho a las 360 h de evaluación.

Tabla 13. Evaluación y contraste de la actividad enzimática tanasa de los porcentajes de quebracho por estirpe fúngica.

CEPA	% Ac. Tánico	72 h	144 h	216 h	288 h	360 h
		$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
<i>A. niger/awamori</i>	Ctrl	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00
	7,5 %	1,42 $\pm$ 0,01	1,53 $\pm$ 0,07	1,12 $\pm$ 0,09	3,01 $\pm$ 0,30	3,23 $\pm$ 0,11
	10 %	1,47 $\pm$ 0,04	1,44 $\pm$ 0,09	1,37 $\pm$ 0,08	2,28 $\pm$ 0,06	3,42 $\pm$ 0,01
	15 %	1,48 $\pm$ 0,04	1,46 $\pm$ 0,03	1,57 $\pm$ 0,03	1,63 $\pm$ 0,15	3,08 $\pm$ 0,04
	20 %	1,67 $\pm$ 0,07	1,74 $\pm$ 0,03	2,03 $\pm$ 0,28	3,58 $\pm$ 0,06	3,58 $\pm$ 0,03
ANOVA F		958,995	515,841	94,009	240,038	2565,671
SIGNIFICANCIA (P)		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
		<i>P</i> <0,01	<i>P</i> <0,01	<i>P</i> <0,01	<i>P</i> <0,01	<i>P</i> <0,01
<i>P. crustosum</i>	Ctrl	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00
	7,5 %	1,73 $\pm$ 0,06	1,59 $\pm$ 0,04	2,47 $\pm$ 0,42	2,81 $\pm$ 0,07	2,00 $\pm$ 0,03
	10 %	2,01 $\pm$ 0,06	1,67 $\pm$ 0,04	1,87 $\pm$ 0,08	2,57 $\pm$ 0,04	3,19 $\pm$ 0,05
	15 %	1,77 $\pm$ 0,06	1,98 $\pm$ 0,01	1,77 $\pm$ 0,13	3,92 $\pm$ 0,12	2,70 $\pm$ 0,16
	20 %	2,70 $\pm$ 0,24	2,70 $\pm$ 0,03	1,92 $\pm$ 0,13	3,70 $\pm$ 0,47	3,17 $\pm$ 0,03
ANOVA F		223,52	3442,39	60,72	150,38	928,93
SIGNIFICANCIA (P)		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
		<i>P</i> <0,01	<i>P</i> <0,01	<i>P</i> <0,01	<i>P</i> <0,01	<i>P</i> <0,01

En la tabla 13 se muestran los promedios y las desviaciones estándar de las cepas fúngicas a diferentes concentraciones de quebracho (7,5, 10, 15 y 20 %) desde las 72 h hasta las 360 horas de evaluación. Para *A. niger/awamori* se se muestran diferencias altamente significativas (*P*<0,001) entre las concentraciones de quebracho, desde el inicio del experimento (72 h) se puede observar que la concentración de ácido tánico afecta claramente en la actividad tanasa, a las 144 horas el valor de F disminuye con respecto a la primera evaluación (515,841) pero aún existen diferencias marcadas entre las concentraciones lo que puede indicar que la actividad tanasa cambia con el paso del tiempo dependiendo de la concentración de ácido tánico, a las 216 horas de trabajo el valor F disminuye considerablemente (94,009) y las diferencias siguen siendo notorias (*P*<0,001), esta disminución del valor F indica que las diferencias entre las concentraciones son menores en este punto, lo cual se puede interpretar como una disminución general de la actividad enzimática o que esta se está estabilizando, sin embargo, durante las últimas evaluaciones (288 y 360 horas) los valores de F vuelven a aumentar, se muestra el máximo valor de F a las 360 h de trabajo (2565,671), indicando que

las diferencias entre las concentraciones de ácido tánico son mucho más marcadas a medida que transcurre el tiempo, esto también podría revelar que a ciertas concentraciones de ácido tánico la producción de tanasa se ve favorecida y otras podrían inhibirla.

En cuanto *P. crustosum* también se muestran diferencias altamente significativas ante las diferentes concentraciones de ácido tánico ($P<0,001$). Durante la primera evaluación (72 horas) se vuelve a observar el claro efecto que tiene la concentración de ácido tánico sobre la producción de tanasa, las diferencias se intensifican en mayor medida a las 216 horas, obteniéndose un valor máximo de F de 3442,39 lo que sugiere que esta cepa responde de forma mucho más marcada ante las diferentes concentraciones, esto podría indicar que la actividad tanasa se ve favorecida a ciertas concentraciones de ácido tánico, pero a otras la actividad enzimática cae drásticamente. A las 216 horas el valor de F disminuye considerablemente (60,72), dando a entender que las diferencias podrían disminuir con el paso del tiempo, no obstante, estas vuelven a aumentar durante la cuarta evaluación ($F=150,38$) demostrando que la cepa *P. crustosum* podría recuperarse y cambiar su respuesta ante la concentración del sustrato, esto se vuelve a recalcar durante la última evaluación (360 h), donde el valor de F vuelve a aumentar en gran medida (928,93). Esto indica que a largo plazo la cepa muestra una respuesta muy diferenciada ante la concentración de ácido tánico, aunque no tanto como en la segunda evaluación.

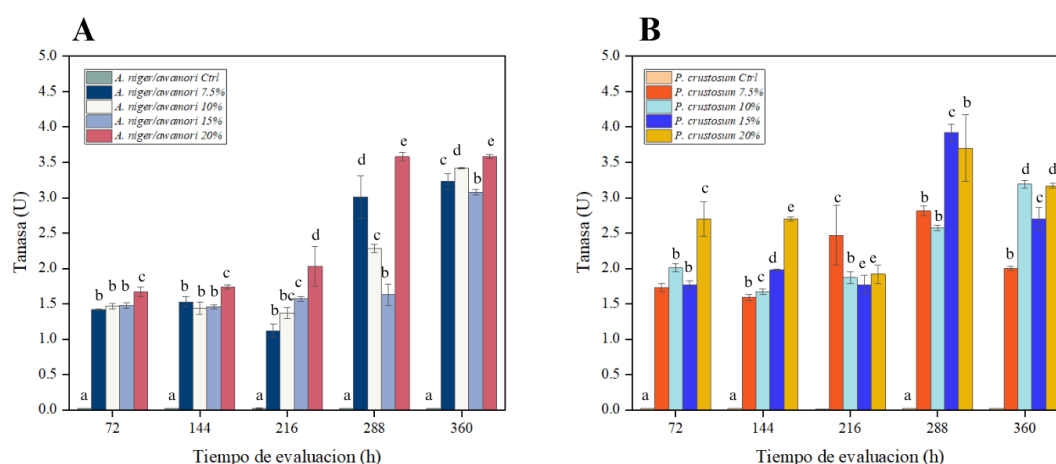


Figura 31. Contraste de actividad enzimática tanasa de *A. niger/awamori*(A) y *P. crustosum* (B) ante las concentraciones de ácido tánico.

En la figura 31 se muestra: A) U enzimáticas producidas por *A. niger/awamori* inoculada en diferentes concentraciones de ácido tánico desde las 72 h hasta las 360 h de evaluación. A las 72 horas el control muestra una actividad enzimática significativamente menor que cualquier

concentración (a) ya que no hay presencia de sustrato, por otro lado, las concentraciones de ácido tánico de 7,5, 10 y 15 % se encuentran en el mismo subconjunto (b) lo que sugiere que estas concentraciones no son significativamente diferentes entre sí, se muestra la mayor actividad enzimática al 20 % (c) con una media de 1,67; el mismo patrón se repite a las 144 h de evaluación. Con el paso del tiempo las diferencias entre concentraciones empiezan a definirse, se puede observar que para las 216 h las concentraciones de 7,5 % y 10 % no son significativamente diferentes entre sí (b), y 10 % no es significativamente diferente que de 15 % pero si la de 7,5 %; la concentración de 20 % vuelve a ser quien presenta la mayor actividad enzimática (d) indicando que es significativamente mayor que las demás. Para las ultimas evaluaciones (288 y 360 h) las concentraciones se vuelven significativamente diferentes entre sí, al 20% de ácido tánico existe la mayor producción de tanasa para el final del ensayo (e). **B)** U enzimáticas producidas por *P. crustosum* inoculada en diferentes concentraciones de ácido tánico desde las 72 h hasta las 360 h de evaluación. Para el inicio del experimento (72 h) no se muestran diferencias significativas para las concentraciones de 7,5, 10 y 15 % (b) pero si al 20 % donde se presenta la mayor actividad (c), las diferencias se vuelven significativas para todas las concentraciones durante la segunda evaluación (144 h) y se vuelve a presentar la mayor actividad tanasa al 20 % de concentración. A las 216 horas la mayor actividad enzimática se da a las concentraciones de 7,5 y 20 % (c) y a las 288 horas la mayor actividad enzimática se da en las concentraciones de 15 y 20 %, siendo al 15 % donde presenta más actividad que al 20% pero no es significativamente diferente. Para el final del experimento vuelven a mostrarse diferencias significativas entre las concentraciones de 7,5, 15 y 20 % (b, c, d) siendo al 20 y 10 % donde existe una mayor actividad enzimática (d).

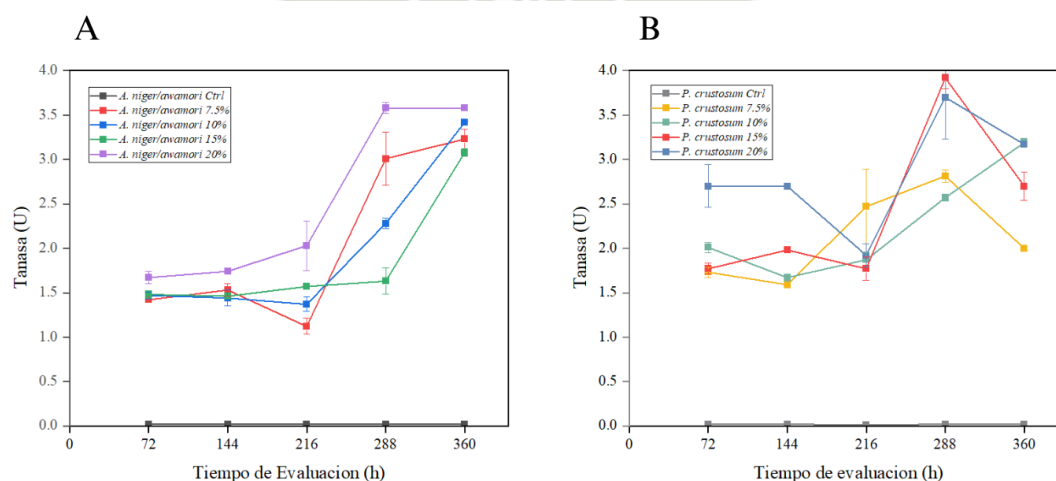


Figura 32. Curvas de actividad enzimática de *A. niger/awamori* (A) y *P. crustosum* (B) a las 4 concentraciones de ácido tánico durante las 360 horas de evaluación

En la figura 32 se observa: **A)** Curvas de actividad enzimática de *A. niger/awamori* ante las concentraciones de ácido tánico desde las 72 h hasta las 360 h de evaluación. Se puede observar una tendencia creciente ya que la actividad tanasa aumenta en todas las concentraciones con el paso del tiempo y alcanza su pico al final del experimento (360 h). Cabe resaltar que las concentraciones más altas de ácido tánico (15 y 20 %) muestran una mayor actividad enzimática, lo que indica que la producción de enzima tanasa se ve favorecida ante la mayor presencia de sustrato y al tiempo de incubación. **B)** Curvas de actividad enzimática de *P. crustosum* ante las concentraciones de ácido tánico desde las 72 h hasta las 360 h de evaluación. El comportamiento de esta cepa muestra fluctuaciones más marcadas en comparación con *A. niger/awamori* ya que su actividad no aumenta constantemente con el tiempo, más bien, alcanza un pico de producción enzimática a las 288 h y luego desciende, la actividad tanasa podría haber disminuido por agotamiento del sustrato.

Tabla 14. Evaluación y contraste de la actividad enzimática tanasa de *A. niger/awamori* y *P. crustosum* por concentración de ácido tánico.

Concentración	Cepa	U Tanasa				
		72 h	144 h	216 h	288 h	360 h
		$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
7,5 %	<i>A. niger/awamori</i>	1,42 $\pm$ 0,01	1,53 $\pm$ 0,07	1,12 $\pm$ 0,09	3,01 $\pm$ 0,30	3,23 $\pm$ 0,11
	<i>P. crustosum</i>	1,73 $\pm$ 0,06	1,59 $\pm$ 0,04	2,47 $\pm$ 0,42	2,81 $\pm$ 0,07	2,00 $\pm$ 0,03
	<i>t</i>	9,70	1,44	5,44	1,11	19,45
	SIGNIFICANCIA (<i>P</i>)	0,01	0,224	0,006	0,329	0,000
		<i>P</i> >0,05	<i>P</i> >0,05	<i>P</i> >0,05	<i>P</i> >0,05	<i>P</i> >0,05
10 %	<i>A. niger/awamori</i>	1,47 $\pm$ 0,04	1,44 $\pm$ 0,09	1,37 $\pm$ 0,08	2,28 $\pm$ 0,06	3,42 $\pm$ 0,01
	<i>P. crustosum</i>	2,01 $\pm$ 0,06	1,67 $\pm$ 0,04	1,87 $\pm$ 0,08	2,57 $\pm$ 0,04	3,19 $\pm$ 0,05
	<i>t</i>	13,37	4,045	7,842	7,69	7,813
	SIGNIFICANCIA (<i>P</i>)	0,000	0,016	0,001	0,002	0,001
		<i>P</i> >0,05	<i>P</i> >0,05	<i>P</i> >0,05	<i>P</i> >0,05	<i>P</i> >0,05
15 %	<i>A. niger/awamori</i>	1,48 $\pm$ 0,04	1,46 $\pm$ 0,03	1,57 $\pm$ 0,03	1,63 $\pm$ 0,15	3,08 $\pm$ 0,04
	<i>P. crustosum</i>	1,77 $\pm$ 0,06	1,98 $\pm$ 0,01	1,77 $\pm$ 0,13	3,92 $\pm$ 0,12	2,70 $\pm$ 0,16
	<i>t</i>	6,966	33,473	2,573	20,648	4,141
	SIGNIFICANCIA (<i>P</i>)	0,002	0,000	0,062	0,000	0,014
		<i>P</i> >0,05	<i>P</i> >0,05	<i>P</i> >0,05	<i>P</i> >0,05	<i>P</i> >0,05
20 %	<i>A. niger/awamori</i>	1,67 $\pm$ 0,07	1,74 $\pm$ 0,03	2,03 $\pm$ 0,28	3,58 $\pm$ 0,06	3,58 $\pm$ 0,03
	<i>P. crustosum</i>	2,70 $\pm$ 0,24	2,7 $\pm$ 0,03	1,92 $\pm$ 0,13	3,70 $\pm$ 0,47	3,17 $\pm$ 0,03
	<i>t</i>	7,268	39,192	0,631	0,451	20,278
	SIGNIFICANCIA (<i>P</i>)	0,002	0,000	0,562	0,672	0,000
		<i>P</i> >0,05	<i>P</i> >0,05	<i>P</i> >0,05	<i>P</i> >0,05	<i>P</i> >0,05

En la tabla 14 se muestran los promedios y desviaciones estándar de la actividad enzimática de *A. niger/awamori* y *P. crustosum* por cada concentración de ácido tánico hasta las 360 horas de evaluación, también se muestran los valores de la prueba de *t* de Student. Al 7,5 % de concentración se puede observar que la cepa *P. crustosum* presenta un mayor actividad enzimática tanasa para todos los tiempos de evaluación, sin embargo, solo se muestran diferencias significativas durante la primera y última evaluación. Al 10 % de concentración se presentan diferencias significativas para cada una de las evaluaciones (*P*<0,05), indicando una mayor actividad enzimática para la cepa *P. crustosum* para esta concentración. Del mismo

modo, al 15 % se vuelven a presentar diferencias significativas en casi todos los tiempos de evaluación (exceptuando a las 216 h, donde $P=0,062$) indicando un mayor actividad tanasa para la cepa *P. crustosum*. Finalmente, al 20 % de ácido tánico, es nuevamente la cepa *P. crustosum* quien presenta mayor actividad enzimática, aunque las diferencias no siempre son significativas.

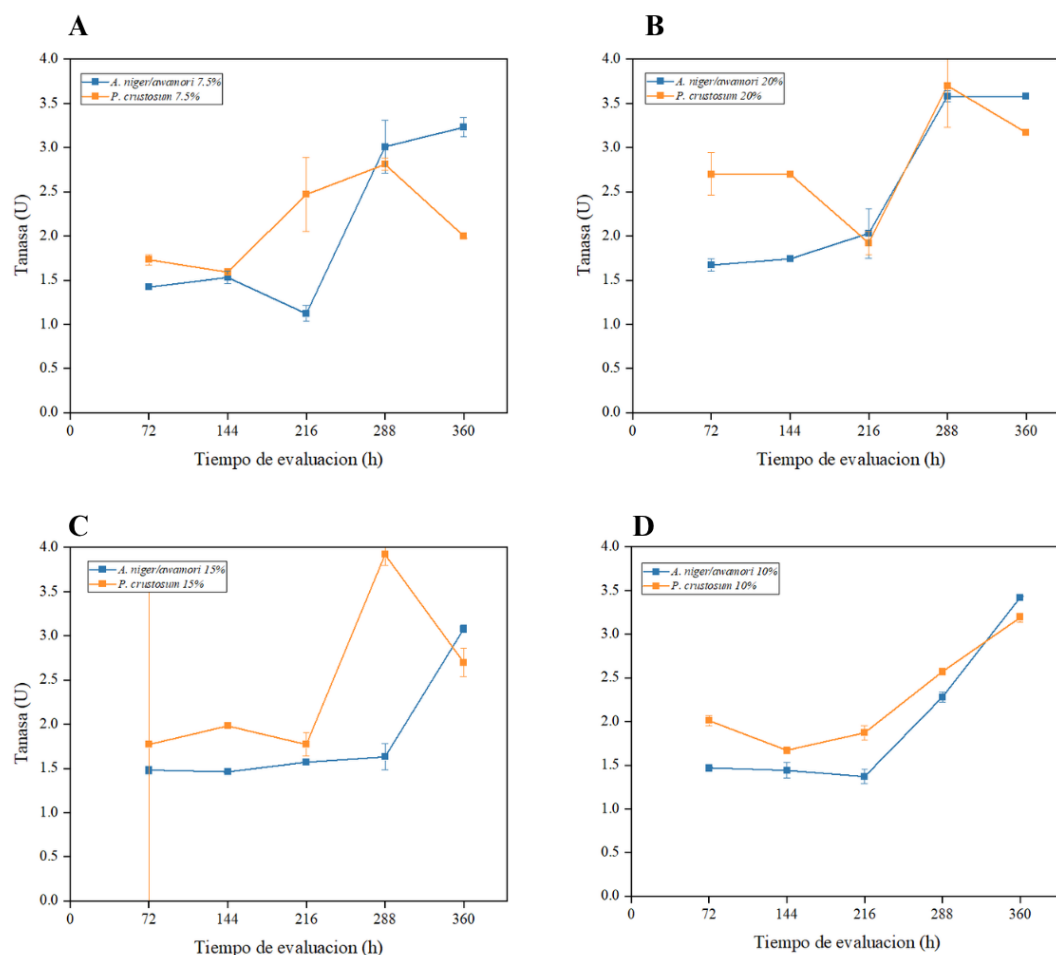


Figura 33. Comparación de actividad enzimática tanasa de *A. niger/awamori* (azul) y *P. crustosum* (naranja) para cada porcentaje de ácido tánico.

En la figura 33 se observa: **A)** Comparación de la actividad tanasa de ambas cepas al 7,5 % de ácido tánico, ninguna de las cepas presenta un comportamiento lineal a lo largo del tiempo. *A. niger/awamori* (azul) muestra un aumento de su actividad enzimática durante las primera evaluaciones, tiene un descenso a las 216 h y luego un aumento considerable hasta la última evaluación donde es su pico de mayor actividad enzimática, lo que sugiere que esta cepa mantiene una actividad enzimáticas más sostenida. *P. crustosum* tiene un pequeño descenso en su actividad enzimática a las 144 h, luego aumenta hasta llegar a su pico máximo a las 288

horas y disminuye al finalizar el ensayo, esto demuestra que su actividad enzimática podría tener una respuesta más rápida en comparación con *A. niger/awamori*. **B)** Comparación de la actividad tanasa de ambas cepas al 10 % de ácido tánico, *A. niger/awamori* vuelve a presentar un ligero descenso a las 216 h y luego un aumento hasta llegar a su punto máximo de actividad enzimáticas a las 360 horas. *P. crustosum*, por otro lado, presenta un ligero descenso en su actividad tanasa y a las 144 h, pero esta aumenta con el paso del tiempo y alcanza su pico de mayor actividad a las 360 horas, al igual que la otra cepa. **C)** Comparación de la actividad tanasa de ambas cepas al 15 % de ácido tánico, *A. niger/awamori* parece mantener un comportamiento constante durante las primeras 4 evaluaciones y aumenta alcanzando su máximo valor de actividad enzimática al finalizar el experimento. *P. crustosum*, a diferencia de la anterior, alcanza su mayor actividad enzimática a las 288 h de trabajo, lo que podría demostrar que esta cepa posee una respuesta más rápida en comparación con *A. niger/awamori*. **D)** Comparación de la actividad tanasa de ambas cepas al 20 % de ácido tánico. *A. niger/awamori* tiene un aumento en su actividad enzimática a lo largo de las primeras evaluaciones y esta vez tiene punto de mayor actividad a las 288 horas de trabajo. *P. crustosum*, por otra parte, presenta un claro descenso en su actividad tanasa durante la tercera evaluación (216 h) y posteriormente aumenta hasta alcanzar su pico de mayor actividad a las 288 horas del mismo modo que *A. niger/awamori*. A pesar de las diferencias visuales que se pueden observar en la figura, los valores de p para la prueba de t de Student mencionada anteriormente en la tabla 00 demuestran que estas diferencias no son estadísticamente significativas ($P > 0,05$), no obstante, si es posible apreciar visualmente el análisis de la prueba de comparación múltiple ANOVA ya que demuestran que la actividad enzimática de ambas cepas cambia significativamente ante cada concentración de ácido tánico ($P < 0,01$).

En este estudio, la actividad tanasa fue determinada y cuantificada por el método de rhodanina, ensayo ampliamente utilizado para detectar la liberación de ácido gálico como producto de la hidrólisis de taninos, este procedimiento fue inicialmente descrito por Sharma et al.⁵² y ha demostrado ser una herramienta sensible y específica para la detección y cuantificación de tanasa extracelular. Los resultados indicaron una remoción del $48,40 \pm 0,98\%$ para *Penicillium crustosum* (*P. crustosum*) en medio líquido suplementado con ácido tánico al 20 % y una eficiencia del $36,12 \pm 3,64 \%$ para *Aspergillus niger/awamori* en medio con 7,5 % de ácido tánico. Del mismo modo, Saad et al.⁶⁷ emplearon la cepa de *Aspergillus glaucus* aislada del residuo agroindustrial de la industria del té, obteniendo valores de eficiencia de remoción del 81 % en la bioconversión de ácido gálico a partir del ácido tánico por medio de tanasa inmovilizada y bajo condiciones optimizadas (pH 5,0, 40°C, 50 g/L y 24 h). Aunque las

condiciones experimentales difieren sustancialmente (tanasa extracelular vs. Tanasa inmovilizada, concentración de sustrato y tiempo de evaluación) esta similitud metodológica permite realizar una comparación directa. Mientras que *A. glaucus* fue evaluado bajo un sistema diseñado para optimizar al máximo la eficiencia enzimática en un corto periodo, el presente estudio analizó la actividad tanasa y la consecuente remoción de taninos en condiciones más prologadas (360 h) y concentraciones significativamente mayores de sustrato (hasta 20 %), a pesar de no haber pasado por un proceso de purificación e inmovilización las tanasa de *A. niger/awamori* y *P. crustosum* han demostrado un desempeño notable. Por otro lado, en el estudio de Srivastava y Kar⁶⁰ se describe la producción de tanasa por *A. niger* empelando casaca de granada como sustrato, la actividad tanasa fue cuantificada por medio del método de rhodanina. Se reportaron valores de actividad tanasa máxima de 16 U/mL (37 °C, pH 5,0, ácido tánico 2 %), en este estudio *Aspergillus niger/awamori* alcanzó una actividad máxima de $2,81 \pm 0,07$ U/mL a las 288 horas en medio con ácido tánico al 7,5 % mientras que *Penicillium crustosum* presentó una actividad máxima de $3,70 \pm 0,47$ U/mL en ácido tánico al 20 %. Esta diferencias en actividad enzimática se pueden atribuir a diversos factores, entre ellos las condiciones de cultivo, concentración de sustrato y tiempo de evaluación. Al igual que Saad et al.⁶⁷ el estudio de Srivastava y Kar⁶⁰ se llevó a cabo con el objeto de optimizar las condiciones para la obtención de una actividad enzimática máxima en un corto periodo. Este estudio, por otro lado, se enfocó en evaluar el comportamiento de la actividad enzimática bajo condiciones más exigentes y controladas.

Los resultados de este estudio destacan la capacidad de *P. crustosum* (*P. crustosum*) como cepa altamente eficiente para la remoción de taninos y compuestos fenólicos, del mismo modo Thakur et al.⁶⁴ identificaron a la cepa de *P. crustosum* como el aislado con mayor capacidad de producción de tanasa entre otras 5 cepas evaluadas. Bajo condiciones optimizadas en fermentación en estado sólido y empleando galato de metilo como sustrato, se reportó una actividad enzimática máxima de 8,36 U/mL, en comparación, la cepa *P. crustosum* (también identificada como *Penicillium crustosum*) alcanzó una actividad máxima de 3,70 U/mL a las 288 h cultivada en medio líquido enriquecido con ácido tánico al 20 % y sin optimización de condiciones. Si bien estos resultados no son directamente comparables con los de Thakur et al.⁶⁴ debido a las diferencias en condiciones de cultivo (sólido) y tipo de sustrato, estos resultados destacan el potencial de *P. crustosum* para el tratamiento de efluentes contaminados con este tipo de compuestos.

3.6 Determinación de la eficiencia de la biodegradación

3.6.1 Determinación del porcentaje de degradación de taninos

Tabla 15. Evaluación y contraste del porcentaje de degradación de las concentraciones de quebracho por estirpe fúngica.

Cepa	Concentración	72 h	144 h	216 h	288 h	360 h
		$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
<i>A. niger/awamori</i>	7,5 %	13,75 $\pm$ 1,72	14,11 $\pm$ 2,16	18,37 $\pm$ 3,59	23,51 $\pm$ 3,33	36,12 $\pm$ 3,64
	10 %	2,34 $\pm$ 1,58	10,06 $\pm$ 1,82	16,06 $\pm$ 0,56	21,01 $\pm$ 2,33	33,07 $\pm$ 1,29
	15 %	13,12 $\pm$ 1,94	18,77 $\pm$ 1,32	22,95 $\pm$ 1,13	27,77 $\pm$ 0,93	31,47 $\pm$ 0,18
	20 %	6,40 $\pm$ 0,79	15,01 $\pm$ 0,20	21,05 $\pm$ 0,56	31,26 $\pm$ 2,21	23,94 $\pm$ 0,79
ANOVA F		36,939	15,804	7,413	11,104	20,729
SIGNIFICANCIA (P)		0,000	0,001	0,011	0,003	0,000
		<i>P</i> <0,01	<i>P</i> <0,01	<i>P</i> <0,01	<i>P</i> <0,01	<i>P</i> <0,01
<i>P. crustosum</i>	7,5 %	4,33 $\pm$ 1,73	11,02 $\pm$ 0,63	13,47 $\pm$ 1,97	20,05 $\pm$ 2,47	44,54 $\pm$ 1,05
	10 %	3,18 $\pm$ 1,65	6,37 $\pm$ 2,19	6,55 $\pm$ 1,31	29,75 $\pm$ 3,48	45,83 $\pm$ 2,29
	15 %	14,19 $\pm$ 0,95	15,06 $\pm$ 2,22	19,91 $\pm$ 1,11	38,87 $\pm$ 1,39	21,23 $\pm$ 0,70
	20 %	20,17 $\pm$ 1,90	25,75 $\pm$ 0,50	29,80 $\pm$ 1,33	43,16 $\pm$ 0,29	48,40 $\pm$ 0,98
ANOVA F		77,967	80,979	137,082	165,160	244,916
SIGNIFICANCIA (P)		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
		<i>P</i> <0,01	<i>P</i> <0,01	<i>P</i> <0,01	<i>P</i> <0,01	<i>P</i> <0,01

En la tabla 15 se muestran los promedios y las desviaciones estándar de las cepas fúngicas a diferentes concentraciones de quebracho (7,5, 10, 15 y 20 %) desde las 72 h hasta las 360 horas de evaluación. *A. niger/awamori* se muestran diferencias altamente significativas entre las concentraciones de quebracho en cuanto a la degradación de fenoles para todos los días de evaluación (*P*<0,01), a las 72 horas se observa un valor más alto de F (36,939) lo que significa que existe al menos una concentración difiere del resto de concentraciones, en la segunda evaluación (144 h) el valor F disminuye (15,804), lo que indica que las diferencias entre concentraciones se han atenuado, durante la tercera evaluación (216 h) el valor de F vuelve a disminuir (7,413), indicando que las diferencias que el comportamiento de ambas cepas es

similar en este tiempo. Para la cuarta evaluación, las diferencias entre concentraciones continúan siendo altamente significativas ($P=0,003$), indicando que el porcentaje de degradación va modulándose de acuerdo a la concentración de quebracho. Finalmente, durante la última evaluación el valor de F sube, y las diferencias entre concentraciones continúan siendo altamente significativas. Estos valores demuestran que la concentración de quebracho tiene un efecto significativo en la remoción para cada evaluación, siendo a las 72 horas donde la diferencia entre concentraciones es más marcada.

Para *P. crustosum* también se presentan diferencias altamente significativas entre las concentraciones de quebracho en cuanto a la degradación de taninos para todos los días de evaluación ($P<0,01$), durante la primera evaluación el valor de F comienza siendo alto (77,967) con diferencias altamente significativas en la degradación de taninos, sugiriendo que esta cepa también demuestra una alta sensibilidad a la concentración de quebracho desde etapas tempranas, en la segunda evaluación el valor de F aumenta (80,979) remarcando las diferencias, este cambio puede deberse a una mayor producción enzimática para este día de evaluación o a una mayor adaptación por parte de la cepa, Para la tercera evaluación el valor de F aumenta aún más remarcando las diferencias entre concentración. Durante la cuarta evaluación, el valor de F vuelve a aumentar volviendo a remarcar las diferencias. Finalmente, en la última evaluación el valor de F alcanza su punto máximo (244,916) y las diferencias se mantienen altamente significativas, demostrando nuevamente la influencia de la concentración de quebracho en el resultado final del tratamiento.

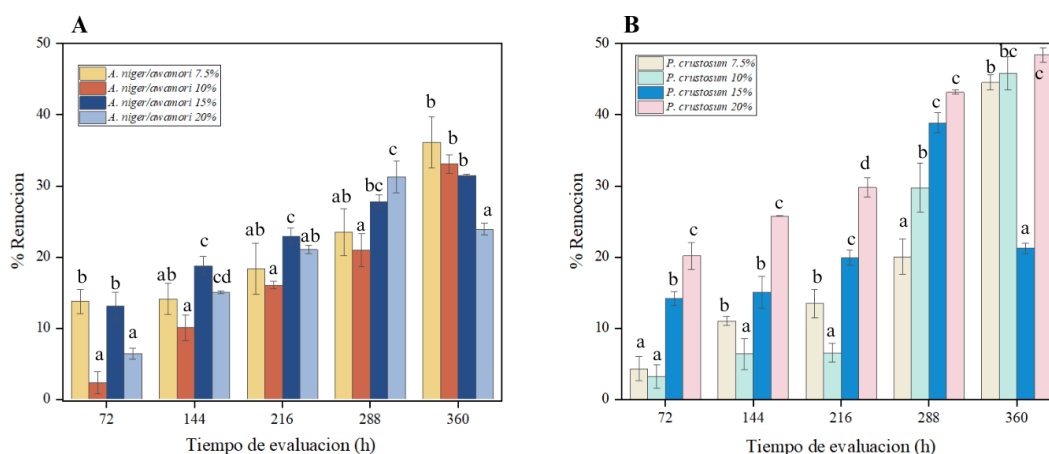


Figura 34. Contraste del porcentaje de remoción de *A. niger/awamori* (A) y *P. crustosum* (B) ante las diferentes concentraciones de quebracho

En la figura 34 se muestra: **A)** Porcentaje de remoción obtenido por *A. niger/awamori* desde las 72 h hasta las 360 h de evaluación. Durante la primera evaluación se observa el mayor valor de degradación al 15 % y 20 % de concentración de quebracho (b), para la segunda evaluación el hongo parece estabilizarse, y la degradación al 15 % sigue aumentando. Durante la tercera evaluación el hongo presenta valores más altos de degradación nuevamente al 15 % de concentración de quebracho (c). Para la cuarta evaluación, los valores cambian y parece haber una mayor degradación al 20 % de concentración (c), sin embargo, para la última evaluación la capacidad de remoción del hongo parece estabilizarse, la cepa vuela a presentar un mayor porcentaje de remoción al 7,5 y 10 % de concentración de quebracho (b), aunque no hay diferencias significativas entre ambas concentraciones, al 7,5 % el porcentaje de remoción es mayor. **B)** Porcentaje de remoción obtenido por la cepa *P. crustosum* desde las 72 h hasta las 360 h de evaluación. A diferencia de la cepa anterior, esta, ya presenta diferencias significativas entre concentraciones desde el inicio del experimento (72 h) se muestra el mejor rendimiento al 20 % de concentración de quebracho (c). Para la segunda evaluación se siguen presentando diferencias significativas para la mayoría las concentraciones, y al 20 % la mayor degradación (c). Las diferencias entre concentraciones se mantienen durante la tercera evaluación siendo al 20 % donde se presenta el mayor valor de degradación (c), para la siguiente evaluación (288 h) se vuelve a presentar el mejor rendimiento al 20 % de concentración (c). Por último, a las 360 horas la concentración del 20 % presenta nuevamente la mayor degradación (c).

Tabla 16. Evaluación y contraste del porcentaje de degradación de las cepas *A. niger/awamori* y *P. crustosum* por concentración de ácido tánico.

Concentración	Cepa	72 h	144 h	216 h	288 h	360 h
		$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
7,5 %	<i>A. niger/awamori</i>	13,75 $\pm$ 1,72	14,11 $\pm$ 2,16	18,37 $\pm$ 3,59	23,51 $\pm$ 3,33	36,12 $\pm$ 3,64
	<i>P. crustosum</i>	4,33 $\pm$ 1,73	11,02 $\pm$ 0,63	13,47 $\pm$ 1,97	20,05 $\pm$ 2,47	44,54 $\pm$ 1,05
t		6,700	2,386	2,079	1,445	3,858
SIGNIFICANCIA (P)		0,003	0,075	0,106	0,222	0,018
		<i>P</i> <0,05	<i>P</i> >0,05	<i>P</i> >0,05	<i>P</i> >0,05	<i>P</i> <0,05
10 %	<i>A. niger/awamori</i>	2,34 $\pm$ 1,58	10,06 $\pm$ 1,81	16,06 $\pm$ 1,82	21,01 $\pm$ 2,33	33,07 $\pm$ 1,29
	<i>P. crustosum</i>	3,18 $\pm$ 1,65	6,37 $\pm$ 2,19	6,55 $\pm$ 1,31	29,75 $\pm$ 3,47	45,83 $\pm$ 2,29
t		0,640	2,248	11,582	3,620	8,407
SIGNIFICANCIA (P)		0,557	0,088	0,000	0,022	0,001
		<i>P</i> >0,05	<i>P</i> >0,05	<i>P</i> <0,05	<i>P</i> <0,05	<i>P</i> <0,05
15 %	<i>A. niger/awamori</i>	13,12 $\pm$ 1,94	18,77 $\pm$ 1,32	22,95 $\pm$ 1,30	27,77 $\pm$ 0,94	31,47 $\pm$ 0,18
	<i>P. crustosum</i>	14,19 $\pm$ 0,95	15,06 $\pm$ 2,22	19,91 $\pm$ 1,11	38,87 $\pm$ 1,38	21,23 $\pm$ 0,70
t		0,860	2,493	3,335	11,511	24,539
SIGNIFICANCIA (P)		0,438	0,067	0,029	0,000	0,000
		<i>P</i> >0,05	<i>P</i> >0,05	<i>P</i> <0,05	<i>P</i> <0,05	<i>P</i> <0,05
20 %	<i>A. niger/awamori</i>	6,40 $\pm$ 0,79	15,01 $\pm$ 0,20	21,05 $\pm$ 0,56	31,26 $\pm$ 2,21	23,94 $\pm$ 0,79
	<i>P. crustosum</i>	20,17 $\pm$ 1,90	25,70 $\pm$ 0,05	29,80 $\pm$ 1,33	43,16 $\pm$ 0,29	48,40 $\pm$ 0,98
t		11,628	90,234	10,532	9,247	33,679
SIGNIFICANCIA (P)		0,000	0,000	0,000	0,001	0,000
		<i>P</i> >0,05	<i>P</i> >0,05	<i>P</i> >0,05	<i>P</i> >0,05	<i>P</i> >0,05

En la tabla 16 se muestran los promedios y desviaciones estándar del porcentaje de degradación de *A. niger/awamori* y *P. crustosum* por cada concentración de quebracho hasta las 360 horas de evaluación, también se muestran los valores de la prueba de *t* de Student. Al 7,5 % se observan comportamientos muy similares y sin diferencias significativas, se puede observar que *A. niger/awamori* presenta una degradación más alta (13,75 %) con diferencias altamente significativas (*P*=0,003) a las 72 h, sin embargo, al finalizar el experimento *P. crustosum* presenta una mayor degradación y se impone significativamente ante la otra cepa. Al 10 % de concentración de quebracho, *P. crustosum* vuelve a presentar valores más altos de degradación en las últimas horas de evaluación y con diferencias altamente significativas (*P*=0,001). Por otra parte, al 15 % se muestran resultados muy parejos y sin diferencias significativas durante las primeras horas, la cepa *A. niger/awamori* presenta los valores más altos de degradación a

las 216 h (22,95 %) y con diferencias significativas ($P=0,029$), sin embargo, a las 288 h, *P. crustosum* muestra los valores más altos de degradación con diferencias significativas a esta concentración. Al 20 % de concentración, *P. crustosum* se impone significativamente, presentando valores más altos de degradación en comparación con la otra cepa en todos los tiempos de evaluación, alcanzando el valor máximo de degradación (48,40 %) al finalizar el experimento y con diferencias altamente significativas, demostrando ser la mejor opción a concentraciones elevadas del modelo de contaminante.

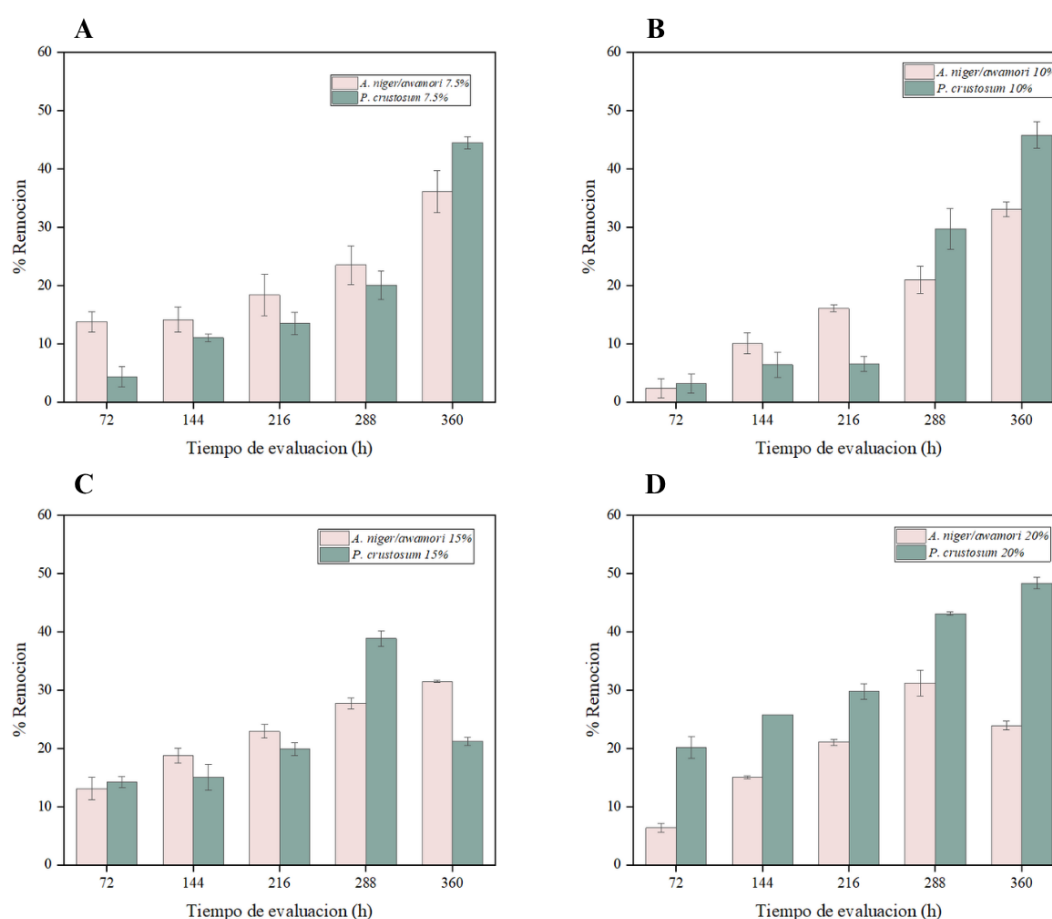


Figura 35. Comparación del porcentaje de degradación de *A. niger/awamori* (rosa) y *P. crustosum* (verde) para cada porcentaje de ácido tánico.

En la figura 35 se observa: **A)** Porcentaje de degradación por medio de *A. niger/awamori* (rosa) y *P. crustosum* (verde) al 7,5 % de quebracho, *P. crustosum* presenta la máxima degradación a las 360 horas de trabajo (44,54 %) al igual que *A. niger/awamori* (36,12 %) con diferencias significativas. **B)** Porcentaje de degradación al 10 % de quebracho, ambas cepas presentan nuevamente una máxima remoción a las 360 horas de evaluación, siendo *P. crustosum* quien

presenta los valores más altos (45,83 %). C) Porcentaje de degradación por al 15 % de quebracho, nuevamente se observa una mayor remoción al final de la evaluación por parte de *A. niger/awamori*, sin embargo, *P. crustosum* presenta el valor más alto de degradación (38,87 %) a esta concentración a las 288 h D) Porcentaje de degradación por medio de las cepas al 20 % de quebracho, para este tratamiento las cepas presentan sus picos de remoción a tiempos diferentes, las cepa *A. niger/awamori* tiene su punto más alto de degradación a las 288 horas (31,26), y la cepa *P. crustosum* al finalizar el experimento (48,40).

3.6.2 Eficiencia de la biodegradación

Tabla 17. Eficiencia de biodegradación del tanino de quebracho por la cepa *A. niger/awamori* al 20 % de concentración.

Cepa	Tiempo de evaluación (h)	Eficiencia de degradación de fenoles/día de evaluación			
		Act. Tanasa	DQO (mg/L)	Concentración residual de fenoles (mg/mL)	Remoción de fenoles (%)
		$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
<i>A. niger/awamori</i>	0	0,00 ± 0,00	90650,03 ± 0,31	89,27 ± 0,76	0,00 ± 0,00
	72	1,67 ± 0,07	-	83,59 ± 0,67	6,40 ± 0,79
	144	1,74 ± 0,03	-	75,90 ± 0,18	15,01 ± 0,20
	216	2,03 ± 0,28	-	70,50 ± 0,50	21,05 ± 0,56
	288	3,58 ± 0,06	-	61,39 ± 1,98	31,26 ± 2,21
	360	3,58 ± 0,03	89720,1 ± 0,46	67,92 ± 0,71	23,94 ± 0,79

En la tabla 17 se muestra la menor concentración residual de taninos (ácido gálico) (61,39 mg/mL), equivalente al mayor porcentaje de degradación con un 31,26 % promedio a las 288 horas de evaluación, asimismo, se muestra un promedio de 3,58 U enzimáticas para el mismo tiempo de evaluación. Además, se puede observar que el DQO tuvo un descenso desde 90650,03 mg/L hasta 89720,1 mg/L para las 360 horas de evaluación.

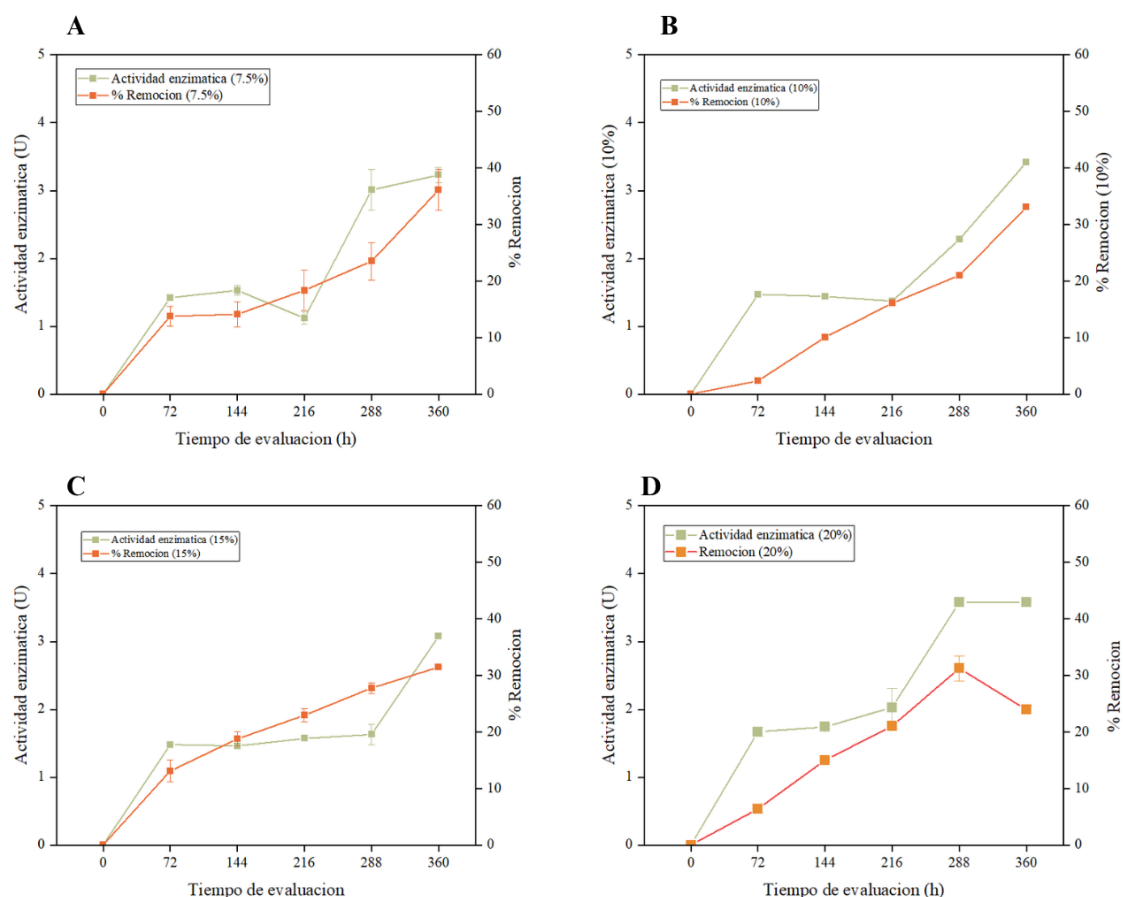


Figura 36. Porcentaje de remoción por parte de *A. niger/awamori* por U enzimáticas según las diferentes concentraciones de quebracho.

En la figura 36 se muestra la evolución conjunta de la actividad enzimática tanasa (U) y el porcentaje de degradación de taninos (%) a lo largo del tiempo para diferentes concentraciones de quebracho y ácido tánico, respectivamente por parte de *A. niger/awamori*. En general, se observa una correlación positiva entre ambos parámetros, sugiriendo que la actividad enzimática contribuye directamente al proceso de degradación. **A)** Al 7,5 % de concentración, tanto la actividad enzimática como el porcentaje de degradación aumentaron progresivamente con el tiempo, alcanzando sus valores máximos a las 360 h, asimismo, se evidencia una respuesta enzimática temprana desde la primera evaluación (72 h), que se mantiene relativamente constante hasta las 216 h, seguida de un incremento sostenido hacia el final del ensayo. **B)** Al 10 %, se observó un patrón similar al anterior: un aumento gradual en la actividad enzimática y la remoción, con una ligera meseta durante las primeras evaluaciones (72 a 216 h). A partir de las 216, ambos parámetros vuelven a incrementarse, alcanzando sus picos al final del periodo evaluado. La relación entre la producción enzimática y la degradación fue

consistente. C) Al 15 % de concentración, el comportamiento fue más lineal. Se registró un aumento constante tanto en la actividad enzimática como en la degradación a lo largo del tiempo, mostrando una correspondencia estrecha entre ambos parámetros en cada punto de la evaluación. Esta condición (15 %) presentó una de las respuesta más equilibradas y estables del sistema. D) al 20 % de concentración se puede observar una muy marcada inducción enzimática hasta las 288 h, donde se alcanzó el valor máximo, seguido de una disminución para el final del tratamiento, mientras que la degradación mostro una tendencia similar, pero con un descenso más marcado hacia las 360 h. Este comportamiento podría indicar una posible inhibición a concentraciones elevadas de sustrato o agotamiento del sistema enzimático. En conjunto, estos resultados indican que el proceso de degradación de taninos se encuentra estrechamente relacionado a la actividad enzimática tanasa.

Tabla 18. Eficiencia de biodegradación del tanino de quebracho por la cepa *P. crustosum* al 20 % de concentración.

Cepa	Tiempo de evaluación (h)	Eficiencia de degradación de fenoles/día de evaluación			
		Act. Tanasa (U)	DQO (mg/L)	Concentración residual de fenoles (mg/mL)	Remoción de fenoles (%)
		$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
<i>P. crustosum</i>	0	0,00 $\pm$ 0,00	90650,03 $\pm$ 0,31	89,27 $\pm$ 0,76	0,00 $\pm$ 0,00
	72	2,70 $\pm$ 0,24	-	62,69 $\pm$ 1,19	29,80 $\pm$ 1,33
	144	2,70 $\pm$ 0,03	-	50,76 $\pm$ 0,26	43,16 $\pm$ 0,29
	216	1,92 $\pm$ 0,13	-	71,29 $\pm$ 1,70	20,17 $\pm$ 1,90
	288	3,70 $\pm$ 0,47	-	66,31 $\pm$ 0,05	25,75 $\pm$ 0,05
	360	3,17 $\pm$ 0,03	89540,1 $\pm$ 0,44	46,08 $\pm$ 0,88	48,40 $\pm$ 0,98

En la tabla 18 se muestra la menor concentración residual de fenoles (ácido gálico) (46,08 mg/mL), equivalente al mayor porcentaje de degradación con un 48,40 % promedio a las 360 horas de evaluación, asimismo, se muestra un promedio de 3,17 U enzimáticas para el mismo tiempo de evaluación. Además, se puede observar que el DQO tuvo un descenso desde 90650,03 mg/L hasta 89540 mg/L para las 360 horas de evaluación.

La cepa *P. crustosum* con un 20 % de concentración de quebracho mostró una mayor degradación de fenoles (48,40 mg/mL) a las 360 horas de evaluación, mientras que la cepa *A. niger/awamori* presentó una degradación máxima del 31,26 %, del mismo modo, ambas cepas muestran un patrón de actividad tanasa distinto ya que *P. crustosum* comienza con valores

bajos y posteriormente alcanza su máximo a las 288 horas (3,70 U), esto podría indicar que esta cepa mantiene una mayor actividad enzimática a finales del experimento, en cambio, la cepa *A. niger/awamori* mostró un comportamiento progresivo, mostrando su actividad máxima también a las 288 horas (3,58 U). Finalmente, valores iniciales de DQO, ambos disminuyeron en proporciones similares indicando un consumo parecido de materia orgánica hasta el final del ensayo.

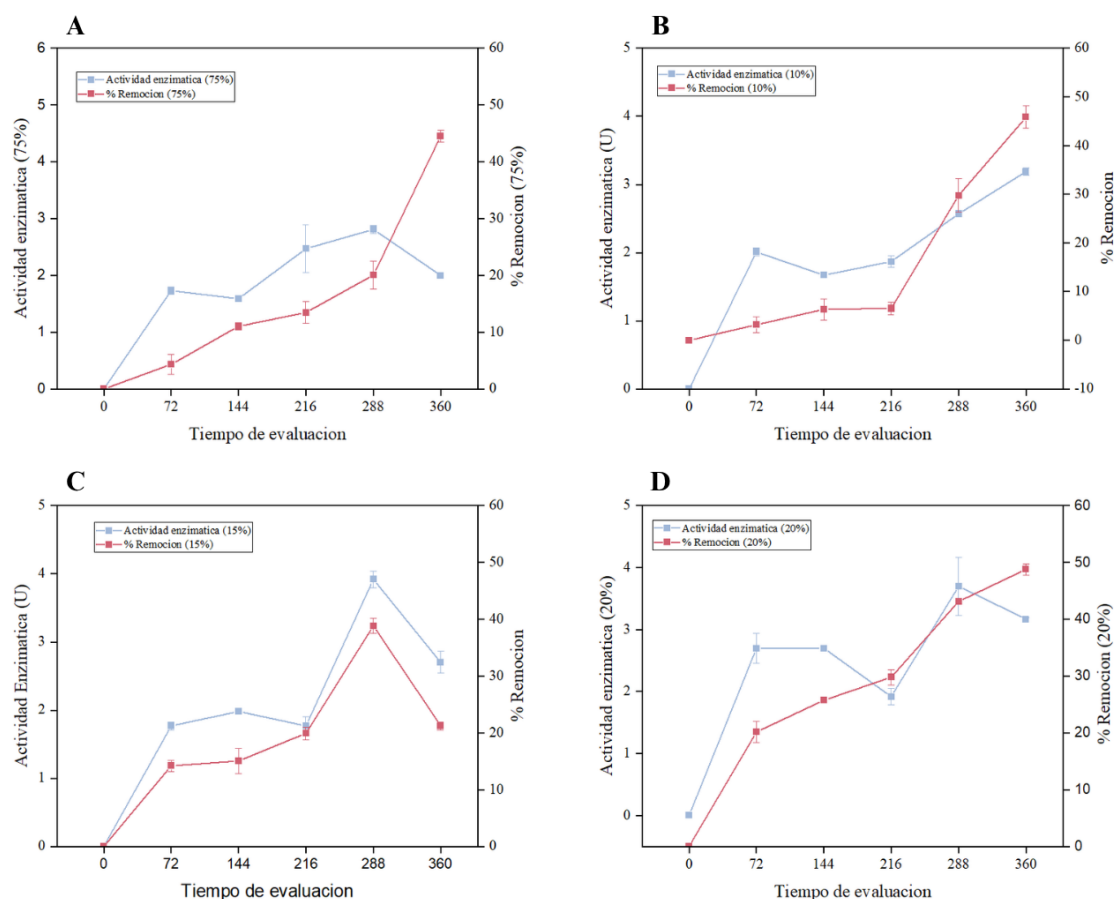


Figura 37. Porcentaje de remoción por parte de *P. crustosum* por U enzimáticas según las diferentes concentraciones de quebracho.

En la figura 37 se muestra la evolución conjunta de la actividad enzimática tanasa (U) y el porcentaje de remoción de taninos (%) a lo largo del tiempo para diferentes concentraciones de quebracho y ácido tánico, respectivamente por parte de *P. crustosum*. En general, se observa una correlación positiva entre ambos parámetros, sugiriendo que la actividad enzimática contribuye directamente al proceso de degradación. **A)** Al 7,5 % de concentración se puede observar un incremento progresivo en la actividad enzimática y en la degradación, presentando

un comportamiento relativamente escalonado. La actividad tanasa alcanzó su pico en las 216 h, seguido de una ligera disminución a las 288 h y una recuperación hacia el final del experimento. Por otro lado, la degradación presentó un comportamiento ascendente continuo, llegado a su valor más alto al final del ensayo, en concordancia con la reactivación enzimática final. **B)** Al 10 % la actividad enzimática presentó una meseta durante las primeras evaluaciones (72 y 216 h), seguida de un gran incremento a las 288 h y un nuevo pico a las 360 h. El porcentaje de degradación siguió una tendencia ascendente, aunque con una pendiente más suave en los primeros días y una aceleración notable hacia el final del experimento. **C)** Al 15 %, se evidencia una alta inducción enzimática a la mitad del experimento (216 y 288 h), alcanzando el valor máximo de actividad tanasa. Este incremento enzimático se vio acompañado de un incremento abrupto en la degradación, que luego disminuyó levemente a las 360 h, posiblemente debido al agotamiento de sustrato o de inhibición enzimática. **D)** Al 20 %, se observó un fuerte incremento en la actividad enzimática durante las primeras horas, alanzando un valor elevado que posteriormente se mantuvo relativamente constante hasta las 216 h, seguido por una segunda inducción hacia las 288 h. Para este tratamiento, la degradación mostró una tendencia ascendente bastante clara y también sostenida, logrando más del 40 % al final del tratamiento. En conjunto, los resultados indican que *P. crustosum* presenta una fuerte capacidad de adaptación y respuesta enzimática incluso a concentraciones levadas de taninos. La sincronía entre la actividad enzimática y la degradación fue más marcada en los tratamientos a altas concentraciones 15 y 20 %, sugiriendo que estas condiciones favorecen la inducción de esta enzima.

Se realizó una determinación del contenido de fenoles totales para cada evaluación con el objetivo de determinar el porcentaje de degradación. La cuantificación inicial de fenoles en el medio líquido suplementado al 7,5 % de quebracho presentó una concentración inicial de taninos de 38,59 mg/mL (Folin-Ciocalteu), para ello, *Aspergillus niger/awamori* logró una degradación máxima del $36,12 \pm 3,64$ % a las 288 horas de evaluación, con una actividad tanasa máxima $2,81 \pm 0,07$ U a las 288 h, del mismo modo, una disminución de DQO $89,550 \pm 0,30$ mg/L a $40,820 \pm 0,3$ mg/L indicando también una disminución significativa de la carga orgánica presente en el efluente sintético. Por otro lado, *Penicillium crustosum* presentó una mayor eficiencia al exponerse a una mayor concentración de quebracho (20 %) mostrando una concentración inicial de 89,27 mg/mL taninos totales, la cepa logró remover el $48,40 \pm 0,98$ % a las 360 h, con una actividad tanasa máxima de $3,70 \pm 0,47$ U, sin embargo, solo consiguió una disminución de $89,540,1 \pm 0,44$ mg/L de DQO, sugiriendo una menor eficiencia en la reducción de materia orgánica pese a la mayor reducción de taninos y compuestos fenólicos.

Los valores obtenidos en este trabajo sobre el contenido de taninos y compuestos fenólicos iniciales superan considerablemente a los reportados en la literatura, Prigione et al.²⁵ reportaron 19,98 mg/L de taninos totales (Folin-Ciocalteu) para un efluente real de curtiduría. Esta diferencia en el contenido de taninos del medio sintético utilizado en este estudio resalta la eficiencia de *Aspergillus niger/awamori* y *Penicillium crustosum* para remover taninos en condiciones de alto estrés, no obstante, la reducción en la eficiencia para la remoción de DQO sugiere que la remoción de fenoles puede no estar asociada a la disminución de la carga orgánica total del sistema. Por otro lado, Spennati et al.⁶⁸ evaluaron la degradación del tanino de quebracho a 1 g/L en un biorreactor con biofilm fúngico de *Aspergillus tubingensis* logrando una sDQO de hasta el 53 %, no se cuantificaron taninos o compuestos fenólicos totales, si bien este enfoque les ha permitido evaluar el rendimiento general de *A. tubingensis* en el sistema, no permite diferenciar la fracción fenólica del resto de la carga orgánica a diferencia del presente estudio que brinda un método colorimétrico (Folin-Ciocalteu) específico para cuantificación de taninos y compuestos fenólicos permitiendo un análisis más detallado del comportamiento de *A. niger/awamori* y *P. crustosum* frente a este tipo particular de contaminante.

Chaudhary et al.⁸ evaluaron la capacidad de un consorcio fúngico compuesto por *A. niger*, *A. flavus* y *A. niveus* para remover ácido tánico de medios sintéticos y efluentes reales. Bajo condiciones optimizadas (30 °C, pH 5,5, 96 h), lograron obtener valores de remoción de hasta un 78 %, dejando un 22 % de ácido tánico residual. Si bien el modelo experimental presentado por estos autores fue exitoso para taninos hidrolizables, el presente estudio aborda un desafío mayor al emplear taninos condensados derivados del extracto de quebracho (mayor recalcitrancia). Además, en lugar de emplear consorcios fúngicos, se trabajó con cepas individuales previamente seleccionadas por su tolerancia y actividad tanasa. *A. niger/awamori* y *P. crustosum* mostraron valores de remoción de taninos que alcanzaron un $36,12 \pm 3,64$ % al 7,5 % de concentración de quebracho (*A. niger*) y un $48,40 \pm 0,98$ % al 20 % de quebracho (*P. crustosum*), resultados comparables con el estudio citado. Esto sugiere que incluso en condiciones de mayor exigencia, las cepas fúngicas empleadas de forma individual pueden desempeñar papeles importantes en biotransformación de taninos presentes en efluentes del curtido vegetal. Asimismo, el uso del quebracho como modelo contaminante aporta una visión más realista de tratamiento de efluentes curtientes.

Las especies bacterianas también han demostrado ser potenciales agentes remediadores de estos efluentes Chaudhary et al.⁶⁵ reportaron la eficiencia de un co-cultivo bacteriano (*Bacillus subtilis* y *Bacillus safensis*) para la remoción simultánea de metales pesados y taninos presentes

en efluentes de curtiembre. Alcanzaron un 95 % de remoción de Cr (VI) y una reducción de ácido tánico del 77,5 %, aproximadamente (de 2,54 a 0,52 mg/mL), bajo condiciones optimizadas de pH, temperatura y tiempo, demostrando la versatilidad de los sistemas bacterianos para el tratamiento de contaminantes. Sin embargo, es importante resaltar la complejidad del modelo del contaminante (ácido tánico-quebracho).

Alternativamente se han explorado tratamientos de carácter fisicoquímico como la electrocoagulación para la remoción de carga contaminante presente en el efluentes de curtiembre. Asimismo, se han empleado matrices sintéticas distintas a las basadas en taninos, con el propósito de modelar otros perfiles de contaminación, Meena et al.⁶⁹ prepararon agua sintética incluyendo 4-clorofenol como fuente de materia orgánica y cloruros, además, incluyeron dicromato de potasio como fuente de Cr (VI) con la final de evaluar la capacidad de remoción frente a contaminantes clorados y metálicos. Si bien dicho modelo representa un escenario de mayor toxicidad en comparación con el empleado en este trabajo, se debe considerar que los mecanismo de remoción difieren de acuerdo a la naturaleza del contaminante. En este estudio se obtuvo hasta un 84,23 % en la eliminación de DQO (pH 4,98, 0,953 A, 115 min) con un consumo energético de 16,21 kWh/m³ para la remoción de DQO. Estos resultados marcan la elevada eficiencia del método, aunque, con un requerimiento energético notable. La comparación de métodos como este y los utilizados en el presente trabajo resaltan la complementariedad de las tecnologías de tratamiento, donde los métodos biológicos ofrecen alternativas sostenibles frente a procesos fisicoquímicos de alta eficiencia, pero como una elevada huella energética.

3.7 Determinación de cambios químicos y morfológicos (FTIR y SEM)

El espectro IR obtenido a partir del espectrómetro FTIR se encuentra dentro de la región infrarroja media de 2,5 a 15 μm , entre 4000 y 666 cm^{-1} , sin embargo, las energías de transición que corresponden a los cambios en el estado de energía vibracional relacionados a los diferentes grupos funcionales ese encuentran dentro de la región IR media, es decir de 4000-400 cm^{-1} , de este modo, las bandas que aparecen a esta región corresponderían a los grupos funcionales específicos dentro de la molécula. Existen 4 regiones de tipos de enlace que pueden determinarse mediante los espectros de FTIR. Enlaces simples como OH-, CH- y NH- se encuentran típicamente en un rango de 2500-4000 cm^{-1} , por otro lado, los enlaces dobles y triples se encuentran en la región media (2000 a 2500 cm^{-1}). La vibración de una molécula en su conjunto genera un complejo patrón de vibración en la región baja (650-1500 cm^{-1})

característico de la molécula en particular conocida como región de huella digital y se utiliza para su identificación⁷⁰.

Con el objetivo de evaluar los posibles cambios estructurales en la biomasa fúngica posiblemente generados tras la exposición a los taninos del quebracho se realizó un análisis por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) a las cepas seleccionadas.

- **Cepa *A. niger/awamori***

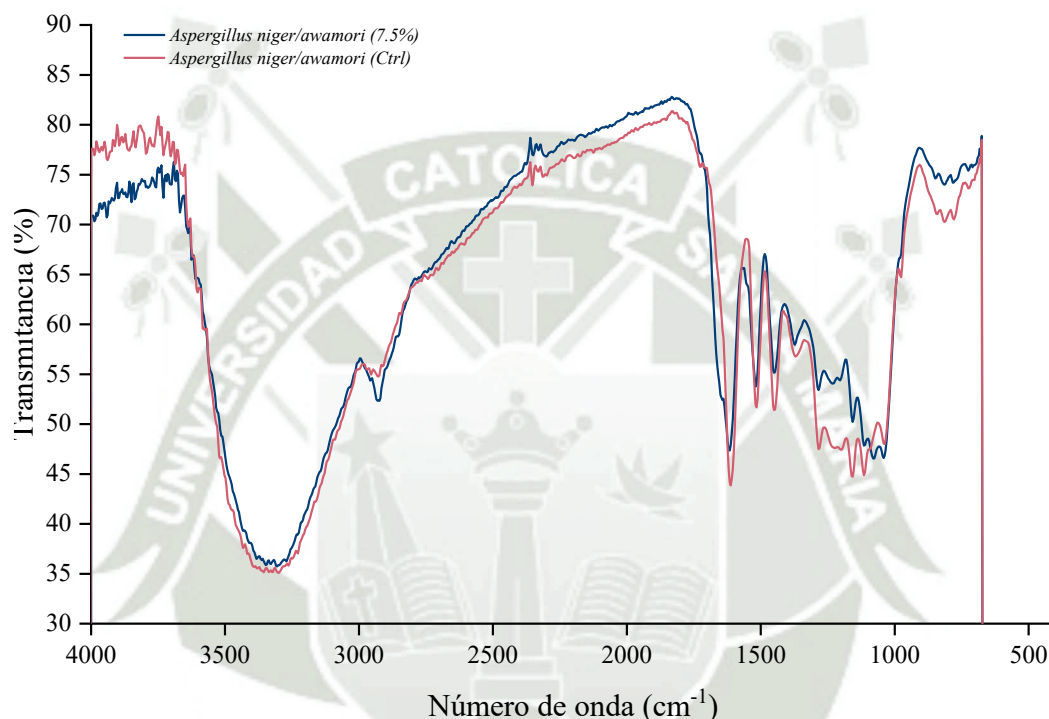


Figura 38. Espectros FTIR de la cepa *A. niger/awamori*. Sin tratamiento (naranja), tratada (azul)

En la figura 38 se muestran los espectros FTIR de la cepa *A. niger/awamori*, se observa un pico a 3305 cm^{-1} correspondiente a enlaces intermoleculares en OH-, además, una pequeña banda a 2935 cm^{-1} relacionada a estiramientos CH alifáticos (ácidos grasos), a 2358 cm^{-1} un pico de estiramiento C=O, posteriormente, a 1612 cm^{-1} se aprecia una banda, la cual es frecuentemente asignada en la literatura como Amida I y II (CN) y al estiramiento C=C aromático^{71,72}, a 1450 cm^{-1} se aprecia un pico relacionado a enlaces CH- alifáticos, a 1284 cm^{-1} se observa la presencia del CN- en la amida III, la banda a 1110 cm^{-1} mostró el estiramiento de CO- para un éter (o éster), finalmente a 721 cm^{-1} se exhibe un anillo aromático de benceno mono sustituido⁷¹.

El espectro FTIR de la cepa *A. niger/awamori* (*Aspergillus niger/awamori*) sin tratamiento (control) mostró bandas características de esta especie que concuerdan con lo reportado por Saif et al.⁷² al caracterizar diferentes especies del género *Aspergillus*. Se identificó la formación de una banda intensa de estiramiento de OH- a $3600-3350\text{ cm}^{-1}$, común en todos los hongos, del mismo modo, reportaron bandas a 3286 y 3257 cm^{-1} atribuidas al contenido proteico (estiramiento NH, amida). Por otro lado, relacionaron la presencia de ácidos grasos a las longitudes de onda entre 2950 y 2800 cm^{-1} (estiramiento CH alifático) para la especie de *A. awamori* (especie coincidente con este estudio), asimismo, reportaron estiramientos C=O a 2350 cm^{-1} , también reportaron picos de NH alrededor de 1620 y 1551 cm^{-1} correspondientes a amida I y II, por otra parte se observaron bandas de absorción de polisacáridos (uniones OH-) en un rango de 1382 y 1334 cm^{-1} para todas las especies de *Aspergillus* evaluadas.

Arshadi et al.⁷¹ también realizaron un análisis de FTIR a muestras de *Aspergillus niger* bajo diferentes condiciones y a la cepa en estado inicial, la cual presentó un pico a 3457 cm^{-1} correspondiente a enlaces OH- (característico en hongos), a 1607 cm^{-1} un estiramiento aromático C=C, luego, un pico a 1451 cm^{-1} correspondiente a enlaces CH del butadieno, la banda a 1244 cm^{-1} se relacionó a la presencia de CN para amida III. La banda a 1101 cm^{-1} se asoció al estiramiento C-O para éster (o éter), posteriormente, a 727 cm^{-1} se le atribuyó como anillo de benceno mono sustituido, además, se presentaron picos entre 2921 y 2927 cm^{-1} (CH), finalmente, reportaron bandas alrededor de 1714 y 1739 cm^{-1} asignadas al estiramiento C=O en grupos éster, aldehído, cetona o ácidos carboxílicos. Estos resultados coinciden con lo reportado por Gáplovská et al.⁷³, los espectros FTIR para *Aspergillus niger* en su estudio mostraron bandas a: 3262 a 3271 cm^{-1} correspondientes a estiramientos OH y NH de polisacáridos, amina y amida, asimismo, bandas entre 2906 y 2926 cm^{-1} y un hombro secundario (shoulder) a $2870-2884\text{ cm}^{-1}$ asignados a grupos CH alifáticos de los ácidos grasos, también reportaron absorciones en un rango de 1641 a 1643 cm^{-1} correspondientes a estiramientos C=O (amida I), a $1545-1547\text{ cm}^{-1}$ se observaron deformaciones NH (amida II), posteriormente identificaron bandas de 1413 a 1415 cm^{-1} y a 1374 cm^{-1} asignadas a grupos COO-. Finalmente, destacaron que el total de sus muestras presentaron picos entre 1200 y 950 cm^{-1} característico de vibraciones C-O y C-C (polisacáridos).

Diversos estudios han señalado que los principales grupos involucrados en procesos de liosorción incluyen hidroxilos (-OH), carbonilos (C=O), carboxilos (-COOH), sulfonatos, amidas, imidazoles, fosfonatos y fosfodiésteres⁷⁴. Si bien estas observaciones han sido realizadas principalmente bajo contextos de remoción de metales pesados (Cr VI), muchos de

estos grupos pueden participar también en la interacción de compuestos orgánicos complejos como los taninos. Las paredes celulares fúngicas contienen proteínas, polisacáridos, lípidos y particularmente un número de grupos funcionales como grupos hidroxilo, carbonilo y carboxilo presentes en la superficie de la biomasa fúngica que pueden facilitar la degradación o adsorción de taninos⁸.

- **Cepa *P. crustosum***

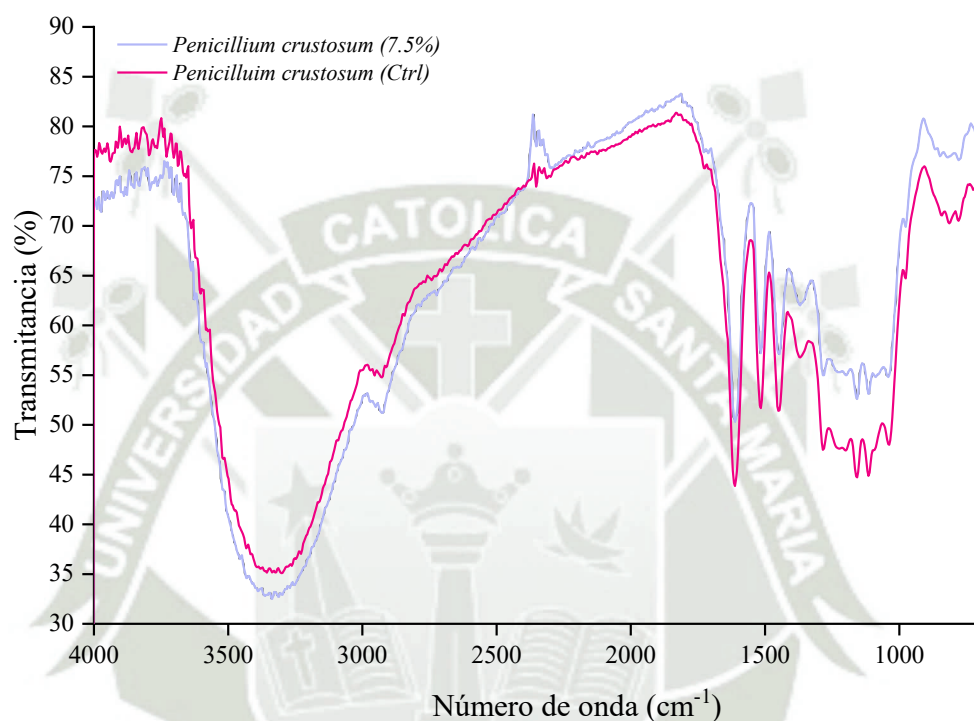


Figura 39. Espectros FTIR de la cepa *P. crustosum*. Sin tratamiento (rojo), tratada (azul)

La figura 39 muestra los espectro FTIR de la cepa *P. crustosum* antes (rojo) y después del tratamiento (azul). La muestra control muestra un perfil característico de biomasa fúngica. Se muestra una banda ancha a $\sim 3340\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a grupos OH, comúnmente reportados como polisacáridos estructurales. Por otro lado, se observan estiramientos alifáticos CH en $\sim 2930\text{ cm}^{-1}$ asociados a la presencia de lípidos de membrana o cadenas alifáticas, además, estiramientos a $\sim 1610\text{ cm}^{-1}$ correspondientes a estiramiento C=O (Amida I o amida II) o C=C aromático posiblemente relacionados con proteínas estructurales correspondientes a la pared celular. Por otra parte, se observan picos a $\sim 1540\text{ cm}^{-1}$ (Amida II, NH o CN) confirmando de este modo el contenido proteico ya sea de la pared celular o la presencia de enzimas. Finalmente, los picos a 1200 cm^{-1} se asocian a estiramientos CN o COC relacionados a polisacáridos estructurales.

Este perfil coincide ampliamente con lo reportado para cepas de *Penicillium* sp. por Sánchez et al.⁷⁵, en ambos casos se identificaron señales a $\sim 3300\text{ cm}^{-1}$ atribuibles a grupos hidroxilo OH y amina NH generalmente asociados a polisacáridos o proteínas estructurales de la pared celular, así como una banda en $\sim 2925\text{ cm}^{-1}$ correspondientes a estiramientos CH de cadenas alifáticas asociadas a lípidos presentes en las estructuras membranales. Asimismo, en su estudio, se detectaron vibraciones relacionadas con proteínas, específicamente en regiones a $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$ (amida I, C=O) y $\sim 1540\text{ cm}^{-1}$ (Amida II y NH), indicativas del contenido proteico de la biomasa. Además, las bandas correspondientes al intervalo de $\sim 1200\text{ cm}^{-1}$ también coincidieron con lo descrito por los autores, atribuyéndolo a polisacáridos estructurales y posibles enlaces éter COC o CN.

Estos modelos espectrales coinciden también con lo mencionado por Kayar et al.⁷⁶, donde obtuvieron quitosano a partir de cepas de *P. crustosum* TZ18, destacaron bandas alrededor 3300 cm^{-1} que relacionaron con grupos OH o NH, a 2920 cm^{-1} (CH alifático), 1650 cm^{-1} atribuidos a grupos amida I y II, además de picos a $\sim 1150\text{ cm}^{-1}$ asociados con grupos COC correspondientes a polisacáridos y estructuras proteicas. Asimismo, el estudio realizado por Kirtil et al.⁷⁷ se aplicó FTIR-ATR para la caracterización de distintas especies de *Penicillium* asociadas a productos lácteos (queso), incluyendo la cepa de *P. crustosum*, se reportaron bandas en las regiones entre 2800 y 3000 cm^{-1} asociadas a ácidos grasos pertenecientes a la membrana, picos entre 1500 - 1700 cm^{-1} se relacionaron a grupos amida I y II, y entre 1200 y 600 cm^{-1} asociados a polisacáridos y posibles metabolitos secundarios. Del mismo modo, los espectros obtenidos muestran similitudes notables con los perfiles espectrales descritos por Saif et al.⁷⁸ en su estudio para la identificación de especies de *Penicillium* mediante FTIR-ATR. En ambos casos, se observa una banda ancha en el intervalo de ~ 3287 y $\sim 3263\text{ cm}^{-1}$ atribuida al estiramiento NH del grupo amida, asociado a las proteínas, así también, reportaron estiramientos CH de grupos metilo y metileno, indicadores de la presencia de ácidos grasos presentes en la estructura de la membrana, por otro lado, en la región alrededor de $\sim 1643\text{ cm}^{-1}$ y $\sim 1546\text{ cm}^{-1}$ se mostraron picos relacionados a vibraciones amida I y II confirmando la abundancia de proteínas en la biomasa fúngica, además, las bandas reportadas en $\sim 1390\text{ cm}^{-1}$ se relacionaron con deformaciones OH de polisacáridos y Amida III a $\sim 1241\text{ cm}^{-1}$, finalmente, reportaron picos a $\sim 1012\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a polisacáridos estructurales. Estas coincidencias espectrales refuerzan la validez de las asignaciones funcionales mencionadas y sitúa a la cepa *P. crustosum* (*Penicillium crustosum*) dentro del perfil espectroscópico típico

del género *Penicillium*, demostrado en las especies *P. implicatum*, *P. purpurogenum*, *P. citrinum*, entre otras

3.8 SEM

- Cepa *A. niger/awamori*

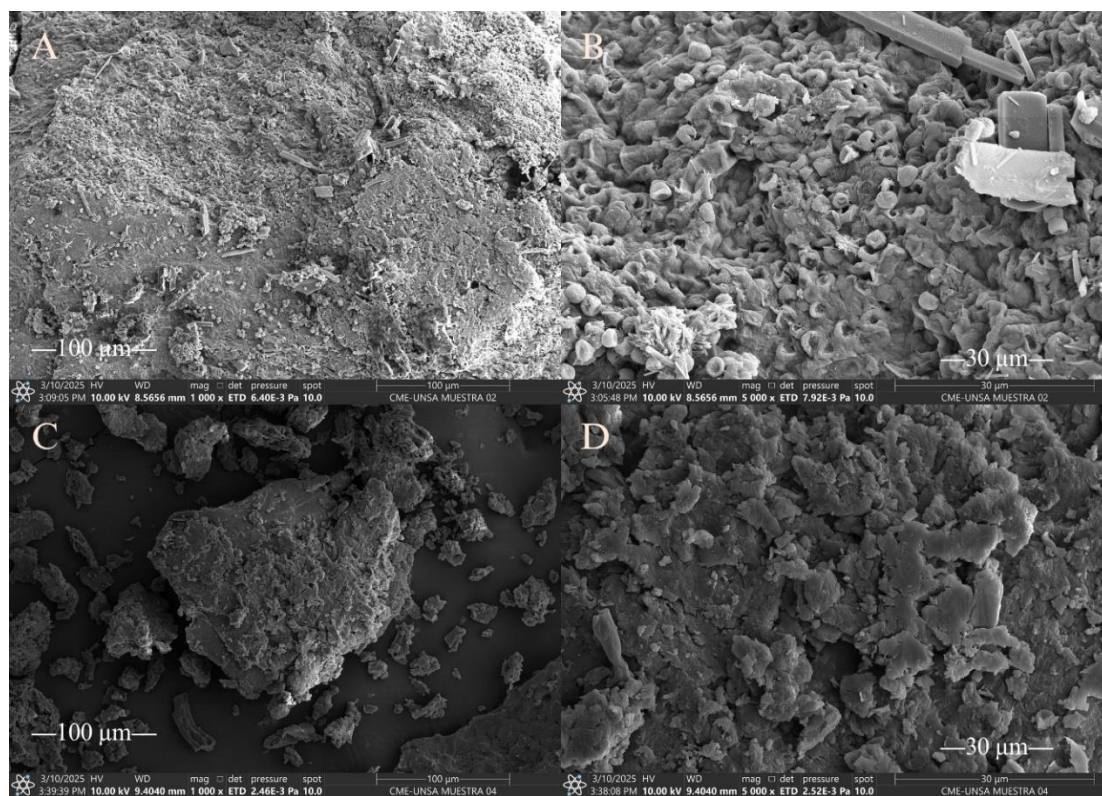


Figura 40. Micrografías SEM cepa *A. niger/awamori*. Sin tratamiento (a y b), 10Kv, x1000, 100 μm (a), 10 kV, x5000, 30 μm (b). Post-tratamiento (c y d), 10Kv, x1000, 100 μm (c) 10 kV, x5000, 30 μm (d)

Las micrografías obtenidas para la cepa *A. niger/awamori* en condición de control (sin tratamiento) mostraron una morfología micelial bien definida, presentando hifas continuas y una superficie homogénea, sin indicios de daño o acumulación de componentes externos. Chaudhary et al.⁷⁴ mostraron resultados semejantes para cepas intactas de *A. niger*, encontrando hifas en forma de cinta y con estructura ramificada, del mismo modo Ramachandran et al.⁷⁹ reportaron estructuras uniformes en las esporas. En este estudio se observa una estructura celular estable propia de la condición control (Figura 40, (A y B)), Srivastava y Thakur⁸⁰ también mostraron hifas regulares cilíndricas y separadas. Por otro lado, tras el tratamiento con el tanino de quebracho (Figura 40 (B y C)) se observaron alteraciones en la textura superficial y presencia de cúmulos adheridos (posiblemente taninos precipitados). Estos resultados

vuelven a mostrar semejanza con los obtenidos por Chaudhary et al.⁷⁴ para el consorcio fúngico de *A. niger* en presencia de Cr para el tratamiento de efluentes curtientes, reportando desorden un fragmentación absoluta, además de acumulaciones del metal junto a floculación. Srivastava y Thakur⁸⁰ también mostraron irregularidades en la estructura celular. Aunque el tratamiento con taninos genera cambios superficiales en la cepa fúngica, la integridad estructural se mantiene en gran medida. Las zonas donde se aprecia material densamente adherido podría indicar la existencia de una gran interacción con los taninos, representando un posible proceso de adsorción o degradación sin comprometer necesariamente la estructura del micelio.^{8,74}

- *Cepa P. crustosum*

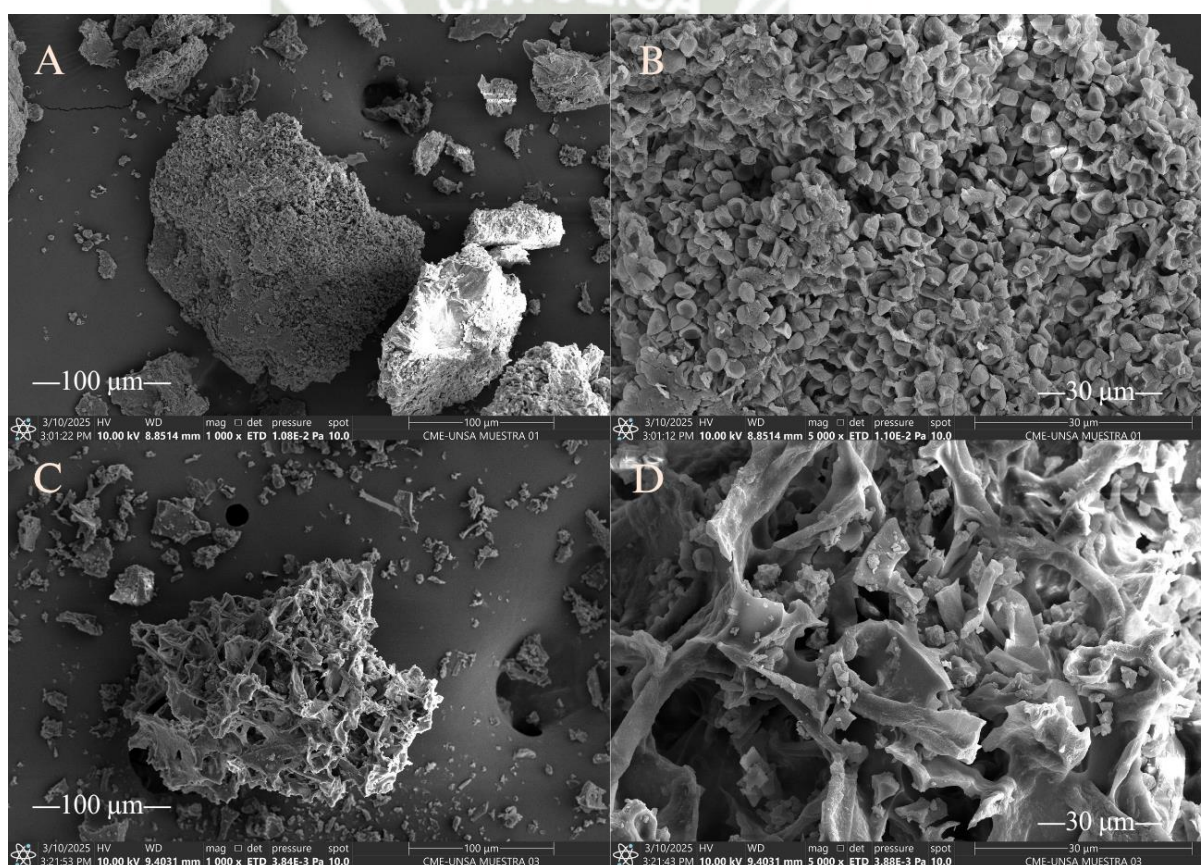


Figura 41. Micrografías SEM cepa *P. crustosum*. Sin tratamiento (a y b), 10Kv, x1000, 100 μ m (a), 10 kV, x5000, 30 μ m (b). Post-tratamiento (c y d), 10Kv, x1000, 100 μ m (c) 10 kV, x5000, 30 μ m (d)

La evaluación morfológica mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) permitió la visualización de las posibles alteraciones estructurales inducidas por la exposición a los taninos del quebracho. Las micrografías correspondientes a la condición control (Figura 41 (A y B)) indicaron una estructura micelial bien definida, con hifas alargadas, ramificadas y con los

bordes bien definidos, asimismo, no se observan cúmulos o depósitos de materia externa, estado consistente con una cepa saludable. Resultados similares se han reportado por Chen et al.⁸¹ quienes mostraron cepas regulares y constantes antes del tratamiento con metales por medio de cepas de *P. simplicissimum*. En contraste, las imágenes obtenidas para la cepa posterior al tratamiento con quebracho (Figura 41 (B y C)) revelaron modificaciones considerables en la estructura micelial, evidenciando una superficie notoriamente más rugosa e irregular y zonas donde se ha perdido la continuidad en la estructura del micelio, resultados nuevamente comparables con los de Chen et al.⁸¹ y mostrando una bioacumulación de metales en forma de hifas hinchadas y densamente empaquetadas. Bayrak et al.⁸² también reportaron acumulación de metales en cepas de *P. chrysogenum*. Del mismo modo, en este estudio se pudo apreciar zonas de acumulación de residuos, sugiriendo una posible adsorción de los taninos o subproductos de su metabolismo, lo cual resulta congruente con los ensayos de remoción de fenoles.

Estas observaciones demuestran que la cepa *P. crustosum* no solo es capaz de tolerar altas concentraciones de taninos, sino que también puede interactuar activamente con ellos implicando mecanismos de adsorción o degradación. El deterioro parcial de la estructura micelial puede interpretarse como una respuesta adaptativa de parte del hongo o también como un indicio de estrés fúngico.

CONCLUSIONES

PRIMERA

El presente estudio demostró la capacidad de cepas de hongos filamentosos aislados de efluentes de curtiembre del Parque Industrial de Río Seco (Arequipa) para remover taninos de quebracho mediante procesos de biotransformación. Se obtuvieron un total de 40 cepas fúngicas, las cuales fueron aisladas y purificadas en medio Agar Sabouraud a partir de efluentes de curtiembre provenientes del PIRS. Las cepas se sometieron a un ensayo previo de pre tolerancia, para lo cual se sembraron en placas con medio mínimo suplementado con ácido tánico (10 g/L) con el fin de seleccionar 2 cepas con mayor tolerancia a taninos.

SEGUNDA

Se seleccionaron dos cepas con alta tolerancia a taninos: *A. niger/awamori* y *P. crustosum* y se evaluó su capacidad para tolerar taninos de quebracho en medio sólido mínimo suplementado con diluciones de quebracho en concentraciones de 7,5, 10, 15 y 20 %.

TERCERA

El análisis de comparación con la secuencia ITS1 con la base de datos de GenBank por medio del software BLAST mostro un 100 % de similitud con la especie de *Aspergillus niger* y *Penicillium crustosum* para las cepas *A. niger/awamori* y E03-17, respectivamente.

CUARTA

Las cepas expresaron actividad tanasa en medio líquido suplementado con ácido tánico, se empleó la capacidad de producir esta enzima como indicador indirecto de actividad enzimática. Los resultados evidenciaron una respuesta rápida bajo concentraciones moderadas (7,5 y 10 %) para *A. niger/awamori* con una actividad enzimática máxima de $2,81 \pm 0,07$ U a las 288 h de evaluación y un comportamiento más sostenido y por tiempos más prolongados para *P. crustosum* con una actividad máxima de $3,70 \pm 0,47$ U a las 288 h de evaluación y a concentraciones elevadas (20 %).

QUINTA

Ambas cepas fueron capaces de remover eficientemente taninos en medio líquido con quebracho (5, 10, 15 y 20%), alcanzando un porcentaje máximo de remoción del $48,40 \pm 0,98$ % para *P. crustosum* al 20% de concentración de quebracho y del $36,12 \pm 3,64$ % para *A. niger/awamori* al 7,5 %. *P. crustosum* mostró un comportamiento sostenido en la remoción, con mejor desempeño en concentraciones más elevadas (20 %) y en tiempos prolongados, mientras que *A. niger/awamori* se desarrolló una respuesta rápida y eficiente en concentraciones bajas (7,5 %).

RECOMENDACIONES

- Evaluar la capacidad de remoción de taninos en efluentes industriales reales, conteniendo mezclas complejas de contaminantes, para así determinar la eficiencia de las cepas en matrices más completas.
- Para obtención de consorcios fúngicos con mayor variedad y/o tolerancia se recomienda el aislamiento de otras fuentes, como la exposición de placas de medio nutritivo al ambiente de una curtiembre o directamente de extracto de los taninos utilizados (quebracho, tara, castaño, etc.)
- Optimizar las condiciones de cultivo (pH, temperatura, agitación, aireación, tiempo, etc.) con el objetivo de maximizar la eficiencia de remoción y la expresión de la actividad tanasa.
- Considerar la purificación e inmovilización enzimática como estrategia para mejorar la estabilidad del proceso.
- Separar la biomasa fúngica después del tratamiento para evaluar otros posibles mecanismos de biodegradación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. M JHI. Taninos o polifenoles vegetales. *Scientia Et Technica*. 2007;XIII(33):13-8.
2. Chaurasia S, Singh R, Dubey DR. Leather Processing Technologies: A Review. 2023;11(9).
3. Esparza E, Gamboa N. Contaminación debida a la industria curtiembre. *Revista de Química*. 5 de marzo de 2001;15(1):41-63.
4. Pepi M, Lampariello L, Altieri R, Espósito A, Perra G, Renzi M, et al. Tannic acid degradation by bacterial strains *Serratia* spp. and *Pantoea* sp. isolated from olive mill waste mixtures. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 1 de enero de 2010;64(1):73-80.
5. Hansen É, Monteiro P, Gutterres M. Environmental assessment of water, chemicals and effluents in leather post-tanning process: A review. *Environmental Impact Assessment Review*. 1 de julio de 2021;89:106597.
6. Palacio M, Cano I, Múnera L, Pino N, Peñuela G. Evaluación de la capacidad degradadora de taninos por microorganismos aislados a partir de un efluente de curtiembre del municipio de Copacabana, Antioquia | Actualidades Biológicas [Internet]. *Revista Actualidades Biológicas*. 2018 [citado 22 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://revistas.udea.edu.co/index.php/actbio/article/view/334823>
7. Martinez S, Romero J. Revisión Del Estado Actual De La Industria De Las Curtiembres En Sus Procesos Y Productos: Un Análisis De Su Competitividad. *Revista Facultad de Ciencias Económicas: Investigación y Reflexión*. enero de 2018;XXVI(1):113-24.
8. Chaudhary P, Beniwal V, Sharma P, Goyal S, Kumar R, Alkhanjaf A, et al. Unloading of hazardous Cr and Tannic Acid from real and synthetic waste water by novel fungal consortia. *Environmental Technology & Innovation*. 1 de mayo de 2022;26:102230.
9. Decreto Supremo N.º 010-2023-MINAM [Internet]. [citado 22 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/minam/normas-legales/4561259-010-2023-minam>
10. Quispe M. Arequipa: curtiembres piden planta de tratamiento para reducir contaminación [Internet]. *El Búho*. 2023 [citado 22 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://elbuhu.pe/2023/05/arequipa-curtiembres-piden-planta-de-tratamiento-para-reducir-contaminacion/>
11. Rodriguez L, Valdivia B, Contreras J, Rodriguez R. (PDF) QUIMICA Y BIOTECNOLOGIA DE LA TANASA [Internet]. ResearchGate. 2024 [citado 22 de mayo de 2024]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/266372327_QUIMICA_Y_BIOTECNOLOGIA_DE_LA_TANASA

12. Cerda RB, Vega MLR, Esquivel JCC, Herrera RR, Aguilar CN. Efecto de la fuente de carbono sobre la producción de tanasa en dos cepas de *Aspergillus niger*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 2003;2(2):95-100.
13. Dowlath M, Karuppannan S, Rajan P, Khalith S, Rajadesingu S, Arunachalam K. Application of advanced technologies in managing wastes produced by leather industries—An approach toward zero waste technology. En: *Concepts of Advanced Zero Waste Tools* [Internet]. Elsevier; 2021 [citado 22 de mayo de 2024]. p. 143-79. Disponible en: <https://ezproxy.ucsm.edu.pe:2056/science/article/pii/B9780128221839000076>
14. The Benefits of Leather | Leather Resources | Get The Facts [Internet]. *Leather Naturally*. [citado 25 de julio de 2025]. Disponible en: <https://www.leathernaturally.org/about-leather/benefits-of-leather/>
15. Proaño PIA, Constante EDJ. Obtención de pieles curtidas con taninos. 1 [Internet]. 28 de diciembre de 2022 [citado 24 de mayo de 2024];(176). Disponible en: <https://dspace.palermo.edu/ojs/index.php/cdc/article/view/8613>
16. El curtido del cuero [Internet]. *Tannins.org*. [citado 20 de junio de 2024]. Disponible en: <https://www.tannins.org/es/el-proceso-del-curtido-del-cuero/>
17. Tannin in nature [Internet]. *Tannins.org*. [citado 25 de julio de 2025]. Disponible en: <https://www.tannins.org/tannin-in-nature/>
18. [Hot Item] Cromo Sulfato Básico de Alta Calidad para Curtido de Cuero No. CAS 39380-78-4 [Internet]. *Made-in-China.com*. [citado 25 de julio de 2025]. Disponible en: https://es.made-in-china.com/co_kelaichemical/product_High-Quality-Basic-Chromium-Sulphate-for-Leather-Tanning-CAS-No-39380-78-4_uohiusshny.html
19. Labourdette V. CONTAMINACIÓN AMBIENTAL. Disponible en: <https://rephip.unr.edu.ar/server/api/core/bitstreams/02885ad3-8f3a-4c26-9df2-5ed65e01a024/content>
20. Afolau S, Ikumapayi O, Ogedengbe T, Kazeem R, Ogundipe A. Waste pollution, wastewater and effluent treatment methods – An overview. *Materials Today: Proceedings*. 1 de enero de 2022;62:3282-8.
21. Moretti-Villegas LF, Valiente-Saldaña YM, Moretti-Villegas LF, Valiente-Saldaña YM. Contaminación Ambiental y sus Efectos en la Salud Pública. *Revista Arbitrada Interdisciplinaria Koinonía*. agosto de 2023;8:257-68.
22. ¿Cuáles son los principales tipos de contaminación ambiental? [Internet]. *National Geographic*. 2022 [citado 13 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://www.nationalgeographicla.com/medio-ambiente/2022/08/cuales-son-los-principales-tipos-de-contaminacion-ambiental>
23. Kumar L, Chug M, Bharadvaja N. Microbial remediation of tannery wastewater. En: *Development in Wastewater Treatment Research and Processes* [Internet]. Elsevier; 2022 [citado 22 de mayo de 2024]. p. 303-28. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780323856577000110>

24. Vasistha P, Ganguly R. Water quality assessment of natural lakes and its importance: An overview. *Materials Today: Proceedings*. 1 de enero de 2020;32:544-52.
25. Prigione V, Trocini B, Spina F, Poli A, Romanisio D, Giovando S, et al. Fungi from industrial tannins: potential application in biotransformation and bioremediation of tannery wastewaters. *Applied microbiology and biotechnology* [Internet]. mayo de 2018 [citado 22 de mayo de 2024];102(9). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29552693/>
26. Kral I, Buljan J. The framework for sustainable leather manufacture (second edition) [Internet]. Segunda. United Nation Industrial Development Organization; 2015 [citado 24 de mayo de 2024]. 165 p. Disponible en: <https://leatherpanel.org/content/framework-sustainable-leather-manufacture-second-edition>
27. Khanbabaee K, van Ree T. Tannins: Classification and Definition. *Natural product reports*. 1 de enero de 2002;18:641-9.
28. Conca S, Gatto V, Samiolo R, Giovando S, Cassani A, Tarabra E, et al. Characterisation and tanning effects of purified chestnut and sulfited quebracho extracts. *Collagen and Leather*. 2 de septiembre de 2024;6(1):28.
29. Romero S, Almazán J, Rajal V, Castro E. Removal of vegetable tannins to recover water in the leather industry by ultrafiltration polymeric membranes. *Chemical Engineering Research and Design*. 1 de enero de 2015;93:727-35.
30. Hansen É, Monteiro P, Hansen A, Cardoso J, Ziulkoski A, Gutterres M. Impact of post-tanning chemicals on the pollution load of tannery wastewater. *Journal of Environmental Management*. 1 de septiembre de 2020;269:110787.
31. Von Gunten K. Assessment of heavy metal stability in biochar-treated soil. En: *Biochar Application in Soil to Immobilize Heavy Metals* [Internet]. Elsevier; 2024 [citado 22 de mayo de 2024]. p. 81-129. Disponible en: <https://ezproxy.ucsm.edu.pe:2056/science/article/pii/B9780323854597000057>
32. Bhat TK, Singh B, Sharma OP. Microbial degradation of tannins – A current perspective. *Biodegradation*. 1 de septiembre de 1998;9(5):343-57.
33. Jiménez N, Esteban-Torres M, Mancheño J, Rivas B, Muñoz R. Tannin Degradation by a Novel Tannase Enzyme Present in Some *Lactobacillus plantarum* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*. mayo de 2014;80(10):2991.
34. Goel G, Kumarc A, Beniwal V, Raghav M, Puniyaa K, Singh K. Degradation of tannic acid and purification and characterization of tannase from *Enterococcus faecalis*. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 1 de octubre de 2011;65(7):1061-5.
35. Cruz-Hernández M, Contreras-Esquivel Jc, Lara F, Rodríguez R, Aguilar C. Isolation and evaluation of tannin-degrading fungal strains from the Mexican desert. *Zeitschrift fur Naturforschung C, Journal of biosciences* [Internet]. diciembre de 2005 [citado 25 de mayo de 2024];60(11-12). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16402543/>

36. Badri H, Nazari S, Fathzadeh Y, Asgari E. A comparison of the efficiency of electrocoagulation and alum NPs for tannic acid removal from aqueous solutions. *Int J Environ Sci Technol*. 3 de abril de 2024;1-14.
37. Bensalah N, Khaoula S, Bedoui A. Efficient degradation of tannic acid in water by UV/H₂O₂ process. *Sustainable Environment Research*. 1 de enero de 2018;28(1):1-11.
38. Dbira S, Bensalah N, Zagho M, Massouda E, Bedoui A. Ciencias Aplicadas | Texto completo gratuito | Degradación oxidativa del ácido tánico en solución acuosa mediante procesos UV/S₂O₈²⁻ y UV/H₂O₂/Fe²⁺: un estudio comparativo [Internet]. [citado 26 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-3417/9/1/156>
39. Shuguang H, Kong X, Jia B, Dong M, Gan L. UV light-driven controlled photodegradation of condensed tannins from larch bark. *Industrial Crops and Products*. 1 de marzo de 2022;177:114403.
40. Verzele M, Delahaye P. Analysis of tannic acids by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1 de enero de 1983;268:469-76.
41. Yang P, Li Y, Wang P, Wang L. A sensitive inhibition chemiluminescence method for the determination of trace tannic acid using the reaction of luminol-hydrogen peroxide catalysed by tetrasulphonated manganese phthalocyanine. *Luminescence: the journal of biological and chemical luminescence* [Internet]. febrero de 2007 [citado 26 de mayo de 2024];22(1). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16874849/>
42. Xie Cg, Li Hf. Determination of tannic acid in industrial wastewater based on chemiluminescence system of KIO₄-H₂O₂-Tween40. *Luminescence: the journal of biological and chemical luminescence* [Internet]. octubre de 2010 [citado 26 de mayo de 2024];25(5). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19536767/>
43. Liu X, Zhang W, Yang C, Yao Y, Huang L, Li S, et al. Rapid and selective fluorometric determination of tannic acid using MoO₃-x quantum dots. *Mikrochimica acta* [Internet]. 16 de marzo de 2019 [citado 26 de mayo de 2024];186(4). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30879138/>
44. Wei L. Online determination of trace amounts of tannic Acid in colored tannery wastewaters by automatic reference flow injection analysis. *Journal of automated methods & management in chemistry* [Internet]. 2010 [citado 26 de mayo de 2024];2010. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20508812/>
45. Hansen É, Monteiro P, Gutterres M. Current technologies for post-tanning wastewater treatment: A review. *Journal of Environmental Management*. 15 de septiembre de 2021;294:113003.
46. Crişan I, Balestrini R, Pagliarini C. The current view on heavy metal remediation: The relevance of the plant interaction with arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Stress*. 1 de junio de 2024;12:100439.
47. Negi B, Das C. Mycoremediation of wastewater, challenges, and current status: A review. *Bioresource Technology Reports*. 1 de junio de 2023;22:101409.

48. Dasgupta D, Barman S, Sarkar J, Mridha D, Labrousse P, Roychowdhury T, et al. Mycoremediation of different wastewater toxicants and its prospects in developing value-added products: A review. *Journal of Water Process Engineering*. 1 de febrero de 2024;58:104747.
49. Lekha P, Lonsane B. Production and Application of Tannin Acyl Hydrolase: State of the Art. En: *Advances in Applied Microbiology* [Internet]. Academic Press; 1997 [citado 22 de mayo de 2024]. p. 215-60. Disponible en: <https://ezproxy.ucsm.edu.pe:2056/science/article/pii/S0065216408704635>
50. Murugan K, Saravanababu S, Arunachalam M. Screening of tannin acyl hydrolase (E.C.3.1.1.20) producing tannery effluent fungal isolates using simple agar plate and SmF process. *Bioresource technology* [Internet]. marzo de 2007 [citado 22 de mayo de 2024];98(4). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16839759/>
51. Racić G, Vukelić I, Kordić B, Radić D, Lazović M, Nešić L, et al. Screening of Native *Trichoderma* Species for Nickel and Copper Bioremediation Potential Determined by FTIR and XRF. *Microorganisms*. marzo de 2023;11(3):815.
52. Sharma S, Bhat T, Dawra R. A Spectrophotometric Method for Assay of Tannase Using Rhodanine. *Analytical Biochemistry*. 1 de marzo de 2000;279(1):85-9.
53. Mondal K, Banerjee J, Pati B. Colorimetric Assay Method for Determination of the Tannin Acyl Hydrolase (EC 3.1.1.20) Activity. *Analytical Biochemistry*. 15 de agosto de 2001;295(2):168-71.
54. Naumann A. Fourier Transform Infrared (FTIR) Microscopy and Imaging of Fungi. En: *Advanced Microscopy in Mycology* [Internet]. Springer, Cham; 2015 [citado 20 de junio de 2024]. p. 61-88. Disponible en: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-22437-4_4
55. Webb J, Holgate J. MICROSCOPY | Scanning Electron Microscopy. 1 de enero de 2003;3922-8.
56. Awais M, Fatma S, Naveed A, Batool U, Shehzad Q, Hameed A. Enhanced biodegradation of organic waste treated by environmental fungal isolates with higher cellulolytic potential. *Biomass Conv Bioref*. 7 de octubre de 2021;1-16.
57. Ordoñez-Gómez ES, Reátegui-Díaz D, Villanueva-Tiburcio JE. Polifenoles totales y capacidad antioxidante en cáscara y hojas de doce cítricos. *Scientia Agropecuaria*. enero de 2018;9(1):113-21.
58. Aboubakr HA, El-Sahn MA, El-Banna AA. Screening of Tannase-Producing Fungi Isolated from Tannin-Rich Sources. *International Journal of Agricultural and Food Research* [Internet]. 12 de septiembre de 2013 [citado 19 de junio de 2024];2(3). Disponible en: <https://www.sciencetarget.com/Journal/index.php/IJAfr/article/view/152>
59. Muñoz L, Olivera P, Santillán M, Tamariz C. Microorganismos tolerantes a metales pesados del pasivo minero Santa Rosa, Jangas (Perú). *Revista Peruana de Biología*. enero de 2019;26(1):109-18.

60. Srivastava A, Kar R. Characterization And Application Of Tannase Produced By *Aspergillus Niger* ITCC 6514.07 On Pomegranate Rind - PMC [Internet]. 2009 [citado 6 de febrero de 2025]. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3768578/>
61. Guibal E, Roulph C, Le Cloirec P. Infrared spectroscopic study of uranyl biosorption by fungal biomass and materials of biological origin. *Environmental science & technology* [Internet]. 10 de enero de 1995 [citado 9 de junio de 2024];29(10). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22191947/>
62. Spier F, Gutterres M. BIODEGRADATION OF ACACIA AND CHESTNUT TANNINS BY NATIVE ISOLATES OF THE GENUS *Penicillium* AND *Aspergillus*. *Braz J Chem Eng*. 30 de septiembre de 2019;36:753-61.
63. Bello MA, Ruiz-León Y, Sandoval-Sierra JV, Rezinciuc S, Diéguez-Uribeondo J. Scanning Electron Microscopy (SEM) Protocols for Problematic Plant, Oomycete, and Fungal Samples. *Journal of Visualized Experiments : JoVE* [Internet]. 2017 [citado 13 de junio de 2024];(120). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5408598/>
64. Thakur N, Nath AK, Sharma A. Optimization of production conditions, isolation, purification, and characterization of tannase from filamentous fungi. *Folia Microbiol*. 21 de marzo de 2024;1-13.
65. Chaudhary P, Beniwal V, Umar A, Kumar R, Sharma P, Kumar A, et al. *In vitro* microcosm of co-cultured bacteria for the removal of hexavalent Cr and tannic acid: A mechanistic approach to study the impact of operational parameters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 15 de enero de 2021;208:111484.
66. Bhat TK, Makkar HP, Singh B. Preliminary studies on tannin degradation by *Aspergillus niger* van Tieghem MTCC 2425. *Lett Appl Microbiol*. julio de 1997;25(1):22-3.
67. Saad M, Saad A, Hassan H, Ibrahim E, Hassabo A, Ali B. Bioremoval of tannins and heavy metals using immobilized tannase and biomass of *Aspergillus glaucus* | *Microbial Cell Factories* | Full Text [Internet]. 2024 [citado 25 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-024-02477-z>
68. Spennati F, Mora M, Tigini V, La China S, Di Gregorio S, Gabriel D, et al. Removal of Quebracho and Tara tannins in fungal bioreactors: Performance and biofilm stability analysis. *Journal of Environmental Management*. 1 de febrero de 2019;231:137-45.
69. Meena SK, Meena SO, Sangal VK. Once through continuous mode electrocoagulation for tannery wastewater remediation: Process optimization and performance evaluation. *Journal of the Indian Chemical Society*. 1 de agosto de 2024;101(8):101212.
70. Mohamed MA, Jaafar J, Ismail AF, Othman MHD, Rahman MA. Chapter 1 - Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. En: Hilal N, Ismail AF, Matsuura T, Oatley-Radcliffe D, editores. *Membrane Characterization* [Internet]. Elsevier; 2017 [citado 30 de mayo de 2025]. p. 3-29. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444637765000012>

71. Arshadi M, Esmaeili A, Yaghmaei S, Arab B. Evaluation of *Aspergillus niger* and *Penicillium simplicissimum* for their ability to leach Zn–Ni–Cu from waste mobile phone printed circuit boards. *J Mater Cycles Waste Manag*. 1 de enero de 2022;24(1):83-96.
72. Saif FA, Yaseen SA, Alameen AS, Mane SB, Undre PB. Identification and characterization of *Aspergillus* species of fruit rot fungi using microscopy, FT-IR, Raman and UV–Vis spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 5 de febrero de 2021;246:119010.
73. Gáplovská K, Šimonovičová A, Halko R, Okenicová L, Žemberyová M, Čerňanský S, et al. Study of the binding sites in the biomass of *Aspergillus niger* wild-type strains by FTIR spectroscopy. *Chem Pap*. 1 de septiembre de 2018;72(9):2283-8.
74. Chaudhary P, Beniwal V, Kaur R, Kumar R, Kumar A, Chhokar V. Efficacy of *Aspergillus fumigatus* MCC 1175 for Bioremediation of Tannery Wastewater. *CLEAN – Soil, Air, Water*. 2019;47(6):1900131.
75. Sanchez J, Marrugo J, Urango I. Simultaneous biosorption of lead and cadmium from aqueous solution by fungal biomass *Penicillium* sp. *Temas Agrarios* [Internet]. 1 de enero de 2014 [citado 11 de julio de 2025]; Disponible en: https://www.academia.edu/44465951/Simultaneous_biosorption_of_lead_and_cadmium_from_aqueous_solution_by_fungal_biomass_Penicillium_sp
76. Kayar F, Doymus M, Ozkan H, Arslan NP, Adiguzel A, Taskin M. Preparation of Chitosan with High Antibacterial Efficiency from *Penicillium crustosum* TZ18. *J Polym Environ*. 1 de septiembre de 2022;30(9):3598-608.
77. Kirtil HE, Cebi N, Yildirim RM, Metin B, Arici M. A rapid spectroscopic method for the identification of the filamentous fungi isolated from Turkish traditional mold-ripened cheeses. *Journal of Microbiological Methods*. 1 de febrero de 2024;217-218:106884.
78. Saif FA, Yaseen SA, Alameen AS, Mane SB, Undre PB. FTIR spectroscopy and microscopy as methods for identification and discrimination of *penicillium* species of fruit. *AIP Conf Proc* [Internet]. 26 de junio de 2020 [citado 11 de julio de 2025];2244(1). Disponible en: <https://pubs.aip.org/aip/acp/article/2244/1/020002/723806/FTIR-spectroscopy-and-microscopy-as-methods-for>
79. Ramachandran S, Fontanille P, Pandey A, Larroche C. Permeabilization and inhibition of the germination of spores of *Aspergillus niger* for gluconic acid production from glucose. *Bioresource Technology*. 1 de julio de 2008;99(11):4559-65.
80. Srivastava S, Thakur IS. Biosorption Potency of *Aspergillus niger* for Removal of Chromium (VI). *Curr Microbiol*. 1 de septiembre de 2006;53(3):232-7.
81. Chen SH, Cheow YL, Ng SL, Ting ASY. Mechanisms for metal removal established via electron microscopy and spectroscopy: a case study on metal tolerant fungi *Penicillium simplicissimum*. *Journal of Hazardous Materials*. 15 de enero de 2019;362:394-402.
82. Bayrak G, İdil N, Perçin I. *Penicillium chrysogenum*-loaded hybrid cryogel discs for heavy metal removal. *Chem Pap*. 1 de julio de 2023;77(7):3921-36.



ANEXOS

Anexo 1: Figuras de los resultados



Figura 41. Ubicación de las zonas de muestreo para el aislamiento de especies fúngicas a partir de efluentes de curtiembre.

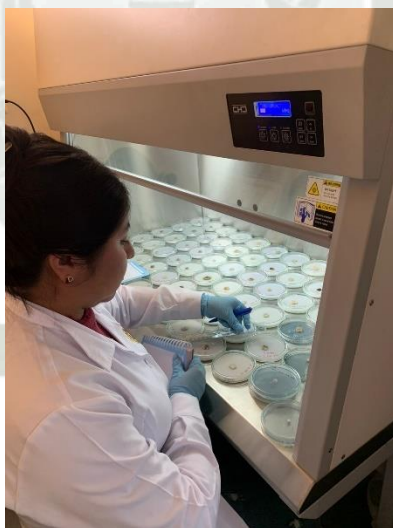


Figura 42. Siembra de las cepas en medio sólido suplementado con ácido tánico (10 g/L)



Figura 43. Índice de tolerancia cepa *P. crustosum* (primera evaluación)



Figura 44. Indice de tolerancia cepa *A. niger/awamori* (primera evaluacion)



Figura 45. Siembra de las cepas *A. niger* y *P. crustosum* en medio liquido



Figura 46. Cuantificacion de fenoles (metodo Folin-Cioclatau) (primera evaluacion)

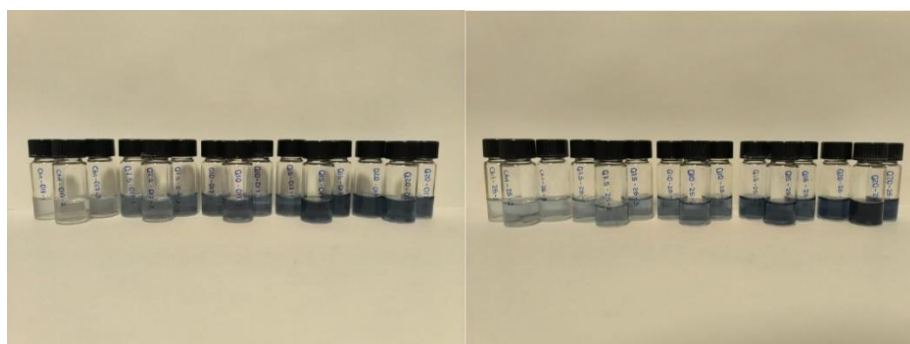


Figura 47. Formacion de color por parte de *P. crustosum* (izquierda) y *A. niger/awamori* (derecha)



Figura 48. Cuantificación de actividad tanasa producida por *P. crustosum* y *A. niger/awamori* (primera evaluación)

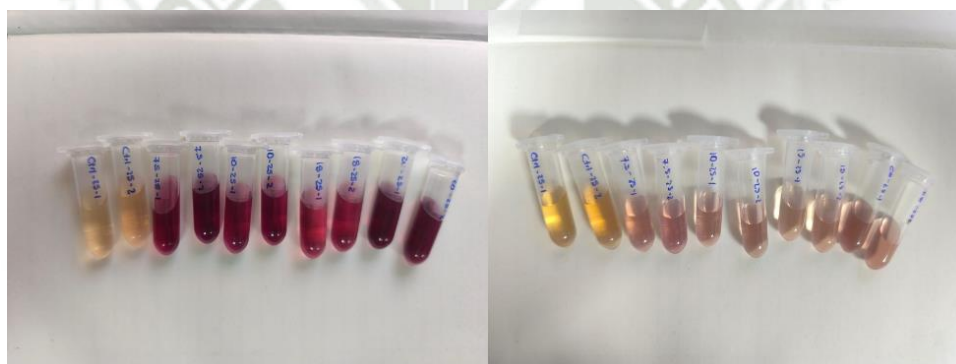


Figura 49. Formación de color al anadir la rodanina para *A. niger/awamori*. Antes de la dilución (izquierda) y después de la dilución (derecha)



Figura 50. Curva de calibración DQO

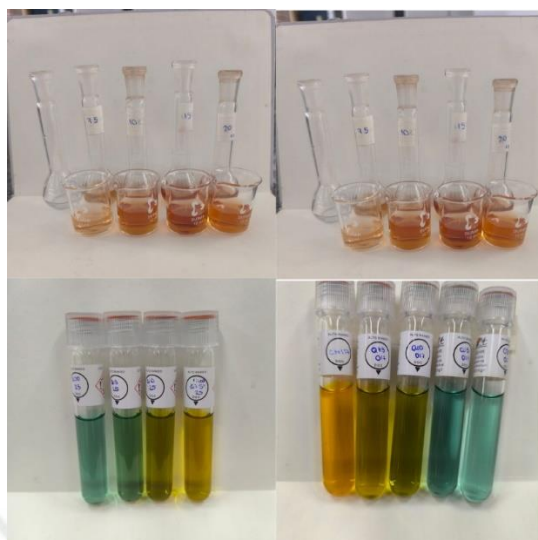


Figura 51. Resultados de DQO para *A. niger/awamori* (izquierda) y *P. crustosum* (derecha)



Figura 52. Liofilización de las cepas *A. niger/awamori* y *P. crustosum*



Figura 53. Protocolo de preparación para el análisis por FTIR

Anexo 2: Tablas de resultados

Pre-tolerancia: Tabla de crecimiento micelial.

Cepa	Repetición	Crecimiento micelial (mm)				
		E1 (02-08-24)	E2 (05-08-24)	E3 (08-08-24)	E4 (12-08-24)	E5 (16-08-24)
E001-002 Blanca	R1	19	30	35	39	42
	R2	15	25	31	36	40
	R3	17	28	34	37	39
E01-002 Blanca 01	R1	0	33	43	54	54
	R2	0	30	39	52	53
	R3	0	28	41	50	50
E01-002-01 Blanca 2	R1	0	25	36	40	42
	R2	0	20	31	42	47
	R3	0	21	29	40	40
E01-002-02 (4)	R1	35	55	60	81	88
	R2	24	42	47	47	81
	R3	30	45	52	57	77
E01-002-06 (11)	R1	18	29	44	54	57
	R2	16	32	40	44	52
	R3	15	30	42	50	50
E01-002-10 (19)	R1	0	30	30	35	35
	R2	0	27	31	35	35
	R3	0	26	29	33	33
E01-002-10 (20)	R1	0	13	20	20	20
	R2	0	10	18	20	20
	R3	0	13	19	20	20
E01-005-01(21)	R1	13	40	45	52	58
	R2	10	37	42	43	43
	R3	13	41	45	50	55
E01-005-02 (23,24)	R1	0	0	0	0	0
	R2	0	0	0	0	0
	R3	0	0	0	0	0
E01-005-04 (27)	R1	21	40	54	54	54
	R2	17	38	53	59	59
	R3	20	40	51	53	53
E01-005-05 (29)	R1	20	35	49	50	52
	R2	15	30	47	49	52
	R3	20	32	49	50	50
E01-005-05 (39)	R1	16	30	34	51	52
	R2	13	28	32	46	50

	R3	16	30	32	48	41
E01-005-06 (31)	R1	14	40	53	59	63
	R2	11	36	47	55	60
	R3	13	39	50	58	60
E01-005-07 (33)	R1	0	21	28	37	43
	R2	0	20	25	36	40
	R3	0	17	26	34	39
E01-010-06 (57)	R1	16	35	45	45	45
	R2	19	30	45	60	60
	R3	17	35	48	50	50
E02-002-10 (20)	R1	13	20	70	90	90
	R2	12	17	59	90	90
	R3	10	15	90	90	90
E02-007-01 (37)	R1	0	30	38	44	53
	R2	0	35	43	0	0
	R3	0	29	40	42	50
E02-007-01 (38)	R1	0	35	35	60	61
	R2	0	30	33	66	66
	R3	0	33	37	47	50
E02-008-01 (39,40)	R1	24	30	40	0	0
	R2	20	28	39	0	0
	R3	23	28	38	0	0
E02-008-02 (42)	R1	32	50	65	65	65
	R2	35	55	67	69	70
	R3	33	52	66	69	70
E02-009	R1	0	24	32	42	42
	R2	0	20	31	42	50
	R3	0	22	27	39	49
E02-009-01 (45)	R1	13	30	38	38	42
	R2	10	28	36	38	40
	R3	13	30	35	36	40
E02-009-01 (46)	R1	18	30	44	44	45
	R2	15	15	15	15	15
	R3	0	0	0	0	0
E02-10-01 (48)	R1	12	12	15	17	20
	R2	15	28	28	29	29
	R3	15	23	23	23	24
E02-13 Verde	R1	0	15	19	20	21
	R2	0	10	14	16	16
	R3	0	12	16	18	19
	R1	21	60	64	67	73

E03-014-01 (69)	R2	20	57	61	65	70
	R3	18	59	64	66	71
E03-014-01 (69) tecnopor	R1	13	16	25	44	45
	R2	15	21	22	33	34
	R3	10	19	27	51	51
E03-016-01 (71)	R1	15	33	33	35	35
	R2	13	28	28	28	29
	R3	15	30	32	33	33
E03-016-03 (74)	R1	22	45	53	53	55
	R2	25	45	55	55	55
	R3	23	43	50	51	51
E03-016-03 (75)	R1	18	45	48	52	55
	R2	22	40	65	66	70
	R3	20	43	50	53	53
E03-016-04 (76)	R1	0	65	66	68	68
	R2	0	63	64	70	70
	R3	0	60	60	62	64
<i>P. crustosum</i>	R1	22	73	90	90	90
	R2	30	90	90	90	90
	R3	31	90	90	90	90
E03-018-P.P. Raspado parrilla	R1	0	20	90	90	90
	R2	0	35	35	35	40
	R3	0	20	27	30	33
E03-019-P.P.	R1	0	25	30	73	88
	R2	0	16	28	60	79
	R3	0	15	29	51	90
E03-019-02	R1	0	35	37	40	63
	R2	0	30	34	44	59
	R3	0	33	40	45	66
<i>A. niger/awamori</i>	R1	30	90	90	90	90
	R2	35	90	90	90	90
	R3	33	90	90	90	90
E04-001-01 (59)	R1	21	30	43	47	53
	R2	17	25	40	45	49
	R3	13	24	39	43	50
E04-001-02 Amarilla pura (60)	R1	17	32	43	50	55
	R2	12	12	13	13	13
	R3	15	29	37	48	52
E04-001-03 Amarilla pura (60)	R1	0	32	38	45	50
	R2	0	0	0	0	0
	R3	0	30	35	41	48

	R1	17	35	49	58	60
E04-002-01 Amarilla pura (61)	R2	18	35	38	44	44
	R3	15	33	40	41	47

Tolerancia: Tabla de crecimiento micelial (mm).

Cepa	% tanino	Rep.	E1 (25-10-24)	E2 (28-10-24)	E3 (31-10-24)	E4 (04-11-24)	E5 (07-11-24)
<i>A. niger/awamori</i>	Ctrl	Ctrl 1	10	60	80	89	88
		Ctrl 2	10	63	90	80	89
		Ctrl 3	9	75	84	88	79
	7,5%	R1	45	71	77	84	86
		R2	45	70	90	90	85
		R3	70	90	90	88	88
	10%	R1	80	90	90	89	87
		R2	50	60	73	84	81
		R3	45	69	84	83	77
	15%	R1	30	90	90	88	87
		R2	20	90	90	80	89
		R3	55	81	85	88	90
	20%	R1	23	90	90	88	87
		R2	30	90	90	85	86
		R3	24	90	90	90	81
	Ctrl	Ctrl 1	25	47	64	83	86
		Ctrl 2	24	45	65	80	85
		Ctrl 3	20	40	56	85	89
	7,5%	R1	5	20	40	49	57
		R2	5	31	37	46	60
		R3	3	22	35	40	55
	10%	R1	0	61	64	67	70
		R2	3	14	60	64	70
		R3	4	30	42	62	79
	15%	R1	0	24	27	35	35
		R2	1	28	30	37	45
		R3	1	38	42	45	61
	20%	R1	0	10	12	12	12
		R2	0	10	10	10	10
		R3	0	5	7	10	10

Tolerancia: Tabla del Índice de Tolerancia de las cepas seleccionadas a las diferentes concentraciones de quebracho.

Cepa	% tanino	Rep.	E1 (25-10-2024)	E2 (28-10-2024)	E3 (31-10-2024)	E4 (04-11-2024)	E5 (07-11-24)
<i>A. niger/awamori</i>	7,5	R1	1,26	0,96	0,89	0,98	1,01
		R2	1,26	0,95	1,04	1,05	1,00
		R3	1,96	1,22	1,04	1,02	1,03
	10	R1	2,23	1,22	1,04	1,03	1,02
		R2	1,40	0,81	0,85	0,98	0,95
		R3	1,26	0,93	0,97	0,97	0,90
	15	R1	0,84	1,22	1,04	1,02	1,02
		R2	0,56	1,22	1,04	0,93	1,04
		R3	1,54	1,10	0,99	1,02	1,05
	20	R1	0,64	1,22	1,04	1,02	1,02
		R2	0,84	1,22	1,04	0,99	1,01
		R3	0,67	1,22	1,04	1,05	0,95
<i>P. crustosum</i>	7,5	R1	0,31	0,57	0,75	0,69	0,66
		R2	0,31	0,89	0,69	0,64	0,69
		R3	0,18	0,63	0,65	0,56	0,63
	10	R1	0,00	1,74	1,19	0,94	0,81
		R2	0,18	0,40	1,12	0,90	0,81
		R3	0,24	0,86	0,78	0,87	0,91
	15	R1	0,00	0,69	0,50	0,49	0,40
		R2	0,06	0,80	0,56	0,52	0,52
		R3	0,06	1,09	0,78	0,63	0,70
	20	R1	0,00	0,29	0,22	0,17	0,14
		R2	0,00	0,29	0,19	0,14	0,12
		R3	0,00	0,14	0,13	0,14	0,12

Tabla de Abs 727 nm (Folin Ciocalteu)

CEPA	% tanino	Rep.	Abs 727 nm				
			Dia 03	Dia 06	Dia 09	Dia 12	Dia 15
E01-005-03 (25)	Ctrl	R1	0,047562	0,023866	0,023105	0,025677	0,1343755
		R2	0,030626	0,0187285	0,028101	0,029417	0,118528
		R3	0,030276	0,013591	0,018109	0,028035	0,150223
	7,5	R1	0,050358	0,050448	0,0420475	0,03532788	0,283035
		R2	0,048102	0,044808	0,03735	0,030966	0,27816
		R3	0,045846	0,047628	0,046745	0,03968975	0,247895
	10	R1	0,099157	0,080798	0,0738815	0,0657	0,375209
		R2	0,093961	0,083795	0,072964	0,069549	0,386969

E03-017	15	R3	0,096559	0,086792	0,074799	0,061851	0,370372
		R1	0,143164	0,128472	0,1182575	0,102155	0,575373
		R2	0,134086	0,122314	0,11295925	0,104336	0,577075
		R3	0,138625	0,125393	0,11560838	0,10651725	0,578777
	20	R1	0,2187405	0,192648	0,136717	0,136717	0,1656015
		R2	0,21637	0,192036	0,15012825	0,15012825	0,163226
		R3	0,221111	0,19326	0,14342263	0,14342263	0,167977
	Ctrl	R1	0,032462	-0,000264	0,018731	0,02024	0,064865
		R2	0,039325	0,001583	0,02172	0,015488	0,061568
		R3	0,033596	0,0006595	0,016439	0,016642	0,082066
	7,5	R1	0,058174	0,050849	0,045895	0,036625	0,229342
		R2	0,0604335	0,0516755	0,0510395	0,03985425	0,227996
		R3	0,062693	0,052502	0,04846725	0,0430835	0,2193185
	10	R1	0,097885	0,091921	0,0895955	0,05125975	0,3083135
		R2	0,092446	0,085715	0,091759	0,0570065	0,27808775
		R3	0,0951655	0,092046	0,087432	0,045513	0,29320063
	15	R1	0,13867	0,139295	0,12014675	0,505277	0,117993
		R2	0,13458	0,134097	0,125338	0,521786	0,121286
		R3	0,135102	0,128899	0,12274238	0,496204	0,1196395
	20	R1	0,171282	0,160183	0,143839	0,1064935	0,570082
		R2	0,1827795	0,160254	0,147856	0,108256	0,563972
		R3	0,17703075	0,160112	0,151873	0,10737475	0,547101

Tabla de concentración de fenoles (mg/L) por día de evaluación.

Cepa	% tanino	Rep.	Concentración de fenoles (mg/L)				
			Dia 03	Dia 06	Dia 09	Dia 12	Dia 15
<i>A. niger/awamori</i>	Ctrl	R1	33,13	26,14	25,92	26,67	14,68
		R2	28,13	24,63	27,39	27,78	13,51
		R3	28,03	23,11	24,44	27,37	15,85
	7,5	R1	45,74	33,98	31,50	29,52	25,64
		R2	45,08	32,31	30,11	28,23	25,28
		R3	44,41	33,15	32,88	30,80	23,05
	10	R1	48,34	48,82	40,88	38,47	32,43
		R2	46,80	49,70	40,61	39,61	33,30
		R3	47,57	50,59	41,16	37,34	32,07
	15	R1	61,31	56,98	53,97	49,22	47,18

<i>P. crustosum</i>	20	R2	58,63	55,16	52,41	49,86	47,31
		R3	59,97	56,07	53,19	50,51	47,43
		R1	83,59	75,90	70,50	59,41	67,92
	20	R2	82,89	75,72	71,00	63,36	67,22
		R3	84,29	76,08	70,00	61,39	68,63
		R1	28,67	19,03	24,63	25,07	9,56
	Ctrl	R2	30,70	19,57	25,51	23,67	9,31
		R3	29,01	19,30	23,95	24,01	10,82
		R1	36,25	34,09	32,63	29,90	21,67
	7,5	R2	36,92	34,34	34,15	30,85	21,60
		R3	37,59	34,58	33,39	31,81	20,93
		R1	51,20	46,20	45,52	34,22	27,50
	10	R2	49,31	44,37	46,16	35,91	25,27
		R3	50,26	46,24	44,88	32,52	26,39
		R1	59,99	60,17	54,52	30,22	53,89
	15	R2	58,78	58,64	56,05	29,97	54,86
		R3	58,93	57,10	55,29	29,56	54,37
		R1	69,60	66,26	61,51	50,50	46,79
	20	R2	72,99	66,35	62,69	51,02	46,34
		R3	71,29	66,31	63,88	50,76	45,10

Tabla de Abs 520 nm (Ensayo de tanasa), por cada día de evaluación.

CEPA	% tanino	Rep.	Abs 520 nm				
			Día 03	Día 06	Día 09	Día 12	Día 15
E01-005-03 (25)	Ctrl	R1	0,261	0,236	0,254	0,197	0,202
		R2	0,228	0,22	0,162	0,245	0,2
		R3	0,263	0,234	0,208	0,221	0,201
	7,5	R1	0,187	0,208	0,137	0,352	0,404
		R2	0,185	0,192	0,16	0,428	0,431
		R3	0,186	0,2	0,1485	0,39	0,4175
	10	R1	0,189	0,2	0,171	0,304	0,441
		R2	0,198	0,178	0,19	0,29	0,444
		R3	0,1935	0,189	0,1805	0,297	0,4425
	15	R1	0,189	0,188	0,203	0,194	0,394
		R2	0,199	0,194	0,209	0,233	0,403
		R3	0,194	0,191	0,206	0,2135	0,3985
	20	R1	0,227	0,231	0,229	0,455	0,466

E03-017	Ctrl	R2	0,211	0,223	0,299	0,469	0,46
		R3	0,219	0,227	0,264	0,462	0,463
		R1	0,258	0,253	0,181	0,226	0,22
	7,5	R2	0,258	0,276	0,171	0,256	0,2
		R3	0,258	0,2645	0,176	0,241	0,21
		R1	0,219	0,213	0,374	0,373	0,264
	10	R2	0,233	0,203	0,267	0,356	0,257
		R3	0,226	0,208	0,3205	0,3645	0,2605
		R1	0,254	0,213	0,234	0,33	0,419
	15	R2	0,27	0,223	0,254	0,338	0,407
		R3	0,262	0,218	0,244	0,334	0,413
		R1	0,224	0,259	0,215	0,521	0,33
	20	R2	0,239	0,257	0,248	0,491	0,369
		R3	0,2315	0,258	0,2315	0,506	0,3495
		R1	0,32	0,346	0,266	0,538	0,413
		R2	0,379	0,354	0,234	0,418	0,407
		R3	0,3495	0,35	0,25	0,478	0,41

Tabla de concentración de tanasa (U) por día de evaluación.

Cepa	% tanino	Rep.	Día 03	Día 06	Día 09	Día 12	Día 15
E01-005-03 (25)	Ctrl	R1	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
		R2	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02
		R3	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
	7,5	R1	1,42	1,59	1,03	2,71	3,12
		R2	1,41	1,46	1,21	3,31	3,33
		R3	1,42	1,53	1,12	3,01	3,23
	10	R1	1,44	1,53	1,30	2,34	3,41
		R2	1,51	1,35	1,45	2,23	3,43
		R3	1,47	1,44	1,37	2,28	3,42
	15	R1	1,44	1,43	1,55	1,48	3,04
		R2	1,52	1,48	1,60	1,78	3,11
		R3	1,48	1,46	1,57	1,63	3,08

E03-017	20	R1	1,74	1,77	1,75	3,52	3,61
		R2	1,61	1,71	2,30	3,63	3,56
		R3	1,67	1,74	2,03	3,58	3,58
	Ctrl	R1	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02
		R2	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02
		R3	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02
	7,5	R1	1,67	1,63	2,89	2,88	2,03
		R2	1,78	1,55	2,05	2,75	1,97
		R3	1,73	1,59	2,47	2,81	2,00
	10	R1	1,95	1,63	1,79	2,54	3,24
		R2	2,07	1,71	1,95	2,61	3,14
		R3	2,01	1,67	1,87	2,57	3,19
	15	R1	1,71	1,99	1,64	4,04	2,54
		R2	1,83	1,97	1,90	3,80	2,85
		R3	1,77	1,98	1,77	3,92	2,70
	20	R1	2,46	2,67	2,04	4,17	3,19
		R2	2,93	2,73	1,79	3,23	3,14
		R3	2,70	2,70	1,92	3,70	3,17

Anexo 3. Documentos adjuntos



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA DEL ADN UCHUMAYO E.I.R.L.

IDENTIFICACION MOLECULAR DE ESPECIES

Nombre del Solicitante: Hugo Jimenez

Dirección:

Email: hjimenez@ucsm.edu.pe Teléfono: 972713747

País: Perú, Provincia: Arequipa Distrito: Arequipa

Muestra: 3 Cultivos puros de hongos en cuarto repique.

Indicaciones: Identificación Molecular de Hongos por secuenciación del gen ITS1

Introduccion.

En general, para hongos, la región ITS del ADNr se utiliza como objetivo principal y es amplificado con los primers ITS-1 y ITS-4. En algunos casos, estos cebadores pueden no proporcionar suficiente identificación y es posible que se requiera una región codificante de proteína.

Metodología:

La identificación consiste en la extracción de ADN de la muestra usando el Kit "The MasterPure™ DNA Purification Kit" que provee todos los reactivos necesarios para la recuperación de ADN utilizado para amplificación de la región ITS1, mediante PCR.

La amplificación correspondiente a la región ITS1 se llevó a cabo usando los primer universales ITS-1, Estos primers amplifican aproximadamente 600 pares de bases de la región ITS1 -5.8S-ITS2 del cistron ribosómico.

Forward: ITS-1 5'-TCCGTAGGTAACCTGCGG

Reverse: ITS-4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC

Temperatura de hibridacion: 52°C

Los productos de PCR fueron purificados usando el kit Qiagen PCR purification, y se siguió las instrucciones de la compañía, los productos purificados fueron secuenciados usando la técnica de Sanger que utiliza colorantes Big Dye V3.1 y leídos en un equipo ABI 3730xl.

La secuencias revisadas se compara con la base de datos de NCBI usando el software BLAST® » blastn suite.

Prolongacion San Martin Q-3 Uchumayo - Arequipa - Peru
Sucursal: La Merced N° 125 Int. 125 Cercado - Arequipa
Telefono: +51-54-493007 www.adnuchumayo.com



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA DEL ADN UCHUMAYO E.I.R.L.

RESULTADOS:

seq.txt:

Esta es la versión revisada del archivo FASTA. En este archivo, las bases de alta calidad con puntuaciones por encima de 20 se escriben con letras mayúsculas. Esta secuencia es utilizada para la comparación en el análisis de identificación de las siguientes cepas.

CEPA HH1

>HH1_ITS1-F TRIM QUALITY: 20

```
TTACCGAGTGC GGGTCCTTTGGGCCCCAACCTCCCATCCGTGTCTATTGTA
CCCTGTTGCTTCGGCGGGGCCCGCTTGTGCGCCGCCGGGGGGCGCCT
CTGCCCCCGGGCCCGTGC CGCGGAGACCCCAACGAACACTGTCTG
AAAGCGTGCACTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAACTTTCAACA
ATGGATCTCTTGGTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA
CTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACAT
TGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGC
CCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCCGGGGGGAC
GGGCGCGAAAGGCAGCGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGG
CTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACGTTTCCAA
CCATTCTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCGCTGAACCTT
AAGCATAT
```

El análisis de comparación de la secuencia "ITS 1" con la base de datos de GenBank, mediante el software Blast, muestra una similitud de 100% con las especies:

[Aspergillus awamori](#) accesión [LC573565.1](#)

[Aspergillus niger strain 1901NT-1.4.4](#), accession [MN585763.1](#)

Como se muestra en la tabla adjunta:

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 8

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
☒	Aspergillus awamori NRRC 4120 genes for 18S rRNA ITS1, 5.8S rRNA ITS2 and 28S rRNA, partial and complete sequence	1031	1031	100%	0.0	100.00%	LC573565.1
☒	Aspergillus niger strain 1901NT-1.4.4 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; any	1031	1031	100%	0.0	100.00%	MN585763.1
☒	Aspergillus awamori strain CIRM-BRFM 627 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; any	1031	1031	100%	0.0	100.00%	FV108056.1
☒	Aspergillus niger isolate UASW52528 PB 14 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; any	1031	1031	100%	0.0	100.00%	MW793375.1
☒	Aspergillus niger strain G1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; any	1031	1031	100%	0.0	100.00%	J0821802.1
☒	Aspergillus niger isolate 3110 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; any	1031	1031	100%	0.0	100.00%	MT074422.1
☐	Aspergillus niger strain EM 2010 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; any	1031	1031	100%	0.0	100.00%	MK377324.1
☐	Aspergillus sp. strain 553 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; any	1031	1031	100%	0.0	100.00%	KX328746.1

Prolongacion San Martin Q-3 Uchumayo - Arequipa - Peru
Sucursal: La Merced N° 125 Int. 125 Cercado - Arequipa
Telefono: +51-54-493007 www.adnuchumayo.com



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA DEL ADN UCHUMAYO E.I.R.L.

Cuando se hace un análisis filogenético escogiendo 10 especies con mayor similitud, el modelo de árbol "Fast Minimum Evolution" la secuencia evaluada presenta un mayor acercamiento a la especie *Aspergillus awamori* y *Aspergillus niger*

● Aspergillus awamori NBRC:4120 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rR
● Aspergillus niger strain 1901NT-1.4.4 small subunit ribosomal RNA g
● Aspergillus awamori strain CIRM-BRFM 827 internal transcribed spa
● Aspergillus niger isolate UASWS2528 PB-14 small subunit ribosomal
● Aspergillus niger strain G1 small subunit ribosomal RNA gene, partial
● Aspergillus niger isolate 3110 small subunit ribosomal RNA gene, par
● Aspergillus awamori NBRC:4115 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rR
● Aspergillus welwitschiae strain CMV004I2 18S ribosomal RNA gene,
● Aspergillus sp. isolate KZ-13 small subunit ribosomal RNA gene, part
● Aspergillus awamori strain NYKC26 small subunit ribosomal RNA ge
● HH1 ITS1-F TRIM QUALITY: 20

CONCLUSIONES

1. El Cultivo puro de hongo, con rotulo "HH1", corresponde a *Aspergillus awamori* o *Aspergillus niger*

COMENTARIO

Aspergillus awamori y *Aspergillus niger* son dos especies de hongos que a menudo se confunden debido a su similitud morfológica y fisiológica. Sin embargo, investigaciones recientes han revelado que *A. awamori* puede ser considerado una especie críptica (oculta) dentro de *A. niger*. Esto significa que, aunque comparten muchas características, *A. awamori* podría ser una variación genética dentro de *A. niger*, no una especie completamente separada.

Perrone, Giancarlo et al. "Aspergillus niger contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*." *Fungal biology* vol. 115,11 (2011): 1138-50. doi:10.1016/j.funbio.2011.07.008

Prolongacion San Martin Q-3 Uchumayo - Arequipa - Peru
Sucursal: La Merced N° 125 Int. 125 Cercado - Arequipa
Telefono: +51-54-493007 www.adnuchumayo.com



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA DEL ADN UCHUMAYO E.I.R.L.

CEPA HH3:

>HH3 ITS1-F TRIM QUALITY: 20

```
ATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCACCCGTTTATTTT
ACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCGCTTAACCTGGCCGCCGGGGGCTTACG
CCCCGGGCGCGCCGCCGAAGACACCTCGAACTCTGTCTGAAGATT
GAAGTCTGAGTGAAAATATAAAATTTTAAACTTTCAACAACGGATCTC
TTGGTCCGGCATCGATGAAGAACGACGCGAAATGCGATACGTAATGTGA
ATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCT
GGTATTCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCC
GGCTTGTTGTTGGGCCCCGTCCCCGATCTCCGGGGGACGGGCCCGAAA
GGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACC
CGCTCTGTAGGCGCGCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCA
GGTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTTAAGC
```

IDENTIFICACIÓN

El análisis de comparación de la secuencia "ITS 1" con la base de datos de GenBank, mediante el software Blast, muestra una similitud de 100% con las especies:

Penicillium crustosum isolate P93A_R accession OR905645.1
 Penicillium commune strain H09-127 accession KC009833.1
 Penicillium sp. isolate OUCMDZ-5369 accession OR994070.1
 Penicillium christenseniae strain D63A2 accession PQ836312.1
 Uncultured Penicillium clone CEobese401 accession KC143756.1

Como se muestra en la siguiente tabla:

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 10

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
☒	Penicillium crustosum isolate P93A_R internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large	1002	1002	100%	0.0	100.00%	OR905645.1
☒	Penicillium crustosum isolate APC-10 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large	1002	1002	100%	0.0	100.00%	MW538312.1
☒	Penicillium commune strain H09-127 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete	1002	1002	100%	0.0	100.00%	KC009833.1
☒	Penicillium sp. isolate OUCMDZ-5369 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spa	1002	1002	100%	0.0	100.00%	OR994070.1
☒	Penicillium crustosum strain 80P.18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete	1002	1002	100%	0.0	100.00%	EU128607.1
☒	Penicillium commune strain GHAI68 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spa	1002	1002	100%	0.0	100.00%	KY174328.1
☐	Penicillium sp. isolate R2-001 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, co	1002	1002	100%	0.0	100.00%	PQ876694.1
☒	Penicillium crustosum isolate Rao18 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spa	1002	1002	100%	0.0	100.00%	PQ216307.1
☐	Penicillium crustosum strain CNU 6045 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, co	1002	1002	100%	0.0	100.00%	HQ225710.1
☒	Penicillium christenseniae strain D63A2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed sp	1002	1002	100%	0.0	100.00%	PQ836312.1
☒	Uncultured Penicillium clone CEobese401 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	1002	1002	100%	0.0	100.00%	KC143756.1
☒	Penicillium commune strain H09-118 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, com	1002	1002	100%	0.0	100.00%	KC009833.1

Prolongacion San Martin Q-3 Uchumayo - Arequipa - Peru
 Sucursal: La Merced N° 125 Int. 125 Cercado - Arequipa
 Telefono: +51-54-493007 www.adnuchumayo.com



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA DEL ADN UCHUMAYO E.I.R.L.

Cuando se hace un análisis filogenético escogiendo 10 especies con mayor similitud, el modelo de árbol “Fast Minimun Evolution” la secuencia evaluada presenta un mayor acercamiento a la especie *Penicillium crustosum* isolate P93A_R.

- *Penicillium crustosum* isolate P93A_R internal transcribed spa
- *Penicillium crustosum* isolate APC-10 internal transcribed spa
- *Penicillium commune* strain H09-127 18S ribosomal RNA ger
- *Penicillium* sp. isolate OUCMDZ-5369 small subunit ribosom
- *Penicillium crustosum* strain 86P 18S ribosomal RNA gene, ps
- *Penicillium commune* strain GHAIE86 small subunit ribosom
- *Penicillium* sp. isolate R2-001 small subunit ribosomal RNA g
- *Penicillium crustosum* isolate Rae18 small subunit ribosomal I
- *Penicillium christenseniae* strain D63A2 small subunit riboson
- Uncultured *Penicillium* clone CEobese401 18S ribosomal RN
- **HH3 ITS1-F TRIM QUALITY: 20**

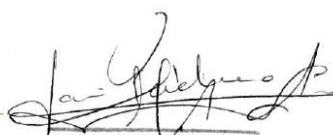
CONCLUSIONES

1. El Cultivo puro de hongo, con rotulo “HH3”, corresponde a *Penicillium crustosum*

COMENTARIO

While both *Penicillium crustosum* and *Penicillium commune* are species of the *Penicillium* genus, they differ significantly in their habitats, uses, and potential for causing harm. *Penicillium commune* is a common spoilage fungus, particularly in cheese, and is known for its role in cheese ripening. In contrast, *Penicillium crustosum* is more commonly found in soil and on decaying vegetation, and is known for producing potent neurotoxins, making it a concern for food safety Demjanová, S., Jevinová, P., Pipová, M., & Regecová, I. (2021). Identification of *Penicillium verrucosum*, *Penicillium commune*, and *Penicillium crustosum* Isolated from Chicken Eggs. *Processes*, 9(1), 53. <https://doi.org/10.3390/pr9010053>

Arequipa, 22 de Abril del 2025


Dra. Jani Pacheco Aranibar
GERENTE

