

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y**  
**BIOTECNOLÓGICAS**  
**PROGRAMA PROFESIONAL DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA**



***“EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE HONGOS XILÓFAGOS EN LA  
REMOCIÓN DE COLORANTES DE TINTORERIA DE TEXTILES  
CELULÓSICOS”***

***Tesis presentada por la bachiller:***

***Butrón Sevillano, María***

***Para obtener el Título Profesional de:***

***Ingeniera Biotecnóloga***

***Asesor:***

***Mgter. Fredy Molina Rodríguez***

Arequipa – Perú

2015

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento

A Dios, por bendecirme e iluminarme en los momentos más difíciles.

A mis padres y hermano, quienes me han motivado durante mi formación personal y gracias a su apoyo soy una profesional en este momento.

Al Ingeniero Fredy Molina y al Doctor Jaime Cárdenas, quienes me ofrecieron la posibilidad de desarrollar parte del Proyecto PIPEI 078-2013 el cual lleva por título “Desarrollo de un sistema para tratamiento de efluentes alcalinos del proceso de teñido textil mediante filtrado continuo de sólidos, neutralización de gases de chimenea y decoloración por acción bioquímica en la industria textil de la Región Arequipa”, desarrollado para FINCyT (Innovate Perú) entre las empresas Franky & Ricky y la Universidad Católica San Pablo.

A mis profesores de toda la carrera universitaria por brindarme conocimientos necesarios para ser una buena profesional.

Al Ingeniero Badhin Gómez quien me poyo incondicionalmente orientándome en el tema estadístico.

A mis compañeros y amigos del Instituto de Energía y Medio Ambiente de la Universidad Católica San Pablo por brindarme lo necesario para desarrollar mi tesis.

A mis compañeros del colegio y la Universidad por apoyarme en todo momento.

Al Director de la Universidad Amazónica de Madre de Dios por ayudarme con la recolección del material biológico.

## INDICE DE CONTENIDO

ABREVIATURAS .....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT .....	xiv
CAPITULO I.....	16
1. INTRODUCCIÓN .....	16
HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVOS .....	19
CAPITULO II .....	20
2. MARCO TEÓRICO .....	20
2.1 Colorantes de Efluentes Industriales .....	20
2.1.1 Características Físico-químicas .....	23
2.2 Impacto Ambiental De Los Colorantes Textiles .....	23
2.3 Legislación Ambiental .....	24
2.4 Mecanismos para la remoción de colorantes.....	27
2.4.1 Mecanismos químicos oxidativos para la remoción de colorantes .....	28
2.4.2 Mecanismos biológicos para a remoción y degradación de colorantes.....	32
2.4.2.1 Tratamientos Bacterianos.....	32
2.4.2.2 Tratamientos Fúngicos.....	34
2.4.2.3 Acción enzimática de los hongos de podredumbre blanca (Hongos xilófagos)40	
2.4.3 Características de los organismos a usar .....	46
2.4.3.1 Hongos de podredumbre blanca (Hongos Xilófagos) .....	46
2.5 Inmovilización.....	48
CAPITULO III.....	52
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	52
3.1 Lugar de Ejecución.....	52
3.2 Materiales .....	52
3.3 Metodología.....	54
3.3.1 Aislamiento de Hongos Xilófagos.....	54
3.3.1.1 Recolección de Hongos Xilófagos.....	54
3.3.1.2 Aislamiento de los Hongos Xilófagos en medio PDA .....	55

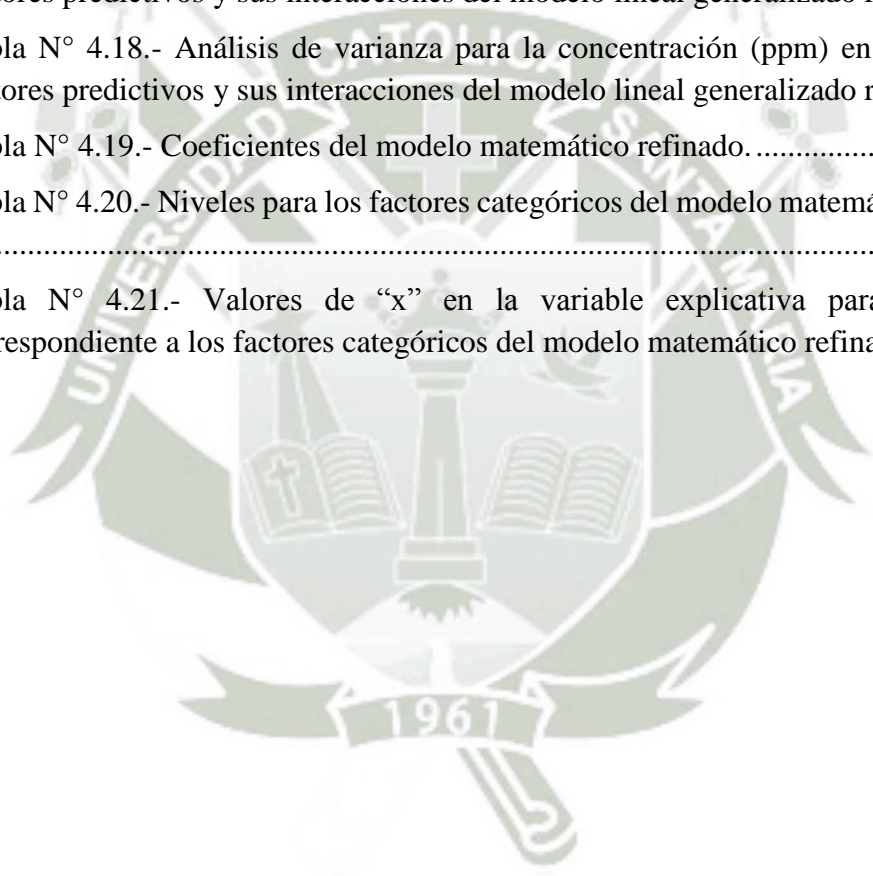
3.3.2	Selección e Identificación de Hongos Xilófagos a evaluar .....	56
3.3.2.1	Colorantes a usar .....	56
3.3.2.2	Selección de cepas para la evaluación .....	56
3.3.2.3	Caracterización e identificación de Hongos Xilófagos .....	57
3.3.3	Evaluación de la Espuma de Poliuretano como soporte de inmovilización... ..	57
3.3.3.1	Inmovilización del hongo xilófago en medio líquido .....	57
3.3.3.2	Cantidad de biomasa inmovilizada en espuma de Poliuretano .....	58
3.3.3.3	Selección de longitud de onda de mayor absorción para cada colorante. ..	58
3.3.3.4	Pruebas de Absorción de Espuma de poliuretano .....	59
3.3.4	Evaluación de la influencia de factores Aireación, pH, Temperatura, Airación y Cepa en medio líquido. ....	59
3.3.4.1	Concentración de colorante residual .....	63
3.3.5	Evaluación de la cinética de remoción de colorante .....	63
3.3.6	Desarrollo de modelo matemático para el sistema de remoción de colorante63	
CAPITULO IV .....		64
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	64
4.1	Aislamiento de Hongos Xilófagos.....	64
4.1.1	Recolección de Hongos Xilófagos.....	64
4.1.2	Aislamiento de los Hongos Xilófagos .....	65
4.2	Selección e Identificación de hongos xilófagos a evaluar .....	66
4.2.1	Colorantes a usar .....	67
4.2.2	Selección de cepas para la evaluación .....	67
4.2.3	Identificación de Hongos Xilófagos.....	78
4.3	Evaluación de la espuma de poliuretano como soporte de inmovilización. ..	79
4.3.1	Inmovilización de hongo xilófago en medio líquido .....	79
4.3.2	Selección de longitud de onda de mayor absorción para cada colorante .....	81
4.3.3	Pruebas de Absorción de Espuma de poliuretano .....	86
4.4	Evaluación de la influencia de los factores cepa, aireación, pH, colorante y temperatura sobre la remoción de colorantes .....	87
4.5	Evaluación de la cinética de remoción de colorantes .....	100
4.6	Definición de un modelo matemático para el sistema de remoción de colorantes.....	101

CAPITULO V .....	106
5. CONCLUSIONES .....	106
CAPITULO VI.....	108
6. RECOMENDACIONES.....	108
CAPITULO VII .....	109
7. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	109
CAPITULO VIII.....	115
8. ANEXOS .....	115
ANEXO N° 01. Hongos xilófagos sembrados en Medio PDA.....	115
ANEXO N° 02. Hongos Xilófagos en medio <i>Radha</i> con Colorante .....	118
ANEXO N° 03. Porcentaje Diario del crecimiento de Cepas fúngicas en medio Radha adicionado con colorantes textiles a dos concentraciones diferentes.....	120
ANEXO N° 04. Tablas de Absorbancia correspondiente a las curvas de calibración.....	126
ANEXO N° 05. Datos de absorbancia para seleccionar la máxima longitud de onda de cada colorante con respecto a los 3 pH. ....	127
ANEXO N° 06. Datos de absorbancia y concentraciones (ppm) para cada colorante – Remoción de colorante medio líquido .....	130
ANEXO N° 07. Evaluación de la influencia de factores cepa, aireación, ph, colorante y temperatura. Análisis multifactor categórico. ....	136
ANEXO N° 08.- DATOS ANOVA DEL MODELO LINEAL REFINADO.....	137

## INDICE DE TABLAS

Tabla N° 2.1.- Valores máximos admisibles para descargas al sistema de alcantarillado .....	25
Tabla N° 2.2.- Valores máximos admisibles para descargas al sistema de alcantarillado .....	26
Tabla N° 2.3.- Métodos químicos para la remoción de colorantes en aguas .....	28
Tabla N° 2.4. Métodos físicos para la remoción de colorantes en aguas.....	30
Tabla N° 2.5.- Microorganismos usados en la degradación de colorantes textiles....	36
Tabla N° 2.6.- Soportes usados en la inmovilización de microorganismos usados en procesos de biorremediación.....	49
Tabla N° 4.1.- Análisis de varianza para el crecimiento en placa de hongos xilófagos en medio de cultivo con Synozol Amarillo 1500 ppm al día 8.....	74
Tabla N° 4.2.- Análisis de varianza para el crecimiento en placa de hongos xilófagos en medio de cultivo con Synozol Amarillo 250 ppm al día 8.....	74
Tabla N° 4.3.- Análisis de varianza para el crecimiento en placa de hongos xilófagos en medio de cultivo con Synozol Rojo 1500 ppm al día 8.....	75
Tabla N° 4.4.- Análisis de varianza para el crecimiento en placa de hongos xilófagos en medio de cultivo con Synozol Rojo 250 ppm al día 8.....	75
Tabla N° 4.5.- Análisis de varianza para el crecimiento en placa de hongos xilófagos en medio de cultivo con Novacrom negro 1500 ppm al día 8. ....	75
Tabla N° 4.6.- Análisis de varianza para el crecimiento en placa de hongos xilófagos en medio de cultivo con Novacrom negro 250 ppm al día 8. ....	76
Tabla N° 4.7.- Crecimiento en placa de hongos xilófagos en medio de cultivo con diferentes concentraciones de colorante (Día 8) .....	77
Tabla N° 4.8.- Resumen de las máximas longitudes de onda para cada colorante ....	81
Tabla N° 4.9.- Pruebas de Absorción de espuma de Poliuretano por 7 días (Absorbancias) .....	87
<i>Elaboración Propia</i> .....	87
Tabla N° 4.10.- Pruebas de Absorción de espuma de Poliuretano por 7 días (ppm). 87	
<i>Elaboración propia</i> .....	87
Tabla N° 4.11. Factores y niveles considerados para la elaboración de la matriz factorial experimental en la evaluación de remoción de colorantes. ....	90

Tabla N° 4.12.- Matriz experimental desarrollada para la evaluación de la remoción de color por la cepa 15 y 32 independientemente.....	91
Tabla N° 4.13.- Concentraciones (ppm) medidas al séptimo día de evaluación de la Cepa 15 en condiciones controladas de laboratorio.....	92
Tabla N°4.14.- Concentraciones (ppm) medidas al séptimo día de evaluación de la Cepa 32 en condiciones controladas de laboratorio.....	93
Tabla N° 4.15. Análisis de varianza para la concentración (ppm) en base a cinco factores predictivos y sus interacciones .....	96
Tabla N° 4.16.- Análisis de varianza para el modelo lineal generalizado completo construido para Concentración (ppm).....	102
Tabla N° 4.17.- Análisis de varianza para la concentración (ppm) en base a cinco factores predictivos y sus interacciones del modelo lineal generalizado refinado...	102
Tabla N° 4.18.- Análisis de varianza para la concentración (ppm) en base a cinco factores predictivos y sus interacciones del modelo lineal generalizado refinado...	103
Tabla N° 4.19.- Coeficientes del modelo matemático refinado.....	103
Tabla N° 4.20.- Niveles para los factores categóricos del modelo matemático refinado.....	104
Tabla N° 4.21.- Valores de “x” en la variable explicativa para cada nivel correspondiente a los factores categóricos del modelo matemático refinado.....	105



## INDICE DE FIGURAS

Figura N° 2.1.- Estructura química del colorante reactivo Synozol yellow K-3RS. .	22
.....	22
Figura N° 2.2.- Estructura química del colorante reactivo Synozol red K-3BS .....	22
Figura N° 2.3.- Estructura química del colorante reactivo Negro Super Novacrom G.....	22
Figura N° 2.4.- Secuencia de eventos en un proceso de biotransformación bacteriana (Modificado de Barragán, 2004).....	33
Figura N° 2.5.- Esquema de Acción de la MnP. (Fernandez, et al 2007).....	42
Figura N° 2.6.- Esquema de acción de la LiP (Fernandez, et al 2007).....	43
Figura N° 2.7.- Esquema de acción de la enzima Lacasa (Fernandez, et al 2007) ....	46
Figura N° 3.1.- Diseño de matraz con 3 perforaciones en la tapa de caucho. ....	60
Figura N° 3.2.- Diagrama del sistema elaborado para la remoción de colorantes empleando las cepas 15 y 32 a temperatura ambiente .....	61
Figura N° 4.1.- Hongos xilófagos sobre un tronco con degradación de Lignina.....	65
Figura N° 4.2.- Crecimiento de Hongos de Podredumbre Blanca en medio sólido PDA; A) Cepa N°18; B) Cepa N°15.....	66
Figura N° 4.3.- Colorantes reactivos empleados en la evaluación de la remoción de colorantes .....	67
Figura 4.4.- Puntos de referencia en placa con medio radha con colorante.....	68
Figura N° 4.5.- Curvas de crecimiento en placa de hongos xilófagos con diferentes concentraciones de colorante como única fuente de carbono. En A) Synozol Amarillo 1500 ppm, B) Synozol Amarillo 250 ppm, C) Synozol Rojo 1500 ppm, D) Synozol Rojo 250 ppm, E) Novacrom negro 1500 ppm y F) Novacrom negro 250 ppm. ....	70
Figura N° 4.6.- Gráfico de medias para el crecimiento en placa de hongos xilófagos con Synozol Amarillo como única fuente de carbono (Día 8). En A) 1500 ppm, B) 250 ppm.....	71
Figura N° 4.7. Gráfico de medias para el crecimiento en placa de hongos xilófagos con Synozol Rojo como única fuente de carbono (Día 8). En A) 1500 ppm, B) 250 ppm.....	72
Figura N° 4.8.- Gráfico de medias para el crecimiento en placa de hongos xilófagos con Novacrom negro como única fuente de carbono (Día 8). En A) 1500 ppm, B) 250 ppm.....	73
Figura N° 4.9.- A) Hongo en habitat natural cepa N° 15, B) Hongo en habitat natural cepa N° 32.....	78

Figura N° 4.10.- A) Cepa N° 15 en medio sólido PDA, B) Cepa N° 32 en medio sólido PDA.....	79
Figura N° 4.11.- A) Inmovilización en espuma de poliuretano de las Cepas 15 y 32 en medio mineral adicionado con Sacarosa, B) Cepa Fúngica inmovilizada en espuma de poliuretano, C) Cuadradito de espuma de poliuretano de 0.018 g. ....	80
Figura N° 4.12.- Curva de Calibración para colorante Synozol Amarillo, $\lambda$ 415 nm para pH 6.....	82
Figura N° 4.13.- Curva de Calibración para colorante Synozol Amarillo, $\lambda$ 540 nm para pH 6.....	82
Figura N° 4.14.- Curva de Calibración para colorante Novacrom negro, $\lambda$ 595 nm para pH 6.....	83
Figura N° 4.15.- Curva de Calibración para colorante Synozol Amarillo, $\lambda$ 415 nm para pH 8.....	83
Figura N° 4.16.- Curva de Calibración para colorante Synozol Rojo, $\lambda$ 540 nm para pH 8.....	84
Figura N° 4.17.- Curva de Calibración para colorante Novacrom Negro, $\lambda$ 595 nm para pH 8.....	84
Figura N° 4.18.- Curva de Calibración para colorante Synozol Amarillo, $\lambda$ 415 nm para pH10.....	85
Figura N° 4.19.- Curva de Calibración para colorante Synozol Rojo, $\lambda$ 515 nm para pH 10.....	85
Figura N° 4.20.- Curva de Calibración para colorante Novacrom Negro, $\lambda$ 595 nm para pH 10.....	86
Figura N° 4.21.- Sistema de matraces para pruebas de decoloración (temperatura ambiente y a 35 °C (dentro de incubadora).....	88
Figura N° 4.22.- Matraces con sistema de aireación a 35°C.....	88
Figura N° 4.23.- Pellet en la base del tubo después de centrifugar.....	89
Figura N° 4.24.- Concentraciones medias para los diferentes niveles de cada factor en estudio sobre el crecimiento de hongos xilófagos. Se muestran los factores en A) Cepa, B) Aireación, C) Colorante y D) Temperatura.....	95
Figura N° 4.25. Concentraciones estimadas para los diferentes niveles de pH sobre el crecimiento de hongos xilófagos.....	96
Figura N° 4.26.- Gráfica de interacciones para la los factores Cepa - Aireación .....	97
Figura N° 4.27.- Gráfica de interacciones para los factores Cepa – Colorante .....	98
Figura N° 4.28.- Gráfica de interacciones para los factores aireación: pH.....	99

Figura N° 4.29.- Cambio de tonalidad para el color Synozol Amarillo; A) pH 6, B) pH 8, C) pH 10..... 100

Figura N° 4.30.- Expresión de la modelación matemática para la remoción del colorante Synozol Amarillo, empleando la Cepa N° 15 a un pH 6 sin aireación y a 35 °C. .... 101



## ABREVIATURAS

<b>µm</b>	: micrómetro
<b>µg/ml</b>	: microgramo por mililitro
<b>ADN</b>	: Ácido desoxirribonucleico
<b>ARN</b>	: Ácido ribonucleico
<b>BLAST</b>	: Basic Local Alignment Search Tool
<b>IEM</b>	: Instituto de Energía y Medio Ambiente
<b>gr</b>	: Gramo
<b>gr/L</b>	: Gramo por litro
<b>ml</b>	: mililitro
<b>°C</b>	: Grado Centígrado
<b>Cont.</b>	: Continuación
<b>LiP</b>	: Lignina Peroxidasa
<b>MnP</b>	: Manganeso Peroxidasa
<b>pb</b>	: pares de bases
<b>PCR</b>	: Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDA</b>	: Agar papa – dextrosa
<b>NCBI</b>	: Centro Nacional de información biotecnológica
<b>pH</b>	: Potencial de Hidrógeno
<b>PH.</b>	: Phanerochaete
<b>ppm</b>	: partes por millón
<b>psi</b>	: libra-fuerza por pulgada cuadrada
<b>TA</b>	: Temperatura Ambiente
<b>T.</b>	: Trametes
<b>UV</b>	: Ultravioleta
<b>VP</b>	: Versatil Peroxidasa

## RESUMEN

En los últimos cincuenta años la cantidad de empresas dedicadas al rubro de la producción de textiles se ha incrementado de manera notable. Dichas empresas emplean los tintes para impartir color a las fibras y de esta manera sacar su producto al mercado.

El gran problema que se viene dando en la actualidad es que dichos tintes presentan compuestos tóxicos con grupos cromóforos de alto peso molecular, los cuales al acumularse en lagos, bahías, provocan una disminución en la luminosidad de las aguas y en consecuencia inducen a la disminución de la actividad fotosintética lo que produce a su vez una disminución en el contenido de oxígeno disponible, favoreciendo procesos de eutroficación por el aumento de la carga orgánica.

Por otro lado las autoridades municipales u organismos de fiscalización ambiental cada vez son más estrictos con el tipo de efluente que las empresas textiles desechan, colocando elevadas multas al no cumplir con los parámetros estandarizados.

Es por eso que el presente trabajo tiene como objetivo evaluar el potencial de hongos xilófagos para la remoción de colorantes empleados en tintorería de textiles celulósicos.

Se recolectó hongos de la selva peruana en el departamento de Madre de Dios para después ser sembrados en placas con agar PDA. Luego de tener los hongos puros en las placas Petri con el medio sólido PDA se realizó una selección de las cepas que mejor toleran a los siguientes colorantes: Synozol Rojo, Synozol Amarillo y Novacrom Negro. Dichos colorantes fueron evaluados ya que son bastante usados en las empresas textiles de fibra celulósica.

Se colocaron dos concentraciones diferentes de cada colorante en medio sólido Radha modificado (*Radha, et al 2005*) (250 ppm y 1500 ppm). Se evaluó por 8 días teniendo como mejores cepas a la cepa 15 y cepa 32. Para cada cepa se realizó una caracterización fenotípica y molecular.

Posteriormente se identificó la influencia de los factores cepa, aireación, pH, colorante y temperatura sobre la remoción de colorantes empleados para teñir fibras celulósicas, se elaboró un sistema de matraces de 250 ml cada uno en donde se evaluaron ambas cepas, 3 pH (pH6, pH8, pH10), 2 temperaturas (Temperatura ambiente y 35 °C), 3 colorantes a 40 ppm (Synozol amarillo, Synozol rojo y novacrom negro) y aireación (con aireación, sin aireación).

Se empleó espectrofotómetro para que mediante absorbancias (evaluación colorimétrica) se demuestre que hay una decoloración. Este sistema se evaluó por 7 días.

Como última parte de este trabajo se realizó un análisis estadístico para concluir cuales son las mejores condiciones y obtener mejores resultados de decoloración. Así mismo se elaboró un modelo matemático para cada uno de las condiciones en el programa ORIGIN y un modelo matemático de todo el sistema en el programa Statgraphics Centurion XV.

De esta manera se tiene como base las mejores condiciones del sistema para poder desarrollar en un futuro un sistema a escala real y poder aplicarlo en empresas textiles.

**Palabras Claves:** *Hongos xilófagos, decoloración, colorantes.*

## ABSTRACT

In the last fifty years the number of companies dedicated to the heading of textile production has increased significantly. These companies employ dyes impart color to the fibers and thus get their product to market.

The big problem that has occurred today is that these dyes have toxic compounds with chromophores high molecular weight, which to accumulate in lakes, bays, causing a decrease in the brightness of the water and thus induce the decrease photosynthetic activity which in turn produces a decrease in available oxygen content, eutrophication processes favoring the increase of the organic load.

On the other hand the municipal authorities or environmental monitoring are increasingly stringent with the type of effluent discarded textile companies, placing heavy fines by not complying with the standard parameters.

That is why this study was to evaluate the potential of wood decay fungi for the removal of dyes used in dyeing of cellulosic textiles.

Peruvian jungle fungus was collected in the department of Madre de Dios and then be plated on agar PDA. Synozol Red, Yellow and Novacrom Synozol Black: After having pure fungus Petri dishes containing PDA solid medium selected strains that are more tolerant to these dyes was performed. Such dyes were evaluated as they are used in fairly cellulosic fiber textile companies.

Two different concentrations of each dye in solid medium modified Radha (250 ppm and 1500 ppm) were placed. It was evaluated for 8 days having as best strains to strain 15 and 32. Each strain strain phenotypic and molecular characterization was performed.

Subsequently the influence of strain factors, aeration, pH, and temperature on dye fading of dyes used for dyeing cellulosic fibers identified a system of 250 ml flasks each where both strains were evaluated pH 3 was prepared (pH6, pH8, pH10), 2

temperatures (room temperature 35 ° C), 3 to 40 ppm dye (Synozol yellow, red and black novacrom Synozol) and aeration (aeration, without aeration).

Spectrophotometer was used to that by absorbance can be demonstrated that there is a discoloration. This system was evaluated for 7 days.

As the last part of this work a statistical analysis was performed to conclude what the best conditions and best results of discoloration. Also a mathematical model for each of the conditions in the ORIGIN software and a mathematical model of the entire system in Centurion XV Statgraphics program was developed.

This way is based on the best conditions of the system to develop in the future a system to scale and can be applied in textile companies.

**Keywords:** *Fungi, discoloration, dyes.*

## CAPITULO I

### 1. INTRODUCCIÓN

Dentro de los compuestos xenobióticos, los colorantes son de gran importancia debido a que son ampliamente utilizados en diferentes industrias, como la textil. Los colorantes son usados para impartir color a una alta variedad de materiales y están divididos en dos grupos, los colorantes solubles en agua y los insolubles. Dichos colorantes están conformados por más de un compuesto; presentan un grupo de átomos responsables del color (cromóforos), entre ellos los grupos más comunes son azo ( $N=N-$ ), carbonilo ( $C=O$ ), metilo ( $-CH_3$ ), nitro y grupos quinoides. Los colorantes también pueden contener otros grupos que incrementen la intensidad del color y que pueden ser de tipo reactivo, ácidos, básicos, dispersos, aniónicos, sulfuros, entre otros.

Durante los procesos de teñido, se desechan ciertas cantidades de colorantes que son vertidos en las aguas residuales, presentando un problema ambiental, ya que este tipo de compuestos por ser complejos y de origen sintético no pueden eliminarse con los métodos de tratamiento convencionales, por ende, los sistemas de tratamiento que se aplican son basados en método físicos o químicos y son muy costosos ya que requieren de gran cantidad de energía y reactivos.

La presencia de colorantes en el agua no solamente es un problema estético, sino también interfiere en el proceso fotosintético que realizan algunos organismos.<sup>1</sup>

Existen diferentes tipos de procesos químicos y físicos para la remoción de estas sustancias, tales como ozonización, procesos oxidativos, procesos fotoquímicos, oxidación por hipoclorito de sodio, oxidación por curcubitúril, destrucción electroquímica, adsorción, tratamiento con carbón activado, membrana de filtración, intercambio iónico, irradiación, entre otros.

Es por eso que la biotecnología ofrece una alternativa de tratamiento mediante la biodegradación de los colorantes utilizando cultivos de organismos como hongos, bacterias, algas o levaduras los cuales están involucrados en el rompimiento del grupo funcional de la molécula y la transformación de los productos metabólicos resultantes. Así mismo puede emplearse la remediación enzimática.<sup>5</sup>

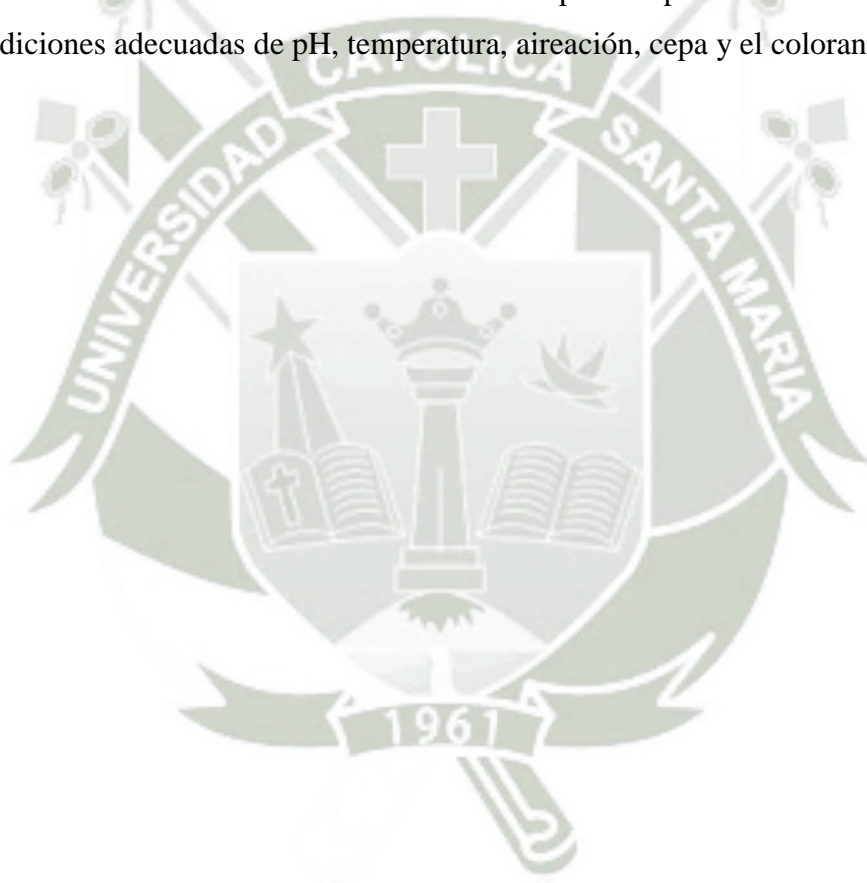
Los hongos de podredumbre blanca (hongos xilófagos) se han venido implementando desde los años 80's, gracias a que estos tienen la capacidad de degradar lignina, la cual es un polímero que posee una alta concentración de anillos aromáticos con alto grado de polimerización. El mecanismo enzimático se da por la acción de oxidasas y peroxidasas, estas enzimas no presentan una especificidad alta, por lo tanto pueden tener actividad sobre la estructura de diferentes sustratos fenólicos y azo.<sup>10</sup>

La eficiencia de los procesos de degradación realizada por microorganismos, se ve beneficiada por procesos de inmovilización, en donde se minimiza la pérdida de biomasa, se aumenta la actividad metabólica de los microorganismos inmovilizados y se aumenta la resistencia a la toxicidad que generan las sustancias a degradar; además de beneficiar procesos de adsorción secundarios<sup>11</sup>.

Durante este proyecto se evaluó la remoción de colorantes textiles de tipo reactivo empleados en los procesos de tintorería de textiles celulósicos empleando dos tratamientos fúngicos y controlando algunos parámetros como pH, temperatura y aireación. Los hongos se inmovilizaron en espuma de poliuretano y las cinéticas de degradación se realizaron en medios minerales sin ninguna fuente de carbono, para determinar cuál es el sistema de remoción de mayor eficiencia, bajo estas condiciones.

## HIPÓTESIS

Dado que se conoce que muchos hongos tienen alta actividad enzimática es posible que algunas especies de hongos xilófagos presentes en nuestro país presenten cierto potencial de remoción de colorantes textiles empleados para teñir fibra celulósica bajo condiciones adecuadas de pH, temperatura, aireación, cepa y el colorante a evaluar.



## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el potencial de hongos xilófagos para la remoción de colorantes empleados en tintorería de textiles celulósicos.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Aislamiento de Hongos Xilófagos con capacidad de remoción de colorantes textiles para teñir fibra celulósica.
- Selección e Identificación de hongos xilófagos en base a su capacidad de crecimiento en presencia de colorantes empleados para teñir fibra celulósica.
- Evaluación de espuma de poliuretano como soporte de inmovilización para hongos xilófagos.
- Evaluación de la influencia de los factores Cepa, Aireación, pH, colorante y Temperatura sobre la remoción de colorantes empleados para teñir fibras celulósicas.
- Evaluación de la cinética de remoción del mejor tratamiento empleado para la remoción de colorantes de fibras celulósicas.
- Desarrollo de un modelo matemático del sistema de remoción de colorantes utilizados en fibras celulósicas en base a los hongos xilófagos seleccionados.

## CAPITULO II

### 2. MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Colorantes de Efluentes Industriales

Se considera colorantes a las sustancias orgánicas fluorescentes o de color intenso que imparten color a una sustancia incolora, o bien, a un sustrato por medio de una absorción selectiva de luz <sup>1</sup>. Sus moléculas están constituidas por tres grupos funcionales, el cromóforo, que es el grupo responsable de la absorción de la luz, dándole la propiedad de color a la molécula (azo, carbonilo, metilo, nitro, etc) ; los auxocromos, que le dan afinidad por la fibra e intensifican el color (aminas, carboxilos, sulfonatos e hidroxilo); y por último el solubilizador, que le da afinidad a solventes diversos y está dado por la presencia de iones como  $-\text{SO}_3^-\text{Na}^+$ ,  $-\text{NH}_3^+\text{Cl}^-$ ,  $-\text{SO}_2\text{NH}_2^+$ ,  $-\text{O}^+\text{Na}^+$  <sup>2</sup>.

La coloración de aguas residuales se produce como consecuencia del proceso industrial de empresas de curtiembres, papeleras, alimentos (fermentaciones), y textileras, principalmente. De los colorantes utilizados en las textileras, un 20% es descartado directamente a los efluentes de agua, y el 10% de los colorantes es perdido durante el proceso de coloración textil <sup>3</sup>. Los colorantes de mayor uso en las textileras, con un 30% sobre el total, son colorantes de tipo azo, los cuales son usados para la coloración de las fibras de celulosa.

La razón por la cual estos colorantes son utilizados en las industrias, incluyen características como las diferentes tonalidades que pueden proporcionar, así como la gama de brillante que ofrecen, pueden ser utilizados en diferentes métodos de aplicación, y permiten una rápida humectación de la prenda <sup>3</sup>.

Los colorantes usados industrialmente poseen una compleja estructura química encontrando así a aquellos que contienen grupos azo, diazo, antraquinonas y complejos

metálicos, los cuales generalmente se aplican como mezclas. Según sus propiedades pueden ser clasificados como ácidos, básicos, dispersos, reactivos y directos <sup>3,4</sup>.

Entre los colorantes encontrados actualmente en la industria textilera (Celulosa) están:

- ✓ Drimarenes
- ✓ Levafix
- ✓ Novacrom
- ✓ Synozol

Los colorantes mencionados anteriormente pertenecen al grupo de los colorantes Reactivos, los cuales se sintetizan empleando un grupo cromóforo azoico o bien antroquinónico y tienen puntos de anclaje reactivos en la molécula, los que en presencia de álcali, forman un enlace covalente con la celulosa. Los grupos reactivos del colorante reaccionan con los grupos hidroxilos de la celulosa. Las fibras de algodón son su mayor empleo, aunque se han utilizado con éxito sobre fibras de poliamida y de lana.

Debido a su fuerte anclaje a la fibra tienen excelentes solidez. Los colores son muy brillantes y tienen una extensa paleta de colores.

El tipo de grupo reactivo presente en la molécula determina muchas de sus propiedades y las características de aplicación, como la temperatura, que a su vez es función de la reactividad química.

Así, tenemos colorantes de alta reactividad que se emplean a baja temperatura y de baja reactividad temperaturas mayores.

En la presente investigación se emplearán los siguientes colorantes: Synozol yellow K-3RS, Synozol red K-3BS y Negro Super Novacrom G, su estructura química de cada uno se muestra en las siguientes figuras.

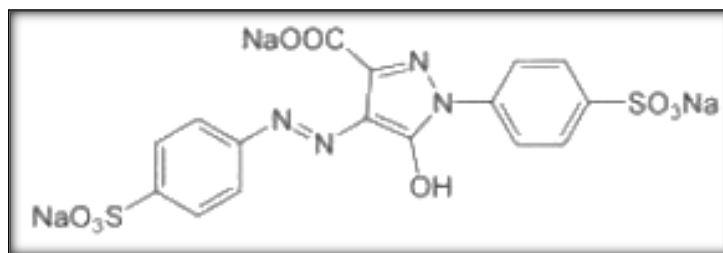


Figura N° 2.1.- Estructura química del colorante reactivo Synzol yellow K-3RS.

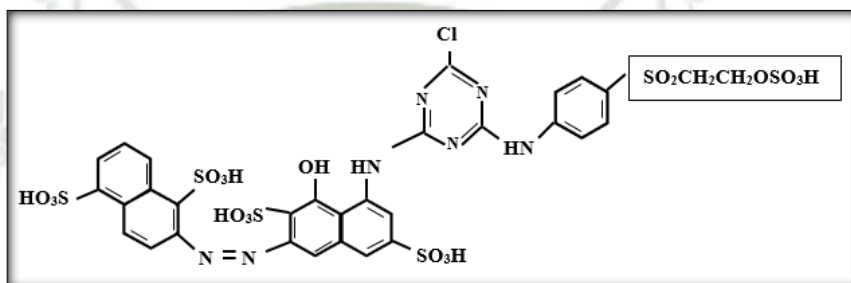


Figura N° 2.2.- Estructura química del colorante reactivo Synzol red K-3BS

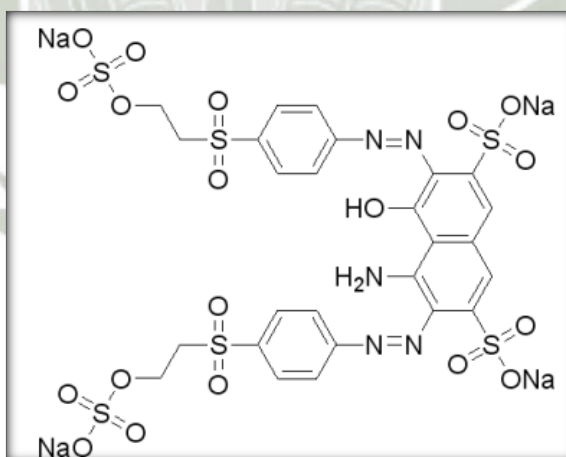


Figura N° 2.3.- Estructura química del colorante reactivo Negro Super Novacrom G.

### 2.1.1 Características Físico-químicas

Los colorantes utilizados en la actualidad poseen diversas estructuras, las cuales llegan a ser muy variadas y complejas. Su origen es sintético, muchos poseen una alta solubilidad en agua, son altamente resistentes a la acción de sustancias químicas y a algunos procesos físicos y son poco biodegradables.

Los colorantes textiles pueden ser clasificados de acuerdo a su aplicación a la fibra o por su constitución química. De acuerdo a su aplicación a la fibra pueden clasificarse en ácidos, básicos, directos, dispersos, mordientes, reactivos y a la tinta; esta clasificación se basa en las condiciones en las cuales se efectúa el proceso de tintura. La segunda clasificación se hace con base en el grupo cromóforo principal que constituye el colorante; el Color Index ( 4ta edición) usa la siguiente clasificación: Nitroso, nitro, azo, azoico, estilbeno, diarilmetano, triarilmetano, santeño, quinoleina, metino, acridina, azufre, tiazol, tiamina, indamina, azina, lactona, antraquinona, indigoide, ftalocianina.

Un 60% de los colorantes de uso en la industria textil actual son colorantes reactivos, que se caracterizan por formar una unión éter con la fibra, lo que garantiza una mayor duración del color en el tejido. Sus estructuras frecuentemente contienen grupos azo, antraquinona o ftalocianina.

## 2.2 Impacto Ambiental De Los Colorantes Textiles

Los colorantes son compuestos químicos xenobióticos, los cuales no se encuentran en forma natural en la biosfera, sino que han sido sintetizados por el hombre <sup>1</sup>. Por la complejidad estructural que presentan, las plantas de tratamiento convencionales tienen un bajo porcentaje de remoción de estos, razón por la cual son vertidos sin ser tratados <sup>5</sup>.

De esta forma los dichos efluentes provocan diferentes impactos sobre el medio ambiente, encontrando así variaciones en las aguas en cuanto a sólidos suspendidos, carga iónica, toxicidad, concentración de oxígeno disuelto y color <sup>4</sup>.

Adicionalmente, estudios anteriores han reportado que estos colorantes pueden contener sustancias como ácido benzoico y ácido acetilsalicílico, las cuales pueden inducir alergias y reacciones asintomáticas en personas sensibles <sup>8</sup>. De igual forma encontramos que algunos de estos productos pueden ser carcinogénicos <sup>6,7</sup>.

El color pocas veces es considerado un contaminante, pese a que puede estar asociado a presencia de compuestos tóxicos y grupos cromóforos o polímeros de alto peso molecular como la lignina <sup>4</sup>. Estos efluentes coloreados, poseen una alta capacidad de bioacumulación, y una baja velocidad de despolimerización, permitiendo que a largo plazo se acumule en lugares como lagos y bahías, provocando una disminución del poder absorbente del agua y por ende una disminución en la actividad fotosintética de los organismos presentes en dichos ecosistemas, disminuyendo el Oxígeno Disuelto (OD) en el agua <sup>4</sup>.

### **2.3 Legislación Ambiental**

En nuestro país no existe una normatividad que regule la cantidad de color en los efluentes provenientes de las industrias principalmente la textil que es una de las que más genera efluentes coloreados. A pesar de eso existe una preocupación por eliminar el color de las aguas pues su presencia crea afectos adversos a los ecosistemas acuáticos principalmente.

En el Perú la manera de controlar y fiscalizar a las empresas que descargan aguas residuales no domesticas es mediante los valores Máximos Admisibles ( VMA) según Resolución Ministerial N° 021-2009- Vivienda ( Resolución actualizada es R.M. 0116-2012-Vivienda) en el cual se aprueban los valores Máximos Admisibles de las descargas de aguas residuales no domésticas en el sistema de alcantarillado sanitario, a fin de evitar el deterioro de las instalaciones, infraestructura sanitaria, maquinarias, equipos y asegurar su adecuado funcionamiento, garantizando la sostenibilidad de los sistemas de alcantarillado y tratamiento de las aguas residuales.

Los VMA, son aplicables en el ámbito nacional y son de obligatorio cumplimiento para todos los usuarios que efectúen descargas de aguas residuales no

domésticas en el alcantarillado sanitario; su cumplimiento es exigible por las entidades prestadoras de servicios de saneamiento (SEDAPAL)

Se entiende por Valores Máximos Admisibles ( VMA), como aquel valor de la concentración de elementos, sustancias o parámetros físicos y/o químicos, que caracterizan a un efluente no doméstico que va a ser descargado a la red de alcantarillado sanitario, que al ser excedido en sus parámetros aprobados ( Tabla N° 2.1 y Tabla N° 2.2) causa daño inmediato o progresivo a las instalaciones, infraestructura sanitaria, tratamiento de aguas residuales y tiene influencias negativas en los procesos de tratamiento de aguas residuales.

**Tabla N° 2.1.- Valores máximos admisibles para descargas al sistema de alcantarillado**

Parámetro	Unidad	Expresión	VMA para descargas al sistema de alcantarillado
Demanda Bioquímica de Oxígeno	mg/L	DBO <sub>5</sub>	500
Demanda Química de Oxígeno	mg/L	DQO	1000
Sólidos Suspendidos Totales	mg/L	S.S.T.	500
Aceites y Grasas	mg/L	A y G	100

Fuente: D.S. N° 021-2009-VIVIENDA (VMA)

**Tabla N° 2.2.- Valores máximos admisibles para descargas al sistema de alcantarillado**

<b>Parámetro</b>	<b>Unidad</b>	<b>Expresión</b>	<b>VMA para descargas al sistema de alcantarillado</b>
Aluminio	mg/L	Al	10
Arsénico	mg/L	As	0.5
Boro	mg/L	B	4
Cadmio	mg/L	Cd	0.2
Cianuro	mg/L	CN	1
Cobre	mg/L	Cu	3
Cromo hexavalente	mg/L	Cr <sup>+6</sup>	0.5
Cromo total	mg/L	Cr	10
Manganeso	mg/L	Mn	4
Mercurio	mg/L	Hg	0.02
Níquel	mg/L	Ni	4
Plomo	mg/L	Pb	0.5
Sulfatos	mg/L	SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	500
Sulfuros	mg/L	S <sup>-2</sup>	5
Zinc	mg/L	Zn	10

*Fuente: D.S. N° 021-2009-VIVIENDA (VMA)*

*Cont. Tabla N° 2.2-. Valores máximos admisibles para descargas al sistema de alcantarillado*

Parámetro	Unidad	Expresión	VMA para descargas al sistema de alcantarillado
Nitrógeno amoniacal	mg/L	NH <sup>4+</sup>	80
pH		pH	6-9
Sólidos sedimentables	mL/h	S.S	8.5
temperatura	C°	T	<35

*Fuente: D.S. N° 021-2009-VIVIENDA (VMA)*

#### 2.4 Mecanismos para la remoción de colorantes

Los colorantes textiles tienen gran persistencia en el ambiente, y los métodos de eliminación clásicos no son útiles debido a que oxidaciones o reducciones parciales pueden generar productos secundarios altamente tóxicos <sup>4,9</sup>.

Los métodos actualmente utilizados incluyen procesos físicos, químicos y biológicos. Para el tratamiento de aguas residuales con colorantes, se han utilizado varias metodologías tales como adsorción, neutralización, coagulación, degradación química y degradación fotocatalítica, ozonización, filtración por membranas e intercambio iónico. A pesar de que estos procesos físicos y químicos producen efluentes de buena calidad, en la mayoría de las ocasiones generan un alto costo, y pueden generar subproductos aún de mayor toxicidad, razones por las cuales se han estudiado con interés los procesos biológicos.

### 2.4.1 Mecanismos químicos oxidativos para la remoción de colorantes

Es el método químico más frecuente gracias a su simplicidad en la aplicación. El agente oxidante más utilizado es peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el cual necesita ser activado por diferentes factores como por ejemplo la luz UV, de esta forma los métodos de decoloración varían de acuerdo al método por el cual sea activado el peróxido. Una vez realizado el proceso de oxidación dará como resultado un anillo aromático clivado de la estructura molecular del colorante <sup>10</sup>.

A continuación en la Tabla N° 2.3 se muestra algunos métodos químicos para la remoción de colorantes en aguas.

**Tabla N° 2.3.- Métodos químicos para la remoción de colorantes en aguas**

Nombre del Método	Característica del Proceso	Ventajas y Desventajas	Referencia
Reactivo Fenton	Tratamiento para aguas con biomasa viva. Uso de combinación de peróxido de hidrógeno y sulfato ferroso, presión y temperatura.	Produce cambio estructural de compuestos orgánicos, disminuye toxicidad. Producción de floculantes no deseados	Martinez, et al 2001 Robinson, et al. 2001
Ozonización	Oxidación de hidrocarburos, fenoles, pesticidas y aromáticos por medio de ozono.	Decoloración de efluente. Genera compuestos secundarios tóxicos, posee corto periodo de reacción	Robinson, et al 2001

*Tabla elaborada por Garzón Jiménez, 2009*

*Cont. Tabla N° 2.3.- Métodos químicos para la remoción de colorantes en aguas*

<b>Nombre del Método</b>	<b>Característica del Proceso</b>	<b>Ventajas y Desventajas</b>	<b>Referencia</b>
Fotoquímicos	Degradación de colorantes por tratamiento con rayos UV, en presencia de peróxido de hidrógeno.	Oxidación de material orgánico, reducción de olores y ausencia de lodos. Altos costos.	Robinson, et al 2001
Hipoclorito de sodio	Ataca por medio del cloro el grupo amino del colorante.	No apto para colorantes dispersos. Producción de aminas aromáticas	Robinson, et al 2001
Curcubituril	Permite procesos de adsorción de los colorantes.	Remoción del colorante. Alto costo	Robinson, et al 2001
Destrucción electroquímica	Degradación de colorantes por tratamiento electroquímico.	No consumo de químicos, ni producción de lodos, alta afinidad para degradación de sustancias recalcitrantes.	Robinson, et al 2001

*Tabla elaborada por Garzón Jiménez, 2009*

En la siguiente Tabla N° 2.4 se muestra algunos métodos físicos para la remoción de colorantes en aguas.

**Tabla N° 2.4. Métodos físicos para la remoción de colorantes en aguas**

<b>Nombre del Método</b>	<b>Característica del Proceso</b>	<b>Ventajas y Desventajas</b>	<b>Referencia</b>
Adsorción	Decoloración por adsorción e intercambio iónico con el colorante	Eficiencia solo bajo condiciones específicas de temperatura, pH, etc.	Robinson, et al 2001
Turba	Decoloración por adsorción del colorante	No necesita activación y posee bajos costos. Puede ser reutilizada.	Robinson, et al 2001
Viruta	Decoloración por adsorción del colorante	No es tan eficiente como otros sorbentes. Se necesitan repetidos tiempos de contacto.	Robinson, et al 2001
Carbón y Cenizas	Decoloración por adsorción del colorante	Alta superficie de adsorción	Robinson, et al 2001
Gel de Silicona	Remoción de colorantes básicos por adsorción.	No tiene la misma eficiencia con todos los colorantes.	Robinson, et al 2001
Materiales orgánicos	Decoloración por adsorción del colorante.	Bajo costo, fácil regeneración, utilización posterior.	Robinson, et al 2001

*Tabla elaborada por Garzón Jiménez, 2009*

*Cont. Tabla N° 2.4.- Métodos físicos para la remoción de colorantes en aguas*

<b>Nombre del Método</b>	<b>Característica del Proceso</b>	<b>Ventajas y Desventajas</b>	<b>Referencia</b>
Membranas de filtración	Clarifica, concentra y separa los colorantes del efluente de manera constante.	Resistencia a temperatura, ambientes químicos y ataque microbiano. Residuos secundarios, tapnamiento de filtro, no reutilización.	Robinson, et al 2001
Irradiación	Rompimiento de moléculas por acción de la irradiación.	Altas concentraciones de OD constantemente. Alto costo	Robinson, et al 2001
Coagulación electrocinética	Remoción de colorantes por adición de sulfato ferroso y cloruro férrico.	Baja remoción de colorantes ácidos, altos costos.	Robinson, et al 2001

*Tabla elaborada por Garzón Jiménez ,2009*

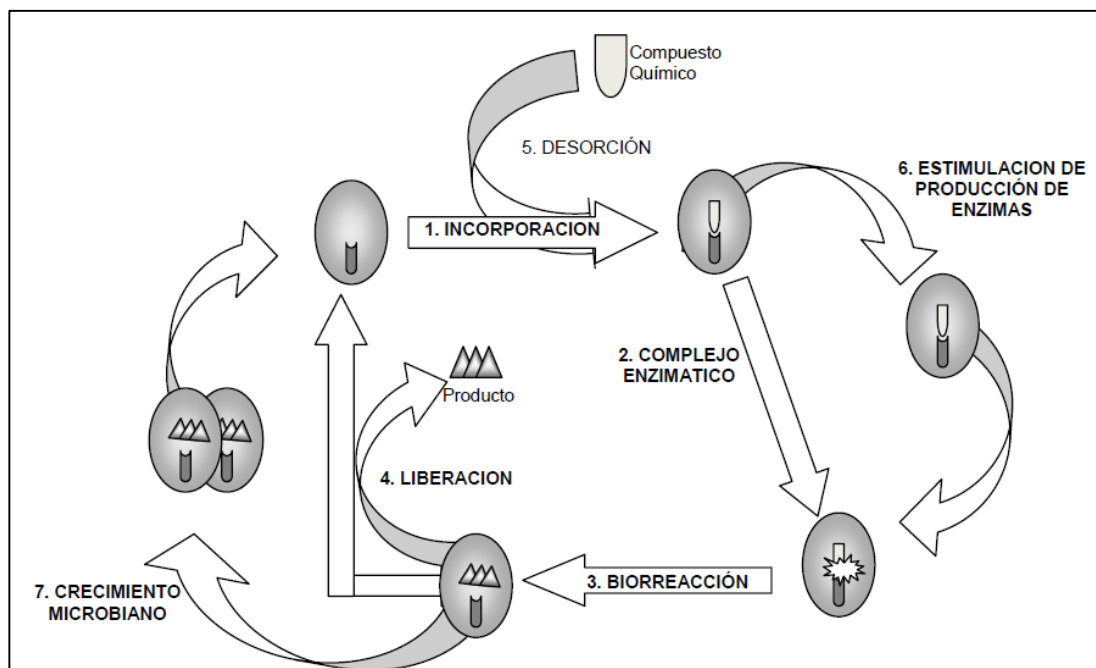
## 2.4.2 Mecanismos biológicos para a remoción y degradación de colorantes

La biorremediación es el proceso mediante el cual desechos peligrosos son convertidos biológicamente en compuestos inofensivos, o por lo menos son disminuidos sus niveles de toxicidad <sup>11</sup>.

Los tratamientos biológicos han sido reconocidos como métodos efectivos para el tratamiento de decoloración y degradación de colorantes en aguas residuales industriales altamente contaminadas, adicionalmente se considera muy efectivo ya que es considerado un tratamiento amigable con el medio ambiente, de baja producción de lodos y competitivo en cuanto a los costos requeridos <sup>12</sup>. Actualmente son utilizados sistemas aerobios y anaerobios, con hongos y bacterias para la decoloración y mineralización de los colorantes presentes en dichas aguas <sup>13</sup>. Durante estos tratamientos bióticos, los contaminantes pueden ser metabolizados por los microorganismos por reacciones bioquímicas redox, aunque también pueden realizar reacciones de hidroxilación, hidrólisis, des-halogenación y desalquilación.

### 2.4.2.1 Tratamientos Bacterianos

El desarrollo de procesos en Biotecnología encaminados hacia la decoloración de efluentes industriales, buscan obtener como meta principal, la remoción de un amplio espectro de colorantes, así como un alto porcentaje de degradación y decoloración <sup>14</sup>. Algunos factores ambientales pueden influenciar en la decoloración de las aguas residuales, tales como pH, temperatura y cantidad de oxígeno disponible en el medio, ya que a ciertas condiciones, las moléculas de los colorantes se pueden descomponer en compuestos de bajo peso molecular <sup>13</sup>. De esta forma podemos encontrar biotransformación de tipo aerobia o anaerobia.



**Figura N° 2.4.- Secuencia de eventos en un proceso de biotransformación bacteriana (Modificado de Barragán, 2004).**

Durante el proceso de Biotransformación, las enzimas con poder reductor que se encuentran en células bacterianas, se unen con el compuesto químico para formar un complejo, (1), (2), el cual al reaccionar (3) produce derivados que pueden ser liberados extracelularmente (4). Algunos procesos pueden influenciar en la velocidad de la reacción como la disponibilidad del compuesto (5), la capacidad enzimática del microorganismo por cambios genéticos (6) y el crecimiento de la población bacteriana que lleva a cabo la biotransformación (7) <sup>15</sup>.

Algunos colorantes no pueden ser degradados totalmente bajo condiciones aeróbicas, por lo cual es necesario emplear métodos anaeróbicos y aeróbicos; un ejemplo de esto son los colorantes tipo diazo, los cuales son reducidos por métodos anaeróbicos cuyo resultado es la producción de aminas aromáticas, las cuales solo pueden ser degradadas bajo condiciones aeróbicas, por lo cual es necesario la de los dos sistemas, De no producirse una degradación completa estas aminas aromáticas pueden causar un daño superior al producido por los colorantes, ya que se

ha reportado que poseen propiedades carcinogénicas o pueden crear mutaciones en los núcleos de células intestinales de animales.

La biodegradación de colorantes por bacterias, se da por la presencia de enzimas con poder reductor. Estas enzimas actúan de forma más efectiva en condiciones medioambientales específicas como temperaturas de 30-40 °C, pH de 7-8, aireación, agitación, entre otras <sup>16</sup>.

Se ha demostrado el poder de las enzimas reductasas, como las azo. Reductasas, para degradar compuestos con enlaces tipo azo, mejor que algunas enzimas oxidasas (Lacasa, MnP). En la degradación de compuestos tipo azo, uno de los factores limitantes más importantes es la permeabilidad que presenta la célula, razón por la cual la degradación del colorante se da por enzimas extracelulares <sup>17,18</sup>.

A continuación en la Tabla N° 2.5 se muestran algunos ejemplos de organismos como hongos o bacterias los cuales han sido estudiados desde hace décadas para la remoción o degradación de algunos colorantes empleados en el proceso de tintura de las prendas en textileras.

#### **2.4.2.2 Tratamientos Fúngicos**

Los hongos son organismos muy comunes en la naturaleza, puesto que viven prácticamente en todos los medios <sup>19</sup>. Son organismos eucariotas cuyas células contienen mitocondrias, un núcleo bien definido y otros organelos rodeados de membrana, carecen de clorofila y cloroplastos, por lo que no fotosintetizan. Las células de los hongos están rodeadas de paredes celulares constituidas por quitina, un polímero que consiste en subunidades de un azúcar nitrogenado y es el componente más resistente que la celulosa a la degradación por microorganismos. Los hongos secretan enzimas digestivas y después absorben al alimento predigerido a través de su pared celular y membrana plasmática <sup>20</sup>.

La mayoría de los hongos están constituidos por finas fibras que contienen protoplasma, llamadas hifas, Estas a menudo están divididas por tabiques

llamados septos. En cada hifa hay uno o dos núcleos y el protoplasma se mueve a través de un diminuto poro que ostenta el centro de cada septo, también existen hifas llamadas cenocíticas porque no se dividen en células individuales, sino que tienen el aspecto de una célula gigante multinucleada alargada. La proliferación de hifas, resultante de este crecimiento, se llama micelio.

Los hongos se desarrollan mejor en hábitats oscuros y húmedo, requieren humedad y pueden obtener agua de una atmósfera húmeda así como del medio en que viven, Cuando el ambiente se toma demasiado seco, los hongos sobreviven entrando en una fase latente o produciendo esporas resistentes a la desecación. El pH óptimo para ellos es de 6, sin embargo algunos hongos toleran ambientes con pH 2 a 9 y pueden desarrollarse en soluciones salinas concentradas, o en soluciones azucaradas como jalea, que dificultan o impiden la proliferación de bacterias. Los hongos prosperan a un amplio intervalo de temperatura.

Los hongos se reproducen por medio de esporas microscópicas, que carecen de flagelos y son estructuras reproductivas inmóviles, dispersadas por el viento o por animales. Suelen tener hifas aéreas en contacto con la atmósfera, lo que permite que sean llevadas por el viento a nuevas zonas. En algunos hongos las hifas aéreas forman estructuras grandes y complejas en las cuales se producen esporas. Estas estructuras se denominan cuerpos fructíferos o esporocarpos.<sup>20</sup>

Los hongos pueden producir esporas de manera sexual o asexual. Las células fungales por lo general poseen núcleo haploide. En la reproducción sexual, las hifas de dos tipos de apareamiento genéticamente distinto se reúnen y sus núcleos se fusionan, formando un cigoto diploide. En dos grupos de hongos (ascomicetos y basidiomicetos), las hifas se fusionan pero los dos núcleos distintos no se fusionan de inmediato, si no que permanecen separados dentro del citoplasma fungal. Cuando la espora fungal entra en contacto con una fuente de alimento adecuada, germina y comienza a desarrollarse. Una hifa filiforme emerge de la diminuta espora y crece, ramificándose con frecuencia.<sup>19,20</sup>

Tabla N° 2.5.- Microorganismos usados en la degradación de colorantes textiles.

Microorganismo	Sustancia degradada	Referencia
Bacterias Sulfato reductoras	Colorante azo terasil disperso	<i>Guerrero, et al.</i>
Consorcio bacteriano	Colorante azo Amarillo 3	<i>Haug, et al, 1991</i>
Enterobacterias	Colorantes poliméricos tipo azo y nitro	<i>Brown, J. 1981</i>
SpHingomonas sp. BN6	Colorantes tipo azo	<i>Russ, et al, 2000.</i>
Bacillus sp.	Colorantes tipo azo	<i>Maier, et al, 2004</i>
Clostridium perfringens, C.Paraputrificum	Azul directo 15	<i>Rafii, et al., 1990</i>
Klebsiella pneumoniae RS-13 Acetobacter liquefaciens S-1	N,N'-dimetil-p-fenildiamina	<i>Wong, P. &amp; Yuen, P., 1998</i>
Streptomyces spp., PHanerochaete chrysosporium.	Colorantes tipo azo	<i>Pasti-Grigsby, et al., 1992</i>
Streptomyces chromofuscus, PHanerochaete chrysosporium.	Colorantes tipo azo	<i>Paszczynski, et al., 1992</i>
Consorcio Bacteriano	Colorantes tipo trifenilmetano	<i>Schluter, et al., 2007</i>

Tabla elaborada por Garzón Jiménez, 2009

*Cont. Tabla N° 2.5.- Microorganismos usados en la degradación de colorantes textiles.*

<b>Microorganismo</b>	<b>Sustancia degradada</b>	<b>Referencia</b>
Aeromonas hydrophila	Colorantes tipo azo, antraquinona y trifenilmetano.	<i>Ren, et al., 2006</i>
Bacteria no identificada KMK 48	Colorantes sulfonatados tipo azo	<i>Kodam, et al., 2005</i>
SpHingomonas xenophaga	1-aminoantraquinona – 2-ácido sulfónico (ASA – 2)	<i>Lu, et al., 2007</i>
Paenibacillus larvae	Colorante Índigo	<i>Ramya, et al., 2008</i>
Aeromonas hydrophila	Colorantes tipo azo	<i>Gonzales, et al., 2008</i>
Citrobacter sp.	Colorantes tipo azo y trifenilmetano	<i>Sun – Young, et al., 2002</i>
Bacillus cereus.	Colorantes tipo azo e indigoide	<i>Pricelius, et al., 2007</i>
Consortio Bacteriano	Colorantes textiles tipo reactivo y disperso	<i>Asgher, et al., 2007</i>
Consortio bacteriano	Rojo de metilo	<i>Vijaya, P. &amp; Sandhya, S., 2003</i>
Bacterias sulfato reductoras	Colorantes básicos	<i>Quezada, et al., 2000</i>
Consortio bacteriano	Azul disperso	<i>Cruz y Buitron, 2000</i>

*Tabla elaborada por Garzón Jiménez, 2009*

*Cont. Tabla N° 2.5.- Microorganismos usados en la degradación de colorantes textiles.*

<b>Microorganismo</b>	<b>Sustancia degradada</b>	<b>Referencia</b>
Aspergillus niger	Verde básico 4	<i>Anjaneyulu &amp; Hima, 1997</i>
Trametes sp.	Colorantes sintéticos	<i>Anjaneyulu &amp; Hima, 1997</i>
Funalia troji	Rojo Astrozon	<i>Yashilada, et al., 2002</i>
Pseudomonas sp.	Verde básico 4	<i>Mali, et al., 2000</i>
Kurthia sp.	Verde básico 4	<i>Singh, et al., 1999</i>
Shingomonas xenopHaga	Antraquinoide	<i>Gonzales, et al., 2007</i>
PHanerochaete chrysosporium	Verde ácido 20	<i>Sani, et al., 1999</i>
Cyathus sp.	Colorante trifenil metano	<i>Vasdev, et al., 1995</i>
PHanerochaete chrysosporium	Colorante tipo azo	<i>Spadaro, et al., 1992</i>
Trametes hirsuta	Colorantes tipo básico, disperso y antraquinoide	<i>Abadulla, et al., 2000</i>
PHanerochaete chrysosporium	Rojo Congo y Verde básico 4	<i>Ollikka, et al., 1993</i>

*Tabla elaborada por Garzón Jiménez, 2009*

*Cont. Tabla N° 2.5.- Microorganismos usados en la degradación de colorantes textiles.*

<b>Microorganismo</b>	<b>Sustancia degradada</b>	<b>Referencia</b>
Dichamitus scqualens, I. Flavus, PH. Crysosporium, PHlebia fascicularia	Rojo reactivo ( diazo)	<i>Chander, et al., 2004</i>
T. Versicolor	NR5, Azul novatic B	<i>Keharia, et al., 2002</i>
T. Versicolor	Colorante antraquinoide	<i>Guo, et al., 2008</i>

*Tabla elaborada por Garzón Jiménez ,2009*

Los Hongos poseen una capacidad para degradar compuestos aromáticos complejos, como parte de su metabolismo natural, participan en la degradación de diversos compuestos xenobióticos, incluyendo los colorantes sintéticos usados en la industria. Muchos basidiomicetos y ascomicetos han sido usados en la decoloración de colorantes. Esto puede deberse a que los filamentos fúngicos, son menos sensibles a variaciones en temperatura, pH, nutrientes y aireación <sup>13</sup> adicionalmente gracias a su alta tasa metabólica y a su rápida colonización de superficies que permite un crecimiento rápido sobre un soporte si se desea movilizar.

La lignina es un biopolímero aromático complejo; es el segundo polímero en abundancia después de la celulosa, constituye cerca del 15% de la biomasa terrestre y su fuente natural es la madera, donde se encuentra en una proporción del 20% al 35%.

Solamente un pequeño número de microorganismos son responsables de la biodegradación de la lignina, el grupo más importante lo constituye los hongos de podredumbre blanca. El sistema enzimático extracelular de estos organismos, se basa fundamentalmente en la producción de radicales libres, permitiendo que las enzimas sean catalíticamente activas sobre diversos sustratos orgánicos. Las enzimas más

significativas son las Lacasas, Lignino Peroxidasa (LiP), Manganese Peroxidasa (MnP) y Veratril Peroxidasa (VP), que tienen una potente capacidad oxidante <sup>20,21</sup>.

Gracias a la gran cantidad de compuestos xenobióticos que pueden ser degradados por estos hongos, se les ha dado un muy importante lugar en procesos de biorremediación. Estos hongos tienen la capacidad de degradar sustancias como diocinas, biofenilos policlorinados (PCBs), hidrocarburos policíclicos aromáticos, plaguicidas clorados y organofosfatados, entre otras <sup>10</sup>. La acción de estos hongos sobre los colorantes se basa en la no especificidad del sistema enzimático para despolimerizar y mineralizar la lignina.

Algunos de los hongos de podredumbre usados son: *PHanaerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Hirschioporus larincinus*, *Inonotus hispidus*, *PHlebia tremellosa*, *Coliurus versicolor*, *Aspergillus sp.* entre otros <sup>10</sup>.

#### **2.4.2.3 Acción enzimática de los hongos de podredumbre blanca (Hongos xilófagos)**

Durante los setenta, se descubrió la acción de diversas enzimas extracelulares capaces de realizar la ruptura oxidativa de anillos aromáticos, en presencia de peróxido de Hidrógeno. Estas enzimas compartían características con las hemoproteínas transportadoras de oxígeno y eran peróxidasas y fueron denominadas Manganese Peroxidasa y Lignina Peroxidasa.

Pocos años atrás se descubrió una MnP versátil (VP) en los géneros *Pleurotis* y *Bjerkandera*. Esta enzima conjuga las propiedades catalíticas de LiP y MnP <sup>21</sup>.

Existe una cuarta enzima, fenol oxidasa, la cual tiene la capacidad de reducir el oxígeno molecular a agua y es capaz de oxidar compuestos no fenólicos de la lignina, en presencia de compuestos redox <sup>21</sup>.

Estas enzimas lignolíticas pueden actuar separadas o en cooperación, dependiendo de si el hongo es capaz de producir una o más <sup>21</sup>.

Además de estos sistemas enzimáticos, se ha considerado que la participación de compuestos de bajo peso molecular es también esencial en la degradación de lignina.

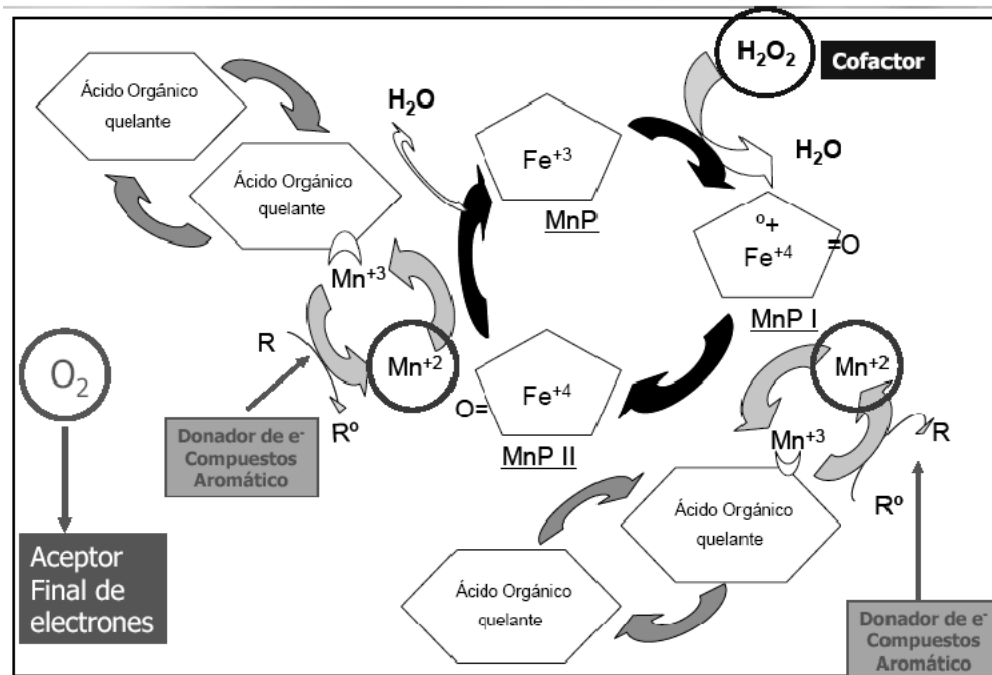
Esto se postula debido a que la lignina en su estado natural es inaccesible para enzimas tales como la LiP y MnP. Entre los cofactores importantes para la transformación de la lignina se encuentran el manganeso, el alcohol veratrílico, el oxalato y el 2-coro-1,4-dimetoxibenceno <sup>21</sup>.

La enzima manganeso peroxidasa (MnP) es una hemoproteína que cataliza la oxidación de  $Mn^{+2}$  a  $Mn^{+3}$ , la cual es dependiente de  $H_2O_2$ .

El  $Mn^{+3}$ , es quelado por diferentes ácidos orgánicos como glicolato u oxalacetato, y puede oxidar a una amplia variedad de compuestos fenólicos, entre ellos a los anillos aromáticos de los colorantes azo. El centro activo de la enzima es oxidado por el peróxido de hidrógeno, para generar un intermediario deficiente de un par de electrones, conocidos como el componente I. Dicho componente puede ser reducido ya sea por  $Mn^{+2}$  o por sustratos fenólicos, generando el componente II. El ciclo es completado cuando el componente II gana un electrón, produciendo que la enzima detenga su actividad.

La MnP es específica en sus sustratos y solamente el  $Mn^{+2}$  puede completar eficientemente su ciclo catalítico. Estudios cinéticos han demostrado que el compuesto I de la MnP puede ser reducido tanto por  $Mn^{+2}$  como por compuestos fenólicos, mientras que solamente el  $Mn^{+2}$  reduce el compuesto II <sup>21</sup>.

El  $Mn^{+3}$  generado por la MnP es una especie altamente oxidante con el inconveniente de ser altamente inestable en medio acuoso. Para superar este inconveniente los hongos lignolíticos secretan ácido oxálico (y otros ácidos como el malónico) que acomplejan el  $MnP^{+3}$ . Estos ácidos carboxílicos forman complejos estables con el  $Mn^{+3}$  capaces de difundir a través de la estructura de la pared celular vegetal y que actúan como oxidantes de compuestos fenólicos <sup>21</sup>.



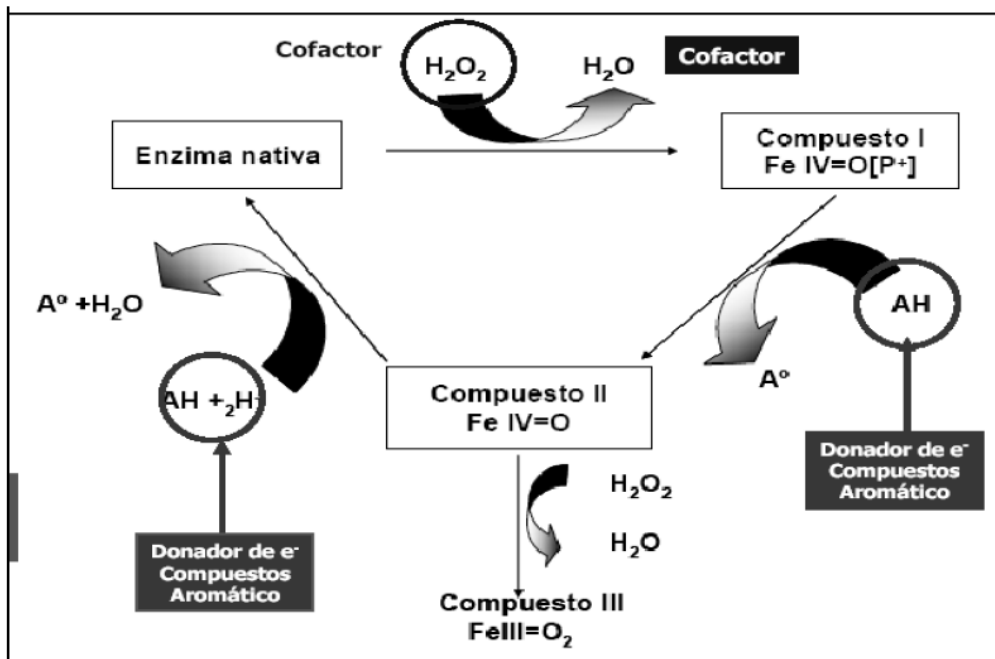
**Figura N° 2.5.- Esquema de Acción de la MnP. (Fernandez, et al 2007)**

Otra de las enzimas implicadas en el proceso de degradación de colorantes es la lignina peroxidasa (LiP).

Esta enzima, tiene semejanza con las otras peroxididasas, en que contiene al grupo hemoférrico y funciona siguiendo la vía catalítica, en que la LiP es oxidada por el peróxido de hidrógeno, generando un intermediario deficiente de electrones el cual es conocido como compuesto I; dicho componente puede ser reducido ya sea por un donador de electrones o por sustratos fenólicos, generando el compuesto II el cual regresará a su estado de reposo inicial por medio de una reducción posterior, que dará como resultado un compuesto fenólico oxidado y agua <sup>21</sup>.

Las peroxididasas lignolíticas difieren en los sustratos reductores (AH) que son oxidados por la transferencia de un electrón a los compuestos I y II. La LiP es relativamente inespecífica en sus sustratos reductores. Puede oxidar compuestos aromáticos de alto potencial redox tales como el alcohol veratrílico, metoxibencenos y modelos diméricos no fenólicos de lignina <sup>21</sup>.

El amplio rango de sustratos para la LiP, que incluye moléculas aromáticas pequeñas y de mayor peso, sugiere que debe haber al menos un sitio de unión localizado en la superficie de la enzima <sup>21</sup>.



**Figura N° 2.6.- Esquema de acción de la LiP (Fernandez, et al 2007)**

Recientemente se describió una tercera peroxidasa ligninolítica en los géneros *Pleurotus* y *Bjerkandera*. A esta enzima se le denominó versátil peroxidasa (VP). La VP, diferente de la MnP y LiP de *P. chrysosporium*, es capaz de oxidar  $MnP^{+2}$  a  $MnP^{+3}$  y catalizar reacciones sobre sustratos aromáticos en ausencia de  $MnP^{+2}$  <sup>21</sup>.

Además se encontró que posee una alta afinidad hacia el  $MnP^{+2}$ , hidroquinonas y colorantes. También es capaz de oxidar al alcohol veratrílico (a veratrilo aldehído), dimetoxibenceno y dímeros de lignina, aunque con menor afinidad que la LiP.

El ciclo catalítico de la VP combina los ciclos de la LiP y la MnP. Sus características básicas son comunes a la mayoría de las peroxidases. Sin embargo, la VP es única ya que es capaz de oxidar sustratos aromáticos como el alcohol veratrílico (AV) a su correspondiente radical AV, el  $MnP^{+2}$  a  $MnP^{+3}$  y sustratos que la LiP sólo oxida en presencia de alcohol veratrílico. El ciclo de la VP incluye la sustracción de

dos electrones de la enzima en estado basal por el peróxido de hidrógeno para producir el compuesto IBAB (C-IBAB), que contiene un oxo- Fe IV =O y un radical catiónico en la porfirina. La reducción en dos reacciones de un electrón produce el compuesto IIBAB (C-IIBAB), que contiene un oxo-Fe IV=O. Y después, la forma basal de la enzima. El ciclo también incluye el compuesto IBBB (C-IBBB), que contiene un oxo- Fe IV=O y un radical triptófano (Trp) y el IIBBB ( C-IIBBB), que contiene un Fe III y un Trp involucrado en la oxidación de AV y otros compuestos aromáticos de alto potencial redox ( C-IBBB y C-IIBBB están en equilibrio con C-IBAB y C-IIBAB, respectivamente). El porcentaje de las formas A y B en las dos reacciones puede ser variable y su participación en la catálisis dependerá de los sustratos disponibles. En otras palabras, los compuestos IBAB y IIBAB predominarán durante la oxidación de MnP+2, mientras que un porcentaje del Trp será necesario durante la oxidación de AV.

Es importante mencionar que esta enzima oxida directamente hidroquinonas y fenoles sustituidos, los cuales no son oxidados eficientemente por la LiP o la MnP en ausencia de veratril alcohol o MnP+2, respectivamente. Incluso oxida colorantes de alto potencial redox, los cuales solo son catalizados por la LiP en presencia de alcohol veratrílico. Para esta enzima, los pH óptimos para la oxidación de MnP<sup>+2</sup> y sustratos aromáticos son diferentes.

Para la oxidación de MnP<sup>+2</sup> el pH óptimo es 5, mientras que para los compuestos aromáticos y colorantes es 3. Estos parámetros son similares a los de MnP y LiP, respectivamente.

Son dos los sitios de unión a sustrato en las VPs de *P.eryngii*, y *B. adusta*. Uno exclusivo para el MnP<sup>+2</sup> cerca del grupo hemo, y otro para los sustratos aromáticos en donde tiene un papel fundamental un triptófano superficial. El flujo de electrones desde el triptófano y el grupo hemo se ha demostrado en la VP de *P. Eryngii* y se determinó para la VP de *B. adusta*.

Estudios bioquímicos muestran la existencia de una inhibición no competitiva entre la oxidación de MnP<sup>+2</sup> y los sustratos orgánicos, como colorantes de alto potencial redox e hidrocarburos aromáticos. Estos resultados apoyan la idea de la existencia de dos sitios de oxidación con afinidades distintas, que no se ven afectados

por la existencia de dos sitios de oxidación con afinidades distintas, que no se ven afectados por la presencia del sustrato alterno que actúa como inhibidor <sup>21</sup>.

La acción de estas enzimas peroxidasa, requieren la presencia de  $H_2O_2$ , como cofactor. Este es producido por enzimas generadoras de peróxido, como la Aril-Alcohol oxidasa (AAO), y la glioxal-oxidasa. La AAO, es una flavo enzima extracelular, la cual cataliza la oxidación de alcoholes aromáticos a los aldehídos correspondientes. El aceptor final de electrones es el oxígeno molecular, lo cual deja como producto  $H_2O_2$  .<sup>11</sup>

Por último encontramos las enzimas lacasas las cuales son enzimas fenol-oxidasa, de gran importancia en la biorremediación del medio ambiente, ya que oxidan algunos compuestos fenólicos (considerados altamente cancerígenos), llegando incluso a polimerizarlos, provocando así su precipitación eliminándolos de las aguas contaminadas por la industria petroquímica, textiles, de colorantes y pinturas, entre otras. Las fenol oxidasa son enzimas que catalizan la oxidación de un amplio espectro de compuestos fenólicos y aminas aromáticas utilizando el oxígeno molecular como aceptor de electrones, reduciéndolo a agua <sup>21</sup>.

Esta enzima posee un centro activo compuesto por Cobre, el cual será oxidado por el oxígeno o por un compuesto aromático, para generar un intermediario deficiente de un par de electrones. Dicho componente será oxidado nuevamente por  $O_2$  o por sustratos fenólicos. El ciclo es completado gracias a cuatro oxidaciones posteriores, lo cual provoca que la enzima vuelva a su estado relajado.

Cataliza la remoción de un electrón y un protón de hidroxilos fenólicos o de grupos amino aromático, para formar radicales libres fenoxilo y radicales amino, respectivamente. Este grupo de enzimas, posee cuatro átomos de cobre en su estado de oxidación que les confieren una coloración azul.

Esta enzima oxida no solamente ácidos fenólicos y metoxifenólicos, sino que también los descarboxila y ataca sus grupos metoxilo mediante la desmetilación o desmetoxilación <sup>21</sup>.

La utilización de sistemas mediador- lacasa es una alternativa promisoría para procesos biotecnológicos con aplicaciones ambientales. Entre ellos, los de blanqueo de la pulpa de papel, la decoloración de colorantes textiles y la oxidación de hidrocarburos polinucleoaromáticos <sup>21</sup>.

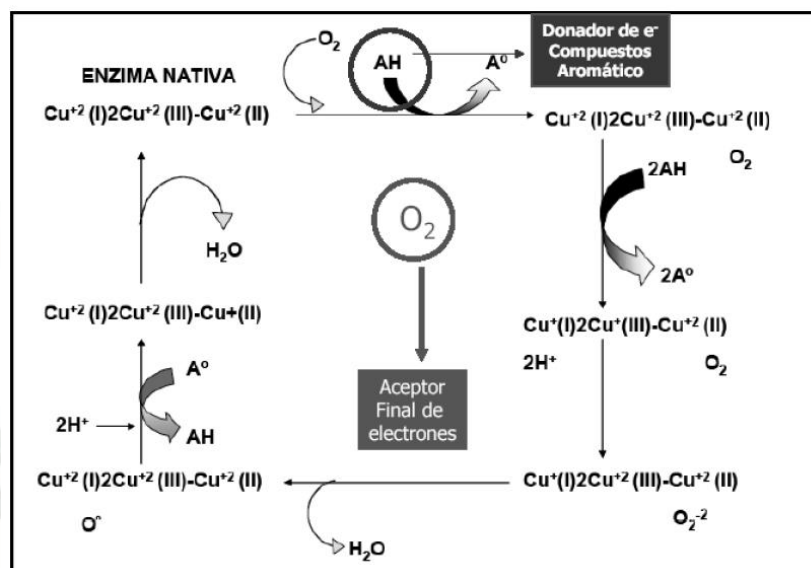


Figura N° 2.7.- Esquema de acción de la enzima Lacasa (Fernandez, et al 2007)

### 2.4.3 Características de los organismos a usar

#### 2.4.3.1 Hongos de podredumbre blanca (Hongos Xilófagos)

Los hongos xilófagos son conocidos como los hongos causantes de la pudrición de la madera que es uno de los tipos de enfermedades más comunes en los árboles, y porque la pudrición debilita la madera y puede provocar fracturas en los árboles, es una de las enfermedades más importantes. La pudrición es considerada una enfermedad porque causa un deterioro progresivo de las paredes celulares y de la resistencia de la madera y puede interrumpir el flujo de savia en la albura cuando las células mueren o reaccionan al avance de la pudrición <sup>22</sup>.

La pudrición, a menudo asociada con otros defectos presentes en el árbol, está implicada en la mayoría de los fracasos en árboles. La pudrición puede afectar a las raíces lignificadas, troncos, y ramas. Por otro lado, un signo es la evidencia visible

del agente causante de la enfermedad, como por ejemplo setas de pudrición de madera, masas miceliares, rizomorfos, y champiñones <sup>22</sup>.

No todos los hongos degradan la madera de la misma forma. Los dos tipos básicos de pudrición – blanca y marrón - pueden generalmente ser diferenciados en campo. Estos tipos de pudrición realmente constituyen formas de ataque enzimático en la madera. De modo interesante, algunos hongos xilófagos pueden llevar a cabo más de un tipo de ataque a un mismo huésped. Hay también tipos diferentes de pudrición blanca y marrón, las cuales dejan un modelo característico de pudrición en la madera, como son las bolsas de pudrición, las pudriciones fibrosas o las pudriciones cúbicas.

El ataque enzimático del hongo debilita la madera degradando la celulosa y la lignina de las paredes celulares y sustrayendo la lignina entre células. El ataque fúngico sobre la celulosa en las paredes celulares reduce la resistencia al pandeo, mientras que la degradación de la lignina afecta a la resistencia a la compresión de la madera.

En general, el hongo causante de pudrición blanca reduce la resistencia a la compresión de la madera principalmente, mientras que la pudrición marrón disminuye su capacidad de pandeo. Una pérdida significativa de esta resistencia ya ocurre incluso antes de que la pudrición sea detectada en la madera.

La mayoría de los hongos xilófagos en los árboles causan pudrición blanca. Los hongos de podredumbre blanca, deben su nombre a la capacidad que presentan de crecer sobre material con alto contenido de Lignina como los troncos de los árboles. Estos hongos remueven la lignina antes o al mismo tiempo que remueve el componente de celulosa de la madera. Ya que la lignina es marrón o de color oscuro, su degradación deja la madera de un blanco pálido o decolorado aspecto en los últimos aspectos de la pudrición. Son microorganismos eucarióticos, heterótrofos, saprofitos; cuya pared celular posee una mezcla de compuestos fibrilares y amorfos. Dentro de los fibrilares se encuentran principalmente la quitina y la celulosa. Otros componentes son los glucanos, proteínas, polímeros de galactosamina y polímeros de manosas. Son organismos filamentosos, en su mayoría con esporas no flageladas que

pueden variar en un tamaño de 5-20  $\mu\text{m}$ ; tienen una doble pared y su forma puede ser esférica, cilíndrica o globosa; y su color oscila entre blanco, rosa, ocre, amarillo.

La madera consiste principalmente de tres componentes, lignina, celulosa y hemicelulosas. La celulosa es un polímero de anhídrido glucosa con uniones 1-4. Las hemicelulosas consisten de polímeros similares de glucosa con otras uniones o polímeros de monosacáridos diferentes a la glucosa. La lignina es un polímero complejo de unidades fenólicas. La madera de coníferas en general tiene un mayor contenido de lignina (27-35%) que la madera de angiospermas dicotiledóneas o "maderas duras" (19-24%).

Los hongos de pudrición blanca tienen un sistema de enzimas celulasa y lignasa que le permiten degradar todos los componentes de las paredes celulares de la madera. Algunos, sin embargo, remueven lignina más rápido.

## 2.5 Inmovilización

Para minimizar el impacto de factores como pérdida de biomasa, cambios en pH y temperatura, que pueden causar susceptibilidad a los microorganismos que afectan a su vez el desempeño de los sistemas biológicos, y lograr un sistema más eficiente, se ha impulsado el uso de nuevas técnica, entre ellas la inmovilización de la biomasa activa <sup>23</sup>.

Se define a la Inmovilización celular como la ubicación de células en un espacio o región específica, de forma natural o inducida, en la cual son capaces de mantener una actividad catalítica deseada <sup>24</sup>.

Dicha inmovilización se da gracias a procesos de adherencia a superficies o a otros microorganismos, debido a alguna estructura celular o a sustancia que segregan. Puede darse de forma artificial o inducida, atrapando en espacios o poros de fibras y geles, etc.) <sup>25</sup>

Bajo muchas condiciones las células inmovilizadas tienen ventajas sobre las células libres y las enzimas inmovilizadas. El uso de células inmovilizadas permite la operación de biorreactores a velocidades de flujo que son independientes de la

velocidad de crecimiento empleadas. La estabilidad catalítica puede ser mayor para células inmovilizadas que para células libres y algunos microorganismos inmovilizados toleran concentraciones más altas de compuestos tóxicos que su contraparte no inmovilizada <sup>26</sup>.

Diversos soportes son usados para la inmovilización de los microorganismos. Pueden ser de naturaleza sintética o natural, y en ambos casos puede ser una inmovilización activa si hay atrapamiento de microorganismo, o pasiva si solo hay fijación de este a la superficie del soporte, formando biopelículas <sup>27</sup>.

**Tabla N° 2.6.- Soportes usados en la inmovilización de microorganismos usados en procesos de biorremediación.**

Soporte	Tipo de soporte	Tipo inmov.	Microorganismo inmovilizado	Sustancia tratada	Referencia
Luffa cilíndrica	Natural	Pasiva	Chlorella sorokiniana Porphyridium cruentum Penicillium trogii T.versicolor	Metales, solorantes, sustancias cloradas	Mazananci y Unyayar 2005
Luffa cilíndrica, fibra de coco	Natural	Pasiva	Consorcio bacteriano	Fungicida carbendazim	Pattanasupong, et al.,2004
Fibra de madera de papaya	Natural	Pasiva	PHanerochaete chrysosporium	DDT	Barragán,et al,2007
Cubos de madera	Natural	Pasiva	PHanerochaete chrysosporium	Zinc (II)	Iqbal y Saeed,2006

Tabla elaborada por Garzón Jiménez ,2009

*Cont. Tabla N° 2.6.- Soportes usados en la inmovilización de microorganismos  
usados en procesos de biorremediación.*

<b>Soporte</b>	<b>Tipo de soporte</b>	<b>Tipo inmov.</b>	<b>Microorganismo inmovilizado</b>	<b>Sustancia tratada</b>	<b>Referencia</b>
Fibras de polipropileno	Sintética	Pasiva	Consorcio de bacterias halotolerantes	Petroleo	Diaz, et al.2002
Perlas de vidrio, perlas de sílice, cubos de poliuretano.	Sintética	Pasiva	Consorcio bacteriano	PCB	Fava, et al.1996
Espuma de poliuretano y polivinil	Sintética	Pasiva	Prototheca zopfii	Etilacetato, metilacetato	Doronina, et al, 2006.
Carbón activado	Natural	Pasiva	Pseudomona Putida Klebsiella oxytoca Pseudomonas pictorum Pseudomonas sp.	Fenol 1,2-dicloroetano  Fenol  Colorantes textiles	Wang y Li,2007 Mileva, et al,2009 Annadurai, et al,2008 Annadurai, et al,2000. Barragan, et al, 2007
Polisulfano, resina epóxica	Sintética	Activa	PHormidium laminosum	Metales Pesados	Blanco, et al, 1999

*Tabla elaborada por Garzón Jiménez ,2009*

*Cont. Tabla N° 2.6.- Soportes usados en la inmovilización de microorganismos  
usados en procesos de biorremediación.*

Soporte	Tipo de soporte	Tipo inmov.	Microorganismo inmovilizado	Sustancia tratada	Referencia
Espuma de poliuretano	Sintética	Pasiva			
Alginato de calcio	Natural	Activa	Pseudomonas sp.	Fenol	Chivita, et al, 2003
Alginato de calcio k-carragenano (CGN) Poliacrilamida (PAA)	Natural  Sintética	Activa	Pseudomona Luteola	Rojo activo 22	Chang, et al, 2001
Alginato de calcio	Natural	Activa	Pseudomona Putida	Fenol	Bandhyopad hay, et al, 1999
Alginato de calcio	Natural	Activa	Trametes versicolor	Colorantes textiles	Dominguez, et al, 2005

*Tabla elaborada por Garzón Jiménez, 2009*

## CAPITULO III

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Lugar de Ejecución

El trabajo de tesis fue ejecutado en el Laboratorio del Instituto de Medio Ambiente y Energía (IEM) de la Universidad Católica San Pablo.

#### 3.2 Materiales

##### MATERIAL BIOLÓGICO

- Hongos Xilófagos de la selva Peruana (Departamento de Madre de Dios).

##### MUESTRA EN ESTUDIO

- Se empleó en el siguiente estudio 3 colorantes Reactivos: Synozol yellow K-3RS, Synozol red K-3BS, Negro Super Novacrom G.

##### MATERIAL

- Placa Petri ( vidrio)
- Beaker de 250, 500 y 1000 ml
- Matraz Erlenmeyer de 250 ml
- Pipetas graduadas 1,5 y 10 ml
- Propipeta
- Papel Aluminio
- Marcador
- Bagueta
- Mechero
- Gradilla

- Tubos de ensayo de 15 y 20 ml
- Cinta adhesiva
- Tapones de corcho
- Manguera de polopropileno
- Crucetas
- Llaves de control de flujo
- Jeringas
- Plancha de corcho
- Tubos de Vidrio
- Guantes
- Barbijo
- Papel Toalla
- Lentes de Seguridad

#### **REACTIVOS**

- Agar Nutritivo
- Agar PDA
- Peptona
- Glucosa
- Extracto de Levadura
- Agua destilada
- Ácido Sulfúrico
- Hidróxido de sodio
- Agar – Agar
- $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}_2$
- $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- $\text{NH}_4\text{Cl}$

## EQUIPOS

Los equipos empleados en la presente investigación están calibrados y verificados.

➤ Autoclave

Marca: Gemmy

Modelo: SA-232

➤ Centrifuga

Marca: BOECO

Modelo: XC-2000

➤ Balanza Analítica ( Max= 200g ; d= 0.001 gr)

Marca: Radwag

Modelo: WTB-200

➤ Incubadora

Marca: Memmert

Modelo: IF-110

➤ Termoagitador

Marca: CIMAREC

➤ Espectrofotómetro

Marca: UNICO

Modelo: 2800 UV/VIS

### 3.3 Metodología

#### 3.3.1 Aislamiento de Hongos Xilófagos

##### 3.3.1.1 Recolección de Hongos Xilófagos

La recolección de los hongos se realizó en el Fundo “El Bosque”, el cual pertenece a la Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios en el departamento

de Madre de Dios, con una temperatura media de 27°C y una humedad relativa promedio de 82%.

Se recolectaron diferentes de hongos presentes en tallos de árboles los cuales presentaban la característica de degradación de Lignina.

Se trabajó todo el momento con guantes quirúrgicos por seguridad propia y por no contaminar la muestra, para obtener los hongos se extrajo una parte de la corteza la cual incluye al hongo y se colocó en bolsas de papel limpias para su traslado inmediato a la ciudad de Arequipa.

### **3.3.1.2 Aislamiento de los Hongos Xilófagos en medio PDA**

Una vez en la ciudad de Arequipa en el laboratorio IEM de la Universidad Católica San Pablo se preparó medio PDA compuesto por Papa (200 gr/L), Dextrosa (20 gr/L) y Agar – Agar (15gr/L). Para preparar el medio primero se puso a hervir la papa y posteriormente se agregó la dextrosa y el agar – Agar. Se somete a cocción hasta que no haya presencia de grumos.

Al tener el medio disuelto, se colocó dentro del autoclave por 15 minutos a 121 °C a 15 psi para esterilizar el medio.

Una vez que finalizó la esterilización se colocó el medio en placas Petri, todo dentro de una cámara de siembra para evitar la contaminación.

Se dejó las placas cerradas de un día para otro para tener la certeza de que no hubo contaminación.

Para la siembra de hongos se colocaron dos mecheros dentro de la cámara de siembra y se desinfectó el cuerpo fructífero sin que fuera letal para las hifas, ya que es fuente de una amplia contaminación por bacterias, mohos, etc. Se tomó el sombrero y se cortó con un bisturí estéril, pequeños cuadrados de 5 mm aproximadamente. Los trozos se dispusieron en placas Petri estériles y se desinfectaron con Hipoclorito de Sodio al 3% por 30 segundos para luego enjuagar con agua destilada estéril por un minuto. Para finalizar se sembraron los trozos de cada hongo en superficie de agar PDA sólido.

Las placas con los hongos se colocaron dentro de una incubadora a 30 °C por 3 días o hasta observar crecimiento para luego realizar replicas.

### 3.3.2 Selección e Identificación de Hongos Xilófagos a evaluar

#### 3.3.2.1 Colorantes a usar

Se seleccionaron los 3 colorantes más representativos de acuerdo a su uso en las textileras y su aplicación a la fibra.

Los colorantes a usar son Synozol yellow K-3RS, Synozol red K-3BS y Negro Super Novacrom G.

#### 3.3.2.2 Selección de cepas para la evaluación

Para seleccionar las cepas a evaluar en medio líquido con colorante, se preparó medio Radha modificado con adición de cada colorante los cuales se están evaluando (Synozol Amarillo, Synozol Rojo, Novacrom Negro) en dos concentraciones (250 ppm como concentración mínima y 1500 ppm como concentración máxima), dicho medio está compuesto por  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2gr/L),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0.05 gr/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.5 gr/L),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.1 gr/L), Agar-Agar (15 gr/L), solución traza (10 ml/L de medio) compuesta de  $\text{MnSO}_4$  0.5 gr/L,  $\text{FeSO}_4$  0.1 gr/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  <sup>28</sup> adicionado de 4 gr/L de sacarosa para inducir el crecimiento a pH neutro, los ensayos se realizaron tomando del cultivo de medio PDA de cada hongo, un trozo rectangular de aproximadamente 5 mm x 5 mm y se sembró en el centro de cada placa Petri con el medio *Radha* mas colorante. Se incubó a una temperatura de 30 °C y se evaluó el crecimiento radial durante 8 días.

Cada 24 horas se midió el halo de colonización del micelio para poder determinar los hongos con mejor crecimiento en la posterior evaluación en medio líquido.

Dicho proceso se realizó por duplicado.

### 3.3.2.3 Caracterización e identificación de Hongos Xilófagos

La caracterización se realizó mediante la observación macroscópica de los hongos en la placa con medio PDA tomando en cuenta el color de la cepa, su tipo de crecimiento y posteriormente se realizó una caracterización molecular.

La extracción de ADN, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se realizó en el laboratorio “ADN Uchumayo” y la secuenciación en Estados Unidos. Se comparó la secuencia utilizando el BLAST con las secuencias del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

### 3.3.3 Evaluación de la Espuma de Poliuretano como soporte de inmovilización.

En este trabajo, se empleó espuma de poliuretano de alta porosidad ya que permite retener a las células sin limitaciones para el sustrato e incluso para el oxígeno<sup>29,30</sup>.

Otra de las razones por las que se empleó espuma de poliuretano como carrier es su fácil disponibilidad, bajo costo, altamente estable y permite mayor viabilidad de las células inmovilizadas durante varios usos.<sup>31</sup>

#### 3.3.3.1 Inmovilización del hongo xilófago en medio líquido

Se realizó un cultivo de biomasa en 4 matraces de 500 ml de medio líquido *Radha* modificado el cual está compuesto por  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2gr/L),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0.05 gr/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.5 gr/L),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.1 gr/L), solución traza (10 ml/L de medio) la cual contiene  $\text{MnSO}_4$  0.5 gr/L,  $\text{FeSO}_4$  0.1 gr/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y adicionalmente se agregó Sacarosa (10 gr/L)<sup>28</sup> a pH neutro con una placa entera de cada hongo (pequeños trozos) en cada matraz haciendo un total de 2 matraces por cepa, luego de crecer por 2 días en medio sólido PDA.

El cultivo se realizó durante 4 días a una temperatura de 30°C.

Posteriormente se cortaron cuadraditos de espuma de poliuretano de 1cm por 1 cm teniendo un peso de 0,018 g. para cada cuadradito.

Una vez que se tuvo todos los cuadraditos, en un recipiente se esterilizaron con alcohol de 70% por dos minutos. Luego se enjuagó con agua destilada y se trató

de que queden los más secos posibles para que entren en contacto con el hongo del matraz de 500 ml.

Dentro de la cámara de siembra en presencia de mecheros se introdujo los cuadraditos de espuma de poliuretano a los matraces que contenían los hongos para que se dé la inmovilización.

Se dio la inmovilización por 5 días.

### 3.3.3.2 Cantidad de biomasa inmovilizada en espuma de Poliuretano

La cantidad de biomasa inmovilizada en los cuadradito de espuma de Poliuretano fue medida por medio de la técnica de peso seco. Para esto se estandarizó el peso inicial de los cuadraditos de espuma de Poliuretano, 0,018 g equivalente al peso obtenido a un cuadradito de 1 x1 cm. Una vez inmovilizadas durante cinco días se realizaron pruebas para poder determinar el día en que se da la máxima colonización de la cepa fúngica, para obtener el peso de la biomasa seca se aplicó la siguiente formula:

$$P_{\text{Hongo}} = P_f - P_i$$

Donde:

- $P_{\text{Hongo}}$  = peso de hongo en gramos
- $P_f$  = peso final ( espuma con hongo inmovilizado)
- $P_i$  = peso inicial ( espuma sin inmovilizar)

### 3.3.3.3 Selección de longitud de onda de mayor absorción para cada colorante

Con el fin de conocer la longitud de onda máxima de cada colorante teniendo en cuenta 3 pH diferentes (pH 6, pH 8 y pH 10) se preparó una solución a 40 ppm y se realizó un barrido de longitudes de onda con intervalos de 50nm entre 700 nm y 300 nm.

Se analizaron los resultados y se tomaron 3 longitudes de onda donde se dieron los valores más altos.

Se realizó un segundo barrido entre las 3 longitudes de onda con valores de absorbancia más altos pero esta vez con intervalos de 5 nm.

Una vez que se obtuvo la Longitud de onda de mayor absorción se preparó soluciones de 50 ppm, 25 ppm, 12.5 ppm, 6.25 ppm y 3.125 ppm permitiendo obtener una ecuación de línea recta para calcular la concentración en ppm o mg/L presentes en una muestra determinada.

#### **3.3.3.4 Pruebas de Absorción de Espuma de poliuretano**

Con el fin de determinar la verdadera concentración de colorante removido durante el experimento por cada uno de las cepas fúngicas a evaluar, y poder determinar el valor de la concentración de colorante absorbida por el soporte se realizó pruebas de absorción para los cuadraditos de espuma de poliuretano de 0.018 gr.

Se realizaron las pruebas con cada uno de los colorantes con una concentración de 40 ppm en un matraz de 250 ml y se colocó 12 cuadraditos de espuma de poliuretano sin hongo.

Diariamente por 7 días se evaluó si la absorbancia de la solución con colorante disminuía.

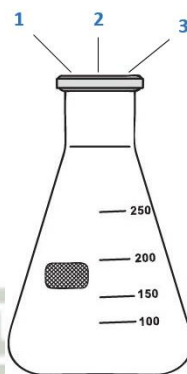
#### **3.3.4 Evaluación de la influencia de factores Aireación, pH, Temperatura, Colorante y Cepa en medio líquido.**

Mientras se daba la inmovilización, en simultáneo, se elaboró primero un sistema el cual tendría aireación para luego elaborar el mismo sistema pero sin aireación. El sistema se armó con matraces de 250 ml, los cuales en la parte superior llevaban tapones de caucho que tuvieron 3 perforaciones para que puedan pasar tubos de vidrio de 0.9 cm de diámetro.

Cada tubo de vidrio tuvo una función diferente. El primer orificio era para que pueda ingresar aire el cual provenía de un motor para peceras, el segundo orificio era para poder conectar una jeringa de 5ml y de esta manera sacar muestras diarias y

evaluar el color por medio de absorbancias en un espectrofotómetro UV/VIS, el tercer orificio era para el escape del aire que ingresaba.

A continuación en la Figura N° 3.1 se muestra un diseño de un matraz con las 3 perforaciones en la tapa de caucho.



**Figura N° 3.1.- Diseño de matraz con 3 perforaciones en la tapa de caucho.**

Donde:

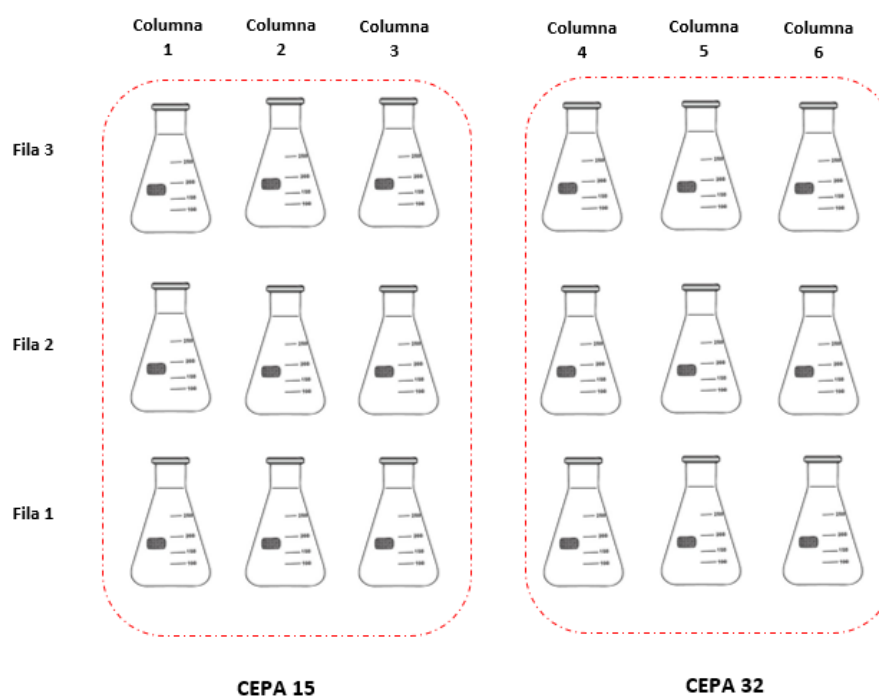
- 1: La perforación corresponde a la entrada de aire.
- 2: La perforación corresponde a la salida de aire
- 3: la perforación corresponde a la toma diaria de alícuotas empleando una jeringa de 5 ml.

El sistema se evaluó en fase a 5 factores, los cuales se dividen en factores cualitativos y factores cuantitativos. Como factores cualitativos se tiene a Cepa, Aireación, Colorante, Temperatura y como factor cuantitativo se tiene a pH. El sistema se armó de la siguiente manera:

Se colocaron matraces en filas de 3 por columnas de 6. Las filas determinaban los 3 pH diferentes a usar (pH 6, pH 8 pH 10) y las columnas se referían a los 3 colores diferentes que se evaluaron (Synozol Amarillo, Synozol Rojo, Novacrom negro). Las 3 primeras columnas correspondían a la cepa 15 y las siguientes 3 a la cepa 32. Todos los matraces llevaban en la parte superior el tapón de caucho y mediante mangueras se interconectaban para que puedan recibir aireación la cual provenía de motores usados en peceras para oxigenar. Dicho sistema de realizó a Temperatura Ambiente y dentro de la incubadora para evaluar a temperatura de 35 °C.

Se usó un total de 4 motores, el primero para los 3 colorantes con los 3 pH de la cepa 15 a temperatura ambiente, el segundo para los 3 colorantes con los 3 pH de la cepa 32 a temperatura ambiente, el tercero para los 3 colorantes con los 3 pH diferentes de la cepa 15 a 35°C y el cuarto motor para los 3 colorantes con los 3 pH diferentes de la cepa 32 a 35°C.

A continuación en la figura N° 3.2 se muestra un diagrama del sistema que se elaboró para la cepa 15 y cepa 32 a temperatura ambiente.



**Figura N° 3.2.- Diagrama del sistema elaborado para la remoción de colorantes empleando las cepas 15 y 32 a temperatura ambiente**

Donde:

- Fila 1 : corresponde a pH 6
- Fila 2 : corresponde a pH 8
- Fila 3 : corresponde a pH 10
- Columna 1 : corresponde a color Synozol Amarillo
- Columna 2 : corresponde a color Synozol rojo
- Columna 3 : corresponde a color Novacrom negro

- Columna 4 : corresponde a color Synozol Amarillo
- Columna 5 : corresponde a color Synozol rojo
- Columna 6 : corresponde a Novacrom negro

Se preparó las soluciones las cuales contenían el colorante a evaluar (40 ppm) más el medio mineral el cual está compuesto por  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2gr/L),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0.05 gr/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.5 gr/L),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.1 gr/L), solución traza (10 ml/L de medio) compuesta de  $\text{MnSO}_4$  0.5 gr/L,  $\text{FeSO}_4$  0.1 gr/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 gr/L y se adicionó sacarosa (4gr/L) para que pueda inducir a la remoción del colorante por parte de la cepa 15 y 32. Cada matraz tenía como volumen final 250 ml.

Para llegar a los pH deseados se emplearon Buffers (Buffer fosfato y buffer acetato) y de esta manera mantener los pH constante durante el tiempo de evaluación.

Se adicionó a cada matraz 12 cuadraditos de hongo (Cepa 15 y Cepa 32) inmovilizados en espuma de poliuretano para que se dé inicio a la evaluación de remoción de los colorantes.

La evaluación fue de un tiempo de 7 días, dicha evaluación consistía en obtener muestra de 4 ml de cada matraz (colorante) empleando la jeringa de 5 ml. Posteriormente se centrifugaba por 5 minutos a 4000 rpm para que sedimente cualquier partícula que se encuentre en el medio y no se tenga falsos resultados al momento de realizar las lecturas en el espectrofotómetro. Una vez que se tuvo las muestras centrifugadas se leyó en el espectrofotómetro a la máxima longitud de onda evaluada previamente para cada colorante teniendo en cuenta los 3 pH diferentes.

Al cabo de los 7 días de evaluación se elaboró nuevamente todo el sistema tanto para temperatura ambiente como para  $35^\circ\text{C}$ , pero esta vez la variable aireación fue modificada. En este nuevo sistema no existe aireación pero las demás variables permanecen iguales.

Se tuvieron soluciones blancos para los sistemas elaborados. Los blancos consistían en la solución con colorante más medio mineral (*Radha modificado*) adicionando cuadraditos de esponjas pero sin hongo, para de esta manera comparar algún tipo de reacción que se dé.

Al terminar la evaluación se sembró en agar sólido PDA las cepas fúngicas provenientes de un cuadrado de espuma de poliuretano, para corroborar que la cepa se encuentre viva.

#### **3.3.4.1 Concentración de colorante residual**

La concentración del colorante presente en la solución se calculó midiendo las absorbancias a la longitud máxima de cada colorante usando como blanco de cada colorante agua destilada. Como curva de calibración se utilizó una solución de cada uno de los colorantes en concentraciones descendentes de 50 mg/L – 3.125 mg/L.

Para poder evaluar la influencia de cada uno de los factores, se ingresaron los datos al programa estadístico Statgraphics Centurion XV y de esta manera se pudo determinar las mejores condiciones para remover colorante textil.

#### **3.3.5 Evaluación de la cinética de remoción de colorante**

Después de obtener los resultados de remoción de colorantes empleados en tintorería de textileras de fibra celulósica y determinar las mejores condiciones, se analizaron los datos en el Software de análisis Origin Pro 9.0 para evaluar la cinética de remoción de cada matraz teniendo en cuenta los factores temperatura, pH, aireación, cepa y colorante.

#### **3.3.6 Desarrollo de modelo matemático para el sistema de remoción de colorante**

Finalmente se desarrolló un modelo matemático generalizado para el sistema de decoloración teniendo en cuenta variables significativas previamente analizadas.

El modelo se desarrolló en el programa estadístico Statgraphics Centurion XV.

## CAPITULO IV

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El proyecto desarrollado buscó evaluar el potencial de hongos xilófagos para la remoción de colorantes de tipo reactivo, empleados en tintorería de textiles celulósicos, ensayando para ello con tres colorantes: Synozol yellow K-3RS, Synozol red K-3BS, Negro Super Novacrom G y trabajando con cepas específicamente aisladas para tales fines.

A lo largo de la investigación se obtuvieron resultados en cada etapa, los cuales se muestran a continuación:

#### 4.1 Aislamiento de Hongos Xilófagos

##### 4.1.1 Recolección de Hongos Xilófagos

Como se indicó en los materiales y métodos, los hongos xilófagos fueron recolectados del Fundo “El Bosque” el cual pertenece a la Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios en el Departamento de Madre de Dios.

Se recolectó un total de 32 especímenes de hongos los cuales se encontraban en troncos de árboles que presentaban la característica de degradación de lignina, lo cual fue un indicador importante para reconocer que los hongos recolectados correspondían a los llamados “hongos de podredumbre blanca”, tal y como se puede observar en la Figura 4.1, la cual muestra la presencia de hongos de color blanco sobre un tronco caído el cual presenta degradación de Lignina evidenciada por observarse algunas partes blanquecinas en el tronco.



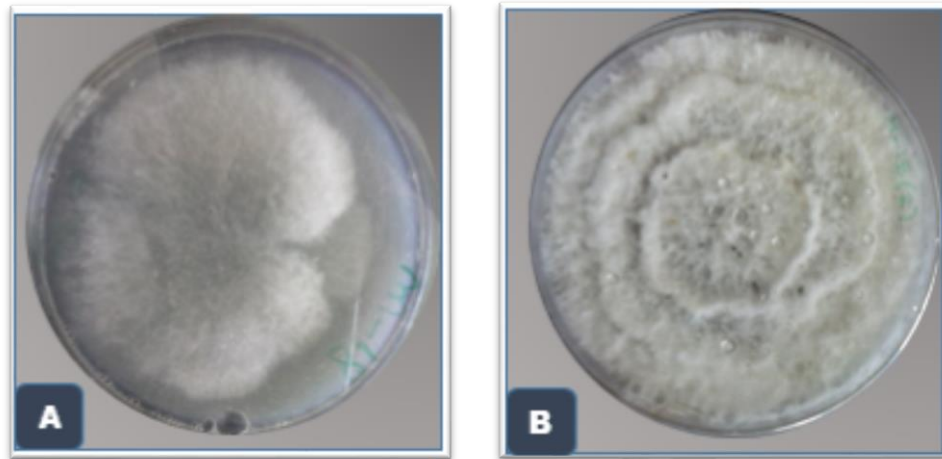
**Figura N° 4.1.- Hongos xilófagos sobre un tronco con degradación de Lignina**

A diferencia de la presente investigación, Cardona<sup>33</sup>, se trabajó con hongos de podredumbre blanca los cuales fueron otorgados por el departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Santiago de Compostela (España), teniendo conocimiento de que los hongos empleados, uno de ellos *Phanerochaete chrysosporium*, presentan actividad lignolítica. Sin embargo en el actual trabajo realizado los hongos son propios de la selva peruana y no son donados por alguna institución.

#### **4.1.2 Aislamiento de los Hongos Xilófagos**

Se aislaron los 32 especímenes de Hongos en medio sólido PDA, a 30°C por un tiempo de 3 días. Al pasar los días y realizar replicas, 18 hongos se contaminaron y solamente quedaron 14 hongos con los que se pudo trabajar posteriormente.

A continuación en la figura N° 4.2 se muestran algunos hongos aislados en medio PDA.



**Figura N° 4.2.- Crecimiento de Hongos de Podredumbre Blanca en medio sólido PDA; A) Ceba N°18; B) Ceba N°15.**

#### 4.2 Selección e Identificación de hongos xilófagos a evaluar

Como se mencionó en la sección 4.1 de los 32 hongos aislados, debido a problemas de contaminación por factores externos, sólo se pudo continuar trabajando con 14 de ellos los cuales corresponden a las siguientes cepas: Ceba 2, Ceba 7, Ceba 9, Ceba 10, Ceba 14, Ceba 15, Ceba 18, Ceba 19, Ceba 20, Ceba 21, Ceba 25, Ceba 26, Ceba 27, Ceba 32. Estos 14 hongos fueron sembrados en medio *Radha modificado* adicionando en cada caso el colorante de interés a concentraciones de 250 ppm como valor mínimo y 1500 ppm como valor máximo, evaluando diariamente el crecimiento por un periodo de 8 días.

Cardona <sup>33</sup>, ensayó hongos de podredumbre blanca en medios solidos adicionados con colorantes con una concentración máxima de 100 ppm debido a que evaluaba crecimiento y decoloración, sin embargo, en la presente investigación se emplearon concentraciones superiores (250 ppm y 1500 ppm) debido a que la evaluación realizada se basó en el mayor crecimiento (máxima tolerancia de colorante) que pueda presentar la cepa y no en la decoloración.

#### 4.2.1 Colorantes a usar

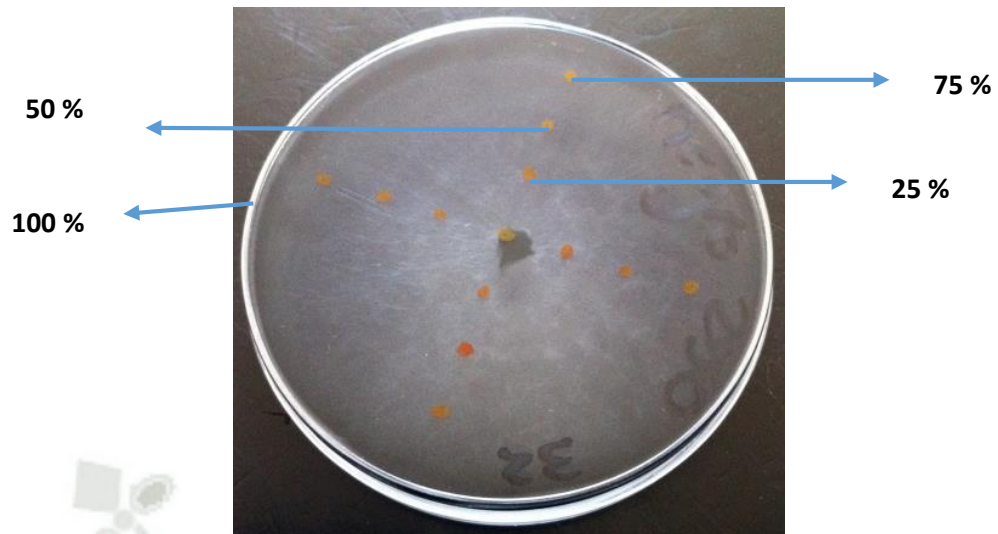
Los colorantes seleccionados una vez revisado su uso, estructura, fueron Synozol yellow K-3RS, Synozol red K-3BS y Negro Super Novacrom G.



**Figura N° 4.3.- Colorantes reactivos empleados en la evaluación de la remoción de colorantes**

#### 4.2.2 Selección de cepas para la evaluación

Para evaluar el crecimiento en medio sólido, se dividió la placa en 4 puntos de referencia de acuerdo al área de 25, 50, 75 y 100 % de la placa, tal y como se muestra en la Figura 4.4 , asignando un valor de 100% cuando se observó crecimiento sobre toda la superficie de la placa, un 75% cuando el crecimiento se daba sobre las  $\frac{3}{4}$  partes de la placa en forma radial y así sucesivamente, de manera descendente y progresiva, para los porcentajes de 50%, 25% y respectivamente, en base al crecimiento de cada uno de los hongos aislados disponibles para de esta manera seleccionar las cepas con mayor capacidad de crecimiento, ello con fines de inmovilización y estudios de remoción en líquido.



**Figura 4.4.- Puntos de referencia en placa con medio radha con colorante.**

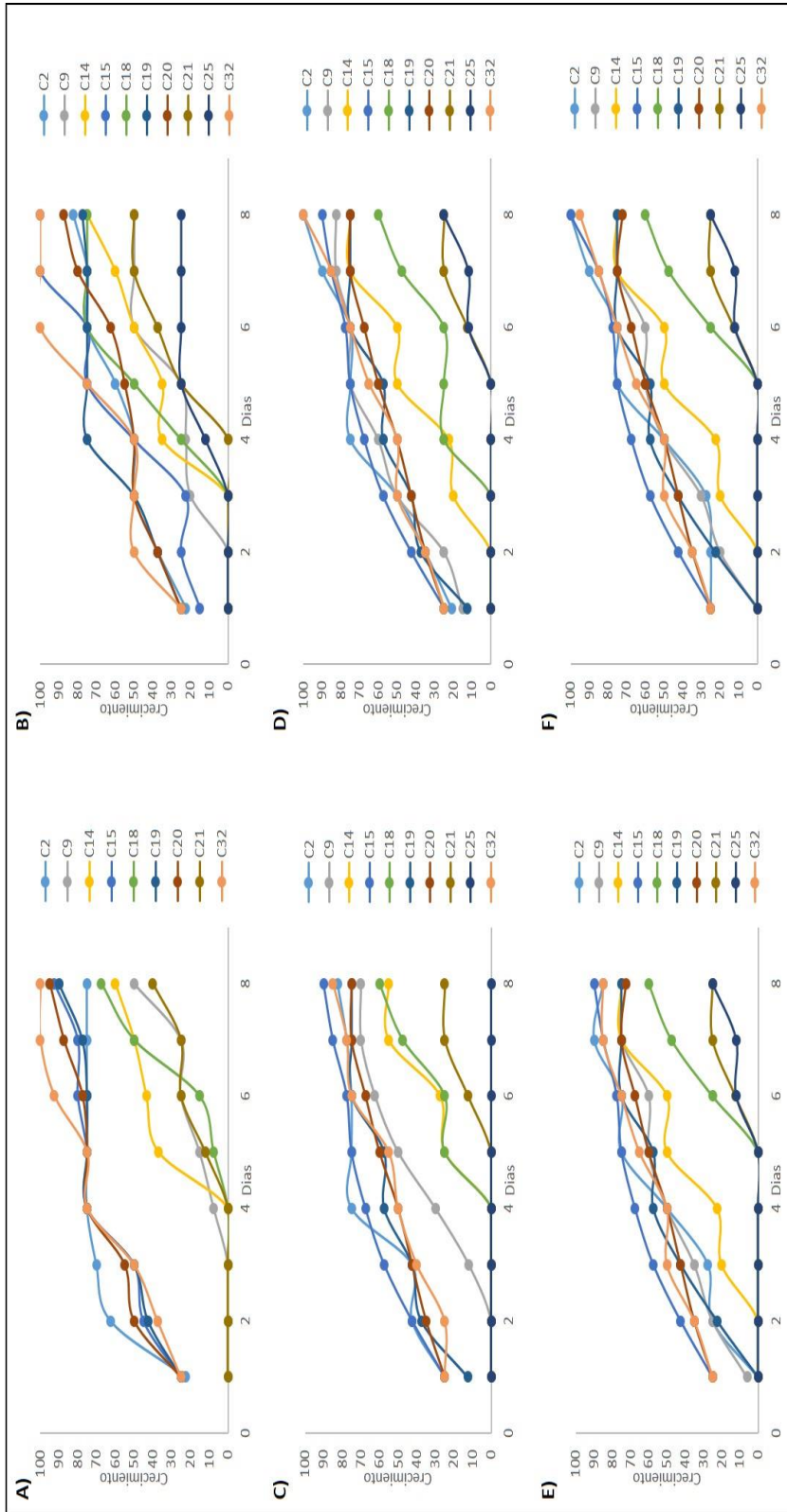
Para la selección de las mejores cepas en cuanto a capacidad de crecimiento sobre los colorantes Synozol yellow K-3RS, Synozol red K-3BS y Negro Super Novacrom G, se realizó el análisis estadístico respectivo mediante el software estadístico Statgraphics Centurion XV, comparando el crecimiento alcanzado al octavo día de evaluación. Los resultados del crecimiento diario expresado porcentaje de las 14 cepas se muestran en extenso el Anexo N°03.

En la Figura 4.5, la cual muestra las curvas de crecimiento en placa de los 14 hongos xilófagos sometidos a diferentes concentraciones de colorante como única fuente de carbono, se puede observar en A) y B) el crecimiento sobre el colorante Synozol Amarillo a 1500 ppm y 250 ppm respectivamente, identificando que a 1500 ppm las cepas que no presentan un crecimiento favorable son las cepas 18,14,9, 21 y 25, ésta última presentó un crecimiento del 25% a 250 ppm y fue inhibida completamente a 1500 ppm. Así mismo para Synozol Amarillo en ambas concentraciones la cepa 32 mostró mayor crecimiento. En C) y D) correspondientes a Synozol Rojo 1500 ppm y 250 ppm respectivamente, la cepa que mostró mayor crecimiento fue la cepa 15, seguida de la 32 y la 2, en E) y F) para Novacrom negro a concentraciones de 1500 y 250 ppm, las cepas que desarrollaron mayor crecimiento correspondieron a las cepas 15,2 y 32. Las cepas 10, 26 y 27 tuvieron un crecimiento nulo en todos los casos.

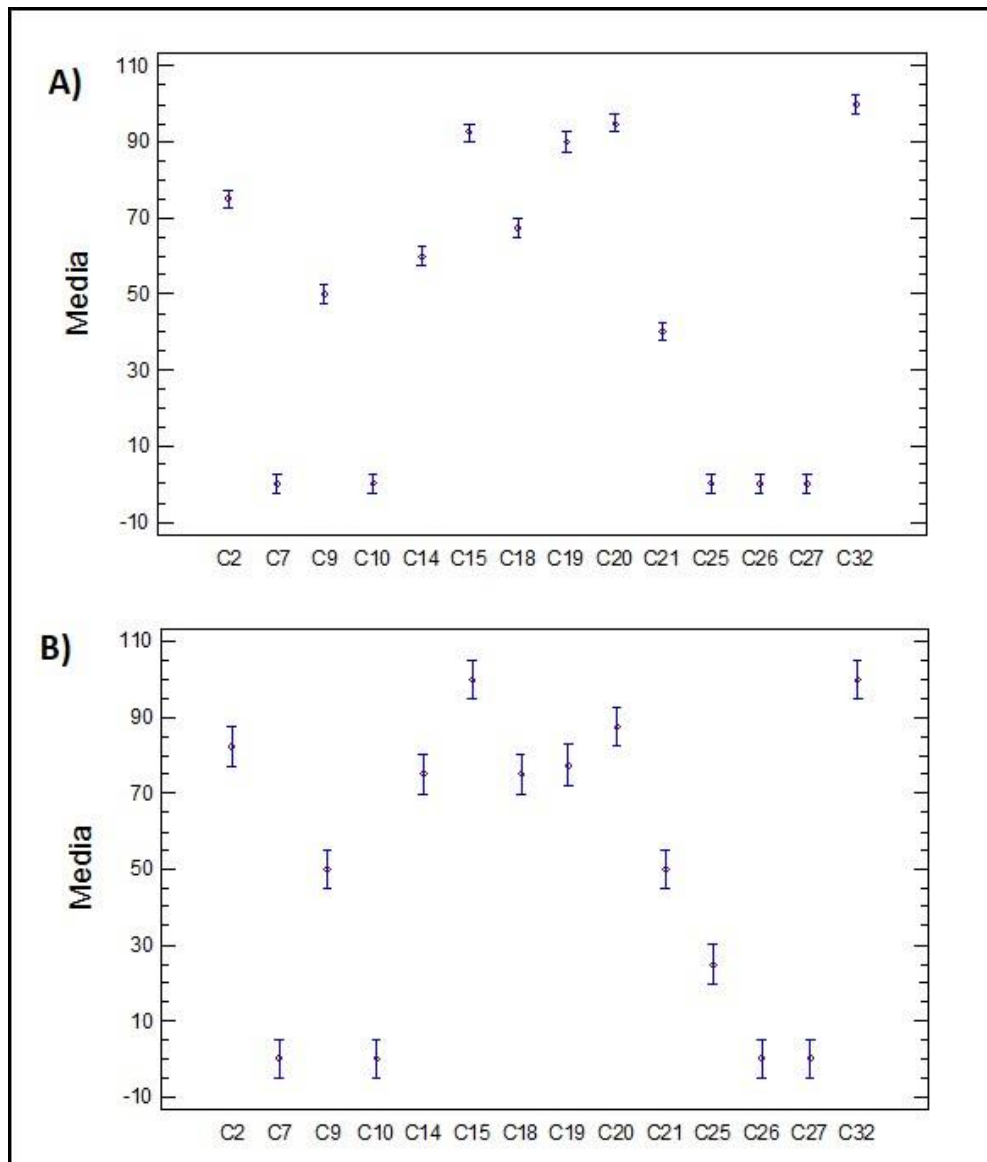
Las curvas de crecimiento mostradas permitieron una comparación visual del crecimiento a lo largo del tiempo, sin embargo dicho análisis no es preciso para lo cual se llevó a cabo un análisis estadístico para identificar y seleccionar a aquellas cepas que presentaron el mayor crecimiento para los tres colorantes mencionados.

Para ello se elaboraron diferentes gráficas de medias que permitan establecer una comparación visual del crecimiento entre las 14 cepas al octavo día, así en la Figura 4.6 se observa que para la concentración de 1500 ppm del colorante Synozol Amarillo las cepas 32, 20,15 y 19 mostraron mayor crecimiento; a su vez a 250 ppm las mejores cepas fueron la 32, 15, 20 y 2. En la Figura 4.7 para el crecimiento con Synozol Rojo se observa que la mejor respuesta fue dada por las cepas 2,15 y 32 en ambas concentraciones. En cuanto al colorante Novacrom negro, las cepas con mayor crecimiento correspondieron también a las numero 2,15 y 32, en ambas concentraciones tal y como se observa en la Figura 4.8.

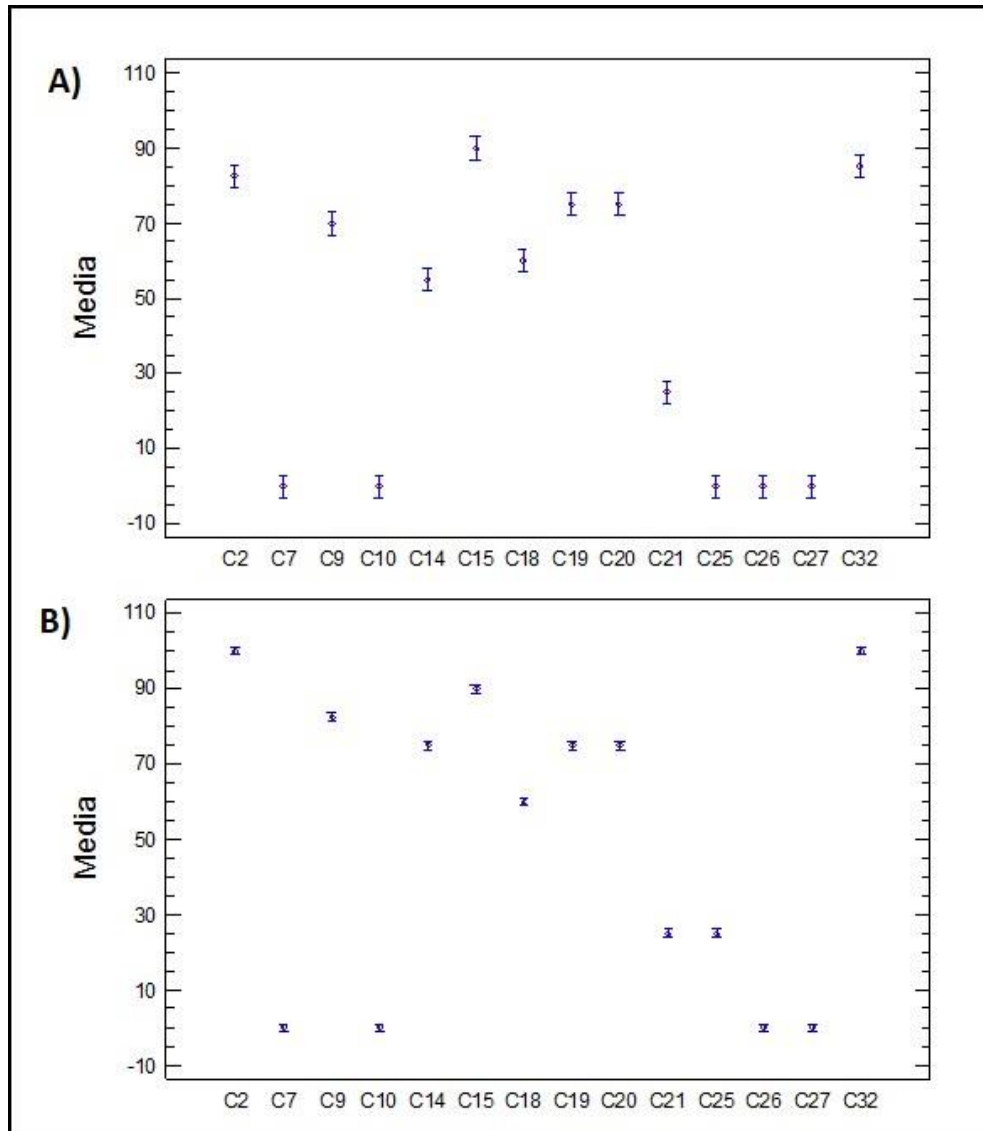




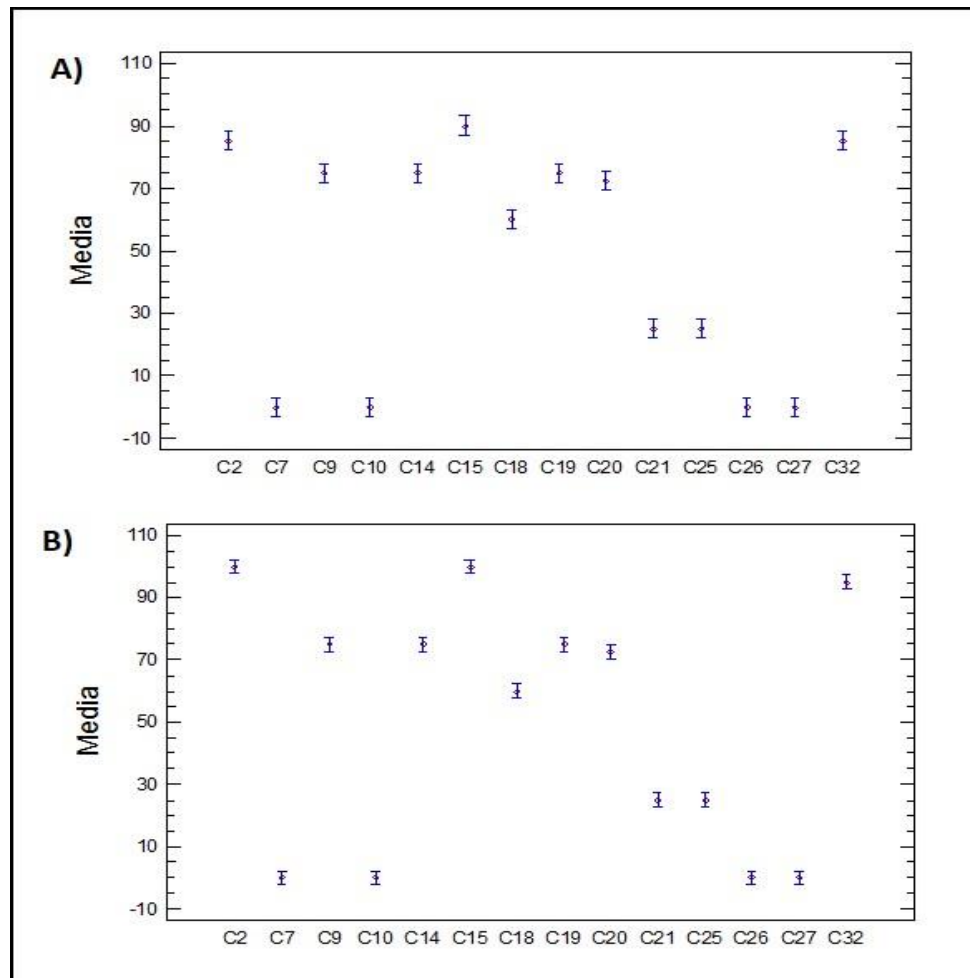
**Figura N° 4.5.-** Curvas de crecimiento en placa de hongos xilófagos con diferentes concentraciones de colorante de colorante como única fuente de carbono. En A) Synozol Amarillo 1500 ppm, B) Synozol Rojo 1500 ppm, C) Synozol Rojo 250 ppm, D) Synozol Rojo 250 ppm, E) Novacrom negro 1500 ppm y F) Novacrom negro 250 ppm.



**Figura N° 4.6.- Gráfico de medias para el crecimiento en placa de hongos xilófagos con Synozol Amarillo como única fuente de carbono (Día 8). En A) 1500 ppm, B) 250 ppm**



**Figura N° 4.7. Gráfico de medias para el crecimiento en placa de hongos xilófagos con Synozol Rojo como única fuente de carbono (Día 8). En A) 1500 ppm, B) 250 ppm**



**Figura N° 4.8.- Gráfico de medias para el crecimiento en placa de hongos xilófagos con Novacrom negro como única fuente de carbono (Día 8). En A) 1500 ppm, B) 250 ppm**

En la Tabla 4.7 se resume el promedio (en porcentaje) y los límites de confianza del crecimiento evaluado para cada una de las 14 cepas en presencia de los diferentes colorantes (Synozol Amarillo, Synozol Rojo y Novacrom negro) a las concentraciones de 1500 y 250 ppm, en color rojo se resaltan aquellas con los valores más altos a comparación de las demás. Para comprobar esto se realizó un Análisis de varianza con la finalidad de conocer si estadísticamente existió diferencia significativa entre estas 14 cepas (Anexo N° 03). Las siguientes tablas 4.1 y 4.2 muestran el análisis de varianza realizado al crecimiento de las cepas en presencia del colorante Synozol Amarillo para 1500 y 250 ppm respectivamente, identificando que en ambos casos la diferencia fue estadísticamente significativa  $p < 0.000$ , identificando una gran variación entre cepas mas no del duplicado realizados para cada una.

**Tabla N° 4.1.- Análisis de varianza para el crecimiento en placa de hongos xilófagos en medio de cultivo con Synozol Amarillo 1500 ppm al día 8.**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	42996.4	13	3307.42	617.38	0.0000
Intra grupos	75.0	14	5.35714		
Total (Corr.)	43071.4	27			

*Elaboración Propia*

**Tabla N° 4.2.- Análisis de varianza para el crecimiento en placa de hongos xilófagos en medio de cultivo con Synozol Amarillo 250 ppm al día 8.**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	40115.2	13	3085.78	128.00	0.0000
Intra grupos	337.5	14	24.1071		
Total (Corr.)	40452.7	27			

*Elaboración Propia*

Las tablas 4.3 y 4.4 se muestra el análisis de varianza realizado para el crecimiento de los hongos xilófagos en medio de cultivo con colorante Synozol Rojo a 1500 ppm y 250 ppm respectivamente, identificando una diferencia estadísticamente significativa en ambos casos ( $p < 0.05$ ) con una gran variación entre las cepas mas no entre los duplicados, siendo el cuadrado medio de 8.03 para 1500 ppm y un valor a un menor de 0.89 para 250 ppm en los intragrupos.

**Tabla N° 4.3.- Análisis de varianza para el crecimiento en placa de hongos xilófagos en medio de cultivo con Synozol Rojo 1500 ppm al día 8.**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	36590.2	13	2814.63	350.26	0.0000
Intra grupos	112.5	14	8.03571		
Total (Corr.)	36702.7	27			

*Elaboración propia*

**Tabla N° 4.4.- Análisis de varianza para el crecimiento en placa de hongos xilófagos en medio de cultivo con Synozol Rojo 250 ppm al día 8.**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	41754.5	13	3211.88	3597.31	0.0000
Intra grupos	12.5	14	0.892857		
Total (Corr.)	41767.0	27			

*Elaboración propia*

De igual manera se identificó una diferencia estadísticamente significativa entre el crecimiento presentado por las 14 cepas en presencia del colorante Novacrom negro a 1500 ppm y 250 ppm, tablas 4.5 y 4.6 respectivamente.

**Tabla N° 4.5.- Análisis de varianza para el crecimiento en placa de hongos xilófagos en medio de cultivo con Novacrom negro 1500 ppm al día 8.**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	35411.6	13	2723.97	338.98	0.0000
Intra grupos	112.5	14	8.03571		
Total (Corr.)	35524.1	27			

*Elaboración propia*

**Tabla N° 4.6.- Análisis de varianza para el crecimiento en placa de hongos xilófagos en medio de cultivo con Novacrom negro 250 ppm al día 8.**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	41511.6	13	3193.2	715.28	0.0000
Intra grupos	62.5	14	4.46429		
Total (Corr.)	41574.1	27			

*Elaboración propia*

Una vez demostrada estadísticamente la diferencia entre el crecimiento en placa de hongos xilófagos en presencia de los colorantes Synozol Amarillo, Synozol Rojo y Novacrom negro, se procedió a identificar cuáles de estas cepas presentaban un crecimiento diferente entre ellas, para lo cual se realizó la prueba de múltiples rangos de LSD de Fisher la cual se detalla en extenso en el ANEXO N°03 y se resume en la Tabla 4.7 con superíndices. Aquellas con la misma letra corresponden a cepas con un crecimiento similar, por tanto se seleccionó para Synozol Amarillo a 1500 ppm las cepas 32, 20 y 15; para la concentración de 250 ppm a las cepas 32, 15 y 20. A su vez las cepas seleccionadas para el colorante Synozol rojo fueron a 1500 ppm las cepas 15,32 y 2; para 250 ppm las cepas 2, 32 y 15. Finalmente para el colorante Novacrom negro las cepas seleccionadas a 1500 ppm fueron la 15, 2 y 32; y para la concentración de 250 ppm las cepas 2, 15 y 32.

De este análisis se pudo seleccionar finalmente a las cepas 32 y 15 puesto que fueron las que presentaron mayor crecimiento en cada una de las 6 condiciones ensayadas , tres colorantes y dos concentraciones.

Tabla N° 4.7.- Crecimiento en placa de hongos xilófagos en medio de cultivo con diferentes concentraciones de colorante (Día 8)

CEPA	Synosol Amarillo			Synosol Rojo			Novacrom negro		
	1500 ppm	250 ppm	1500 ppm	250 ppm	1500 ppm	250 ppm	1500 ppm	250 ppm	
C2	75.00+/-2.4821 <sup>d</sup>	82.50+/-5.2654 <sup>bc</sup>	82.50+/-3.0400 <sup>b</sup>	100.00+/-1.0132 <sup>a</sup>	85.00+/-3.0400 <sup>a</sup>	100.00+/-2.2659 <sup>a</sup>			
C7	0.00+/-2.4821 <sup>i</sup>	0.00+/-5.2654 <sup>f</sup>	0.00+/-3.0400 <sup>f</sup>	0.00+/-1.0133 <sup>g</sup>	0.00+/-3.0400 <sup>e</sup>	0.00+/-2.2659 <sup>f</sup>			
C9	50.00+/-2.4821 <sup>g</sup>	50.00+/-5.2654 <sup>d</sup>	70.00+/-3.0400 <sup>c</sup>	82.50+/-1.0133 <sup>c</sup>	75.00+/-3.0400 <sup>b</sup>	75.00+/-2.2658 <sup>c</sup>			
C10	0.00+/-2.4821 <sup>i</sup>	0.00+/-5.2654 <sup>f</sup>	0.00+/-3.0400 <sup>f</sup>	0.00+/-1.0133 <sup>g</sup>	0.00+/-3.0400 <sup>e</sup>	0.00+/-2.2659 <sup>f</sup>			
C14	60.00+/-2.4821 <sup>f</sup>	75.00+/-5.2654 <sup>c</sup>	55.00+/-3.0400 <sup>d</sup>	75.00+/-1.0133 <sup>d</sup>	75.00+/-3.0400 <sup>b</sup>	75.00+/-2.2658 <sup>c</sup>			
C15	92.50+/-2.4821 <sup>bc</sup>	100.00+/-5.2652 <sup>a</sup>	90.00+/-3.0400 <sup>a</sup>	90.00+/-1.0133 <sup>b</sup>	90.00+/-3.0400 <sup>a</sup>	100.00+/-2.2659 <sup>a</sup>			
C18	67.50+/-2.4821 <sup>e</sup>	75.00+/-5.2654 <sup>c</sup>	60.00+/-3.0400 <sup>d</sup>	60.00+/-1.0133 <sup>e</sup>	60.00+/-3.0400 <sup>c</sup>	60.00+/-2.2658 <sup>d</sup>			
C19	90.00+/-2.4821 <sup>c</sup>	77.50+/-5.2654 <sup>bc</sup>	75.00+/-3.0400 <sup>c</sup>	75.00+/-1.0133 <sup>d</sup>	75.00+/-3.0400 <sup>b</sup>	75.00+/-2.2658 <sup>c</sup>			
C20	95.00+/-2.4821 <sup>b</sup>	87.50+/-5.2654 <sup>b</sup>	75.00+/-3.0400 <sup>c</sup>	75.00+/-1.0133 <sup>d</sup>	72.50+/-3.0400 <sup>b</sup>	72.50+/-2.2658 <sup>c</sup>			
C21	40.00+/-2.4821 <sup>h</sup>	50.00+/-5.2654 <sup>d</sup>	25.00+/-3.0400 <sup>e</sup>	25.00+/-1.0133 <sup>f</sup>	25.00+/-3.0400 <sup>d</sup>	25.00+/-2.2658 <sup>e</sup>			
C25	0.00+/-2.4821 <sup>i</sup>	25.00+/-5.2654 <sup>e</sup>	0.00+/-3.0400 <sup>f</sup>	25.00+/-1.0133 <sup>f</sup>	25.00+/-3.0400 <sup>d</sup>	25.00+/-2.2658 <sup>e</sup>			
C26	0.00+/-2.4821 <sup>i</sup>	0.00+/-5.2654 <sup>f</sup>	0.00+/-3.0400 <sup>f</sup>	0.00+/-1.0133 <sup>g</sup>	0.00+/-3.0400 <sup>e</sup>	0.00+/-2.2659 <sup>f</sup>			
C27	0.00+/-2.4821 <sup>i</sup>	0.00+/-5.2654 <sup>f</sup>	0.00+/-3.0400 <sup>f</sup>	0.00+/-1.0133 <sup>g</sup>	0.00+/-3.0400 <sup>e</sup>	0.00+/-2.2659 <sup>f</sup>			
C32	100.00+/-2.4821 <sup>a</sup>	100.00+/-5.2652 <sup>a</sup>	85.00+/-3.0400 <sup>ab</sup>	100.00+/-1.0132 <sup>a</sup>	85.00+/-3.0400 <sup>a</sup>	95.00+/-2.2658 <sup>b</sup>			

Fuente: Elaboración Propia

### 4.2.3 Identificación de Hongos Xilófagos

En la figura N° 4.9 se observan las cepas N° 15 y cepa N°32 en su estado natural (Selva de Madre de Dios).

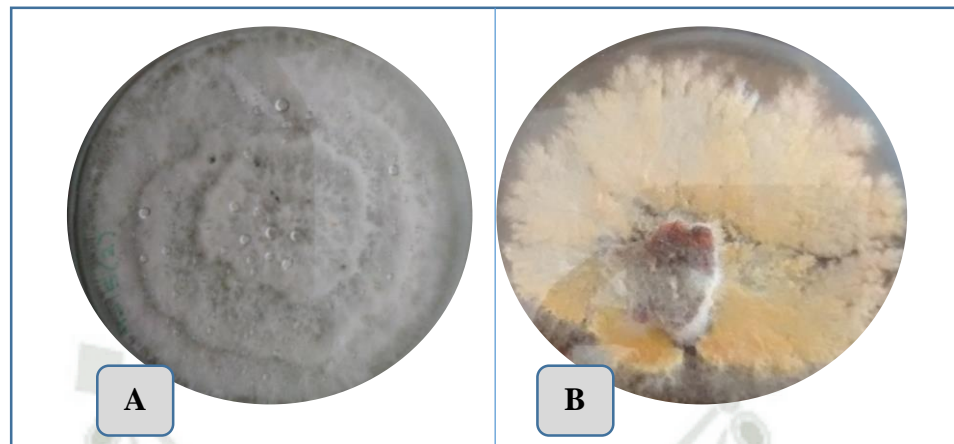


**Figura N° 4.9.- A) Hongo en habitat natural cepa N° 15, B) Hongo en habitat natural cepa N° 32**

Según sus características externas el hongo de la Cepa N° 15 mide aproximadamente de 3 a 6 cm de alto, presenta una coloración blanco cremoso. Presenta un cuerpo fructífero con las siguientes características: Pileo o sombrero de tipo plano, Cutícula de tipo aterciopelada que es la piel o membrana más fina que recubre toda la porción superior del sombrero, por ende es responsable del color que se observa del sombrero, Himenio de tipo laminar el cual está situado en la parte inferior del sombrero y la más importante del cuerpo fructífero, ya que en él se forman las esporas, Estipite o pie Atenuado en la base. Una vez sembrado en placa medio PDA la cepa presenta micelio color blanco algo denso y se observan como círculos más marcados.

Para la Cepa N° 32, el hongo de color marrón presenta un tallo delgado. Su forma es como una sombrilla. Presenta un cuerpo fructífero con las siguientes características: Pileo o sombrero de tipo campalunado, Cutícula de tipo aterciopelada, Himenio de tipo laminar, Estipite o pie Atenuado en la base. Una vez sembrado en placa medio PDA, el micelio es de color beige – marrón y parece felpa.

En la figura N° 4.10 se observa la cepa N° 15 y 32 en agar sólido PDA.



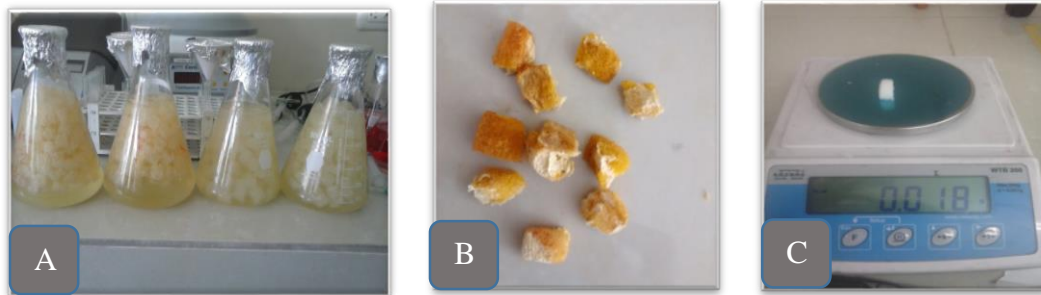
**Figura N° 4.10.- A) Cepa N° 15 en medio sólido PDA, B) Cepa N° 32 en medio sólido PDA**

La identificación de los hongos aislados se dio por el método Molecular. La extracción de ADN se dio en el Laboratorio “ADN Uchumayo” y la secuenciación en Estados Unidos. La secuencia para la cepa N° 15 tuvo una identidad del 99% con varias secuencias de *Pestalotiopsis microspora* en la base del NCBI. Para la cepa N° 32 la secuencia tuvo una identidad del 90% correspondiente a *Sepedonium sp.*

### **4.3 Evaluación de la espuma de poliuretano como soporte de inmovilización**

#### **4.3.1 Inmovilización de hongo xilófago en medio líquido**

Se escogió espuma de poliuretano como soporte de inmovilización pues no contiene grupos amino, carboxil, nutrientes, entre otros. La inmovilización se hizo en matraces con medio mineral *Radha* más Sacarosa ya que la espuma de poliuretano es un carrier sintético.



**Figura N° 4.11.- A) Inmovilización en espuma de poliuretano de las Cepas 15 y 32 en medio mineral adicionado con Sacarosa, B) Cepa Fúngica inmovilizada en espuma de poliuretano, C) Cuadradito de espuma de poliuretano de 0.018 g.**

Durante la evaluación, se tomaron muestras al día 0, 1, 2, 3, 4, 5 y se determinó la colonización de la fibra al día N° 04 por medio de la técnica de peso seco las cuales pasaron de un peso de 0.018 g cada cuadradito de espuma de poliuretano, a un peso de 0.030 g en promedio para ambas cepas. Así mismo pudo observarse que los cuadraditos de espuma de poliuretano estaban cubiertos por hifas de las cepas fúngicas.

Como inmovilización, es considerada la ubicación física de células en un espacio o región específica, en la cual de forma natural o inducida, los organismos inmovilizados son capaces de mantener una actividad catalítica deseada <sup>24</sup>. La región sobre la cual se desea inmovilizar a un organismo, debe tener ciertas características como presentar superficies de adherencia amplias, de fácil operación, buena porosidad; de esta forma permitirá que la adherencia y colonización sea efectiva ya que una alta porosidad aumenta la circulación de sustancias como oxígeno, nutrientes, agua. Adicionalmente permite que las cepas fúngicas presenten mejor extensión apical entre los poros, generando una red de hifas que le dará sostén y mayor cantidad de biomasa inmovilizada <sup>24</sup>.

#### 4.3.2 Selección de longitud de onda de mayor absorción para cada colorante

Se determinaron los espectros de absorción de los colorantes evaluados basándose en una concentración de 40 ppm, así mismo, se realizaron las curvas de calibración para cada uno de los colorantes empleando soluciones a diferentes concentraciones iniciando en 3.125 ppm hasta 50 ppm. Para cada colorante se tuvo en cuenta los valores de absorbancia de la tabla N°4.8.

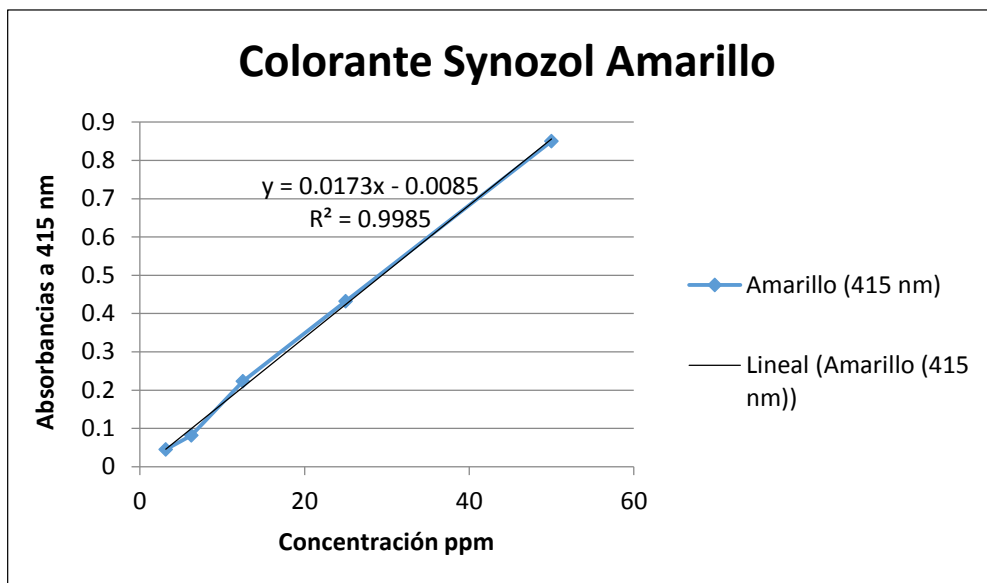
Se determinó la longitud de onda de máxima absorción para cada colorante tomando en cuenta los 3 pH diferentes; para el caso del colorante Synozol Amarillo, se determinó una longitud de onda máxima de 415 nm para los 3 pH (6,8 y 10). Para el caso del colorante Synozol Rojo, se determinó una longitud de onda máxima de 540 nm para pH 6 y pH 8, sin embargo, para el pH 10 la máxima longitud de onda es de 515 nm.

Estudios de algunos autores como Kim y colaboradores <sup>44</sup> demostraron que la variación de factores como pH, puede causar variaciones en el rango máximo de absorción de cada colorante, es así que se ve que para el colorante Synozol rojo hay una diferencia de longitud de onda para el pH 10. Para el caso del colorante Novacrom Negro la longitud de onda máxima es de 595 nm para los 3 pH (6, 8 y 10). Los datos de absorbancia pueden observarse en el ANEXO N° 05.

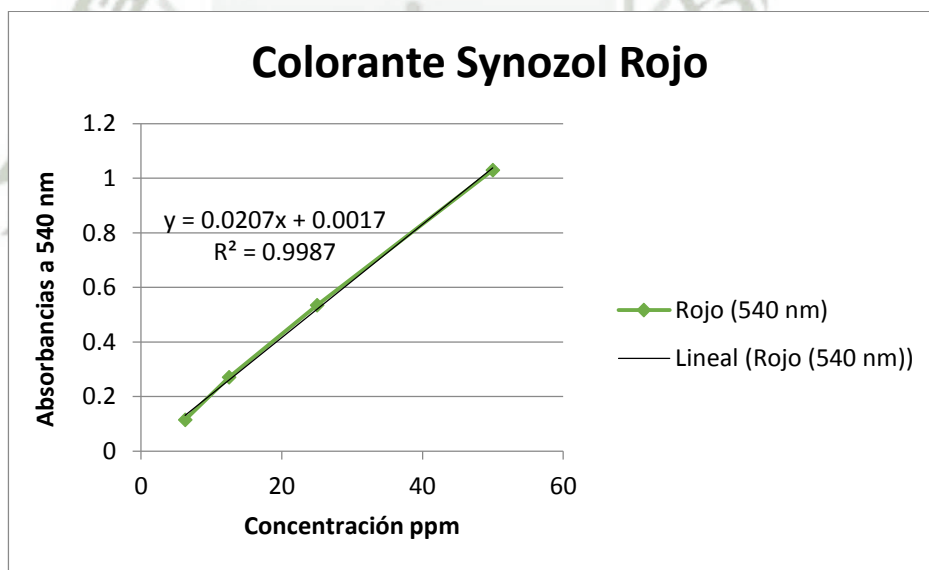
En la tabla N° 4.8 se presenta un resumen de las máximas longitudes de onda para cada colorante teniendo en cuenta el pH.

**Tabla N° 4.8.- Resumen de las máximas longitudes de onda para cada colorante**

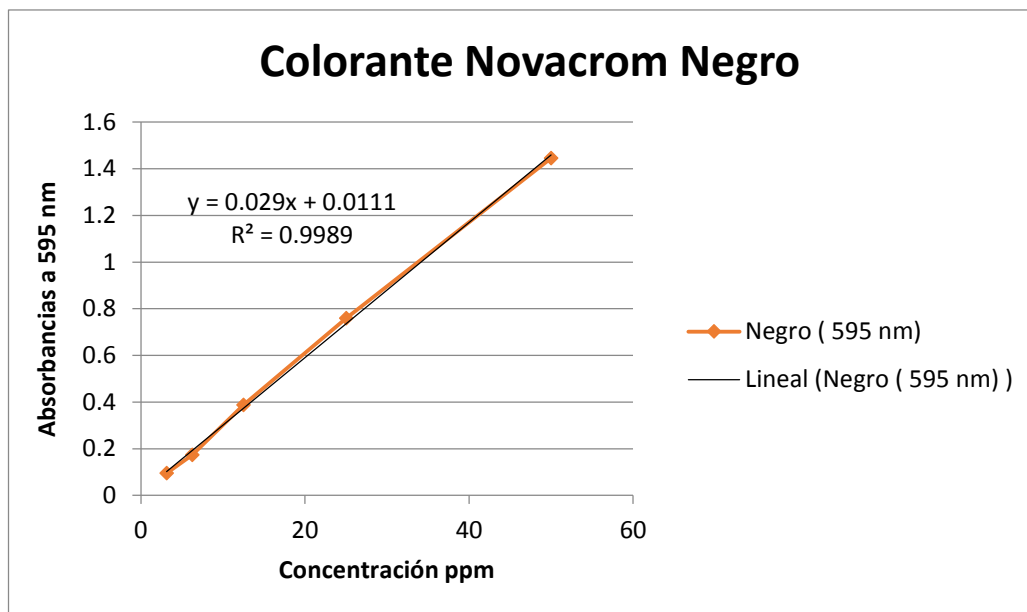
<b>Colorante</b> <b>pH</b>	<b>Synozol Amarillo</b> <b>(nm)</b>	<b>Synozol Rojo</b> <b>(nm)</b>	<b>Novacrom Negro</b> <b>(nm)</b>
<b>6</b>	415	540	595
<b>8</b>	415	540	595
<b>10</b>	415	515	595



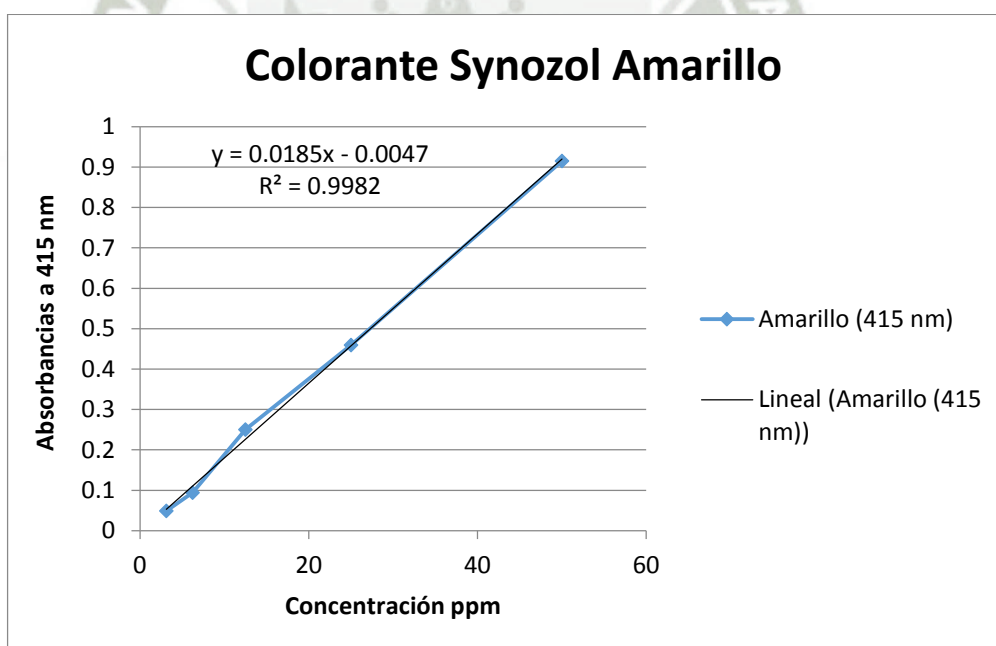
**Figura N° 4.12.-** Curva de Calibración para colorante Synozol Amarillo,  $\lambda$  415 nm para pH 6



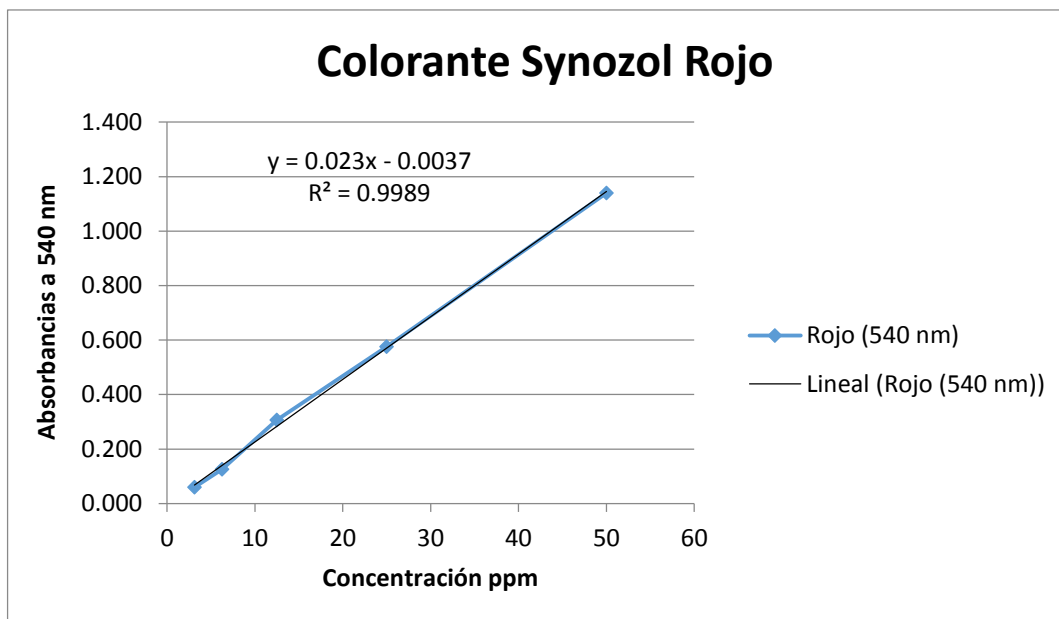
**Figura N° 4.13.-** Curva de Calibración para colorante Synozol Rojo,  $\lambda$  540 nm para pH 6



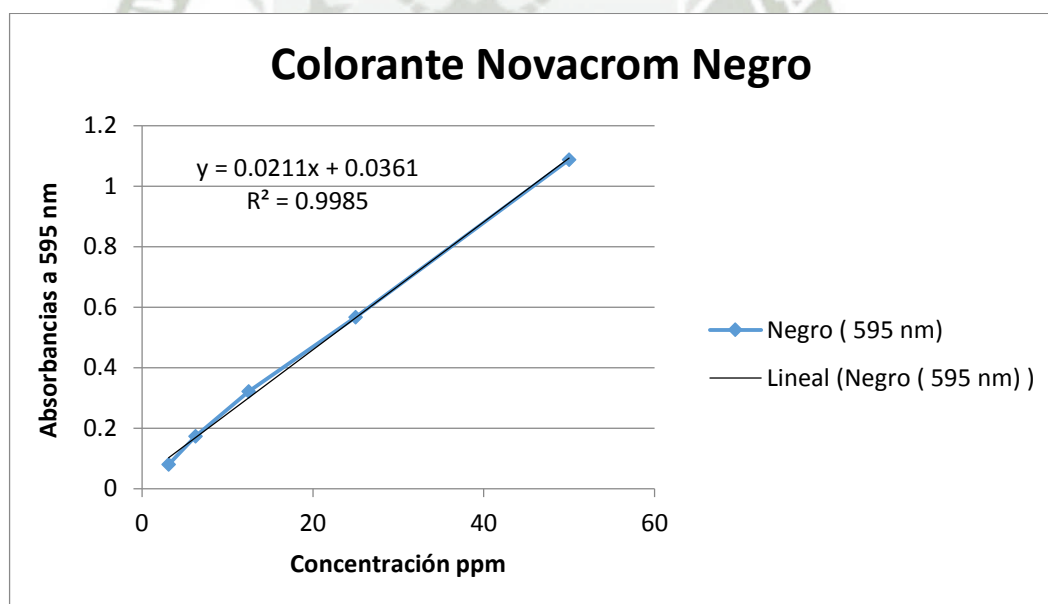
**Figura N° 4.14.- Curva de Calibración para colorante Novacrom negro,  $\lambda$  595 nm para pH 6**



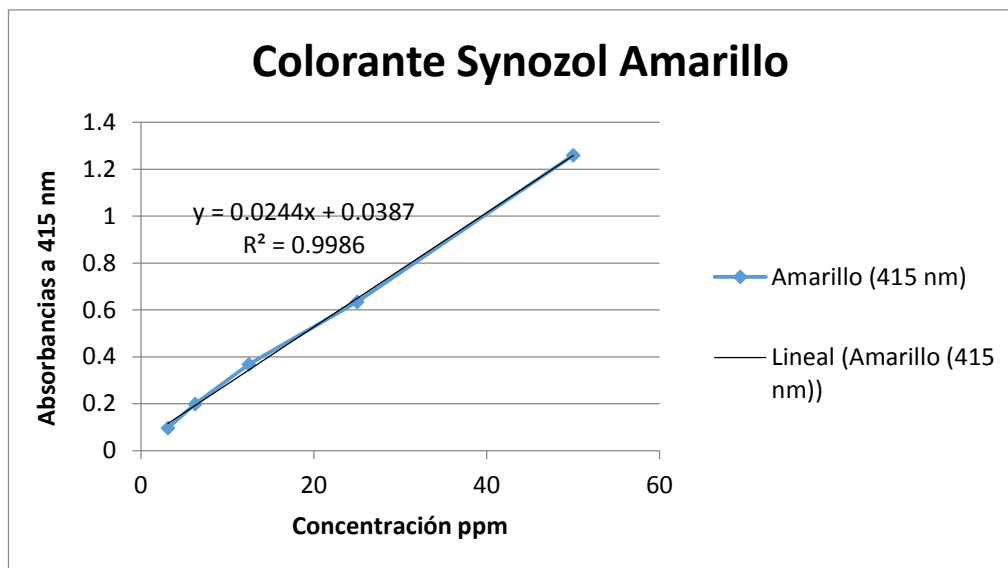
**Figura N° 4.15.- Curva de Calibración para colorante Synozol Amarillo,  $\lambda$  415 nm para pH 8**



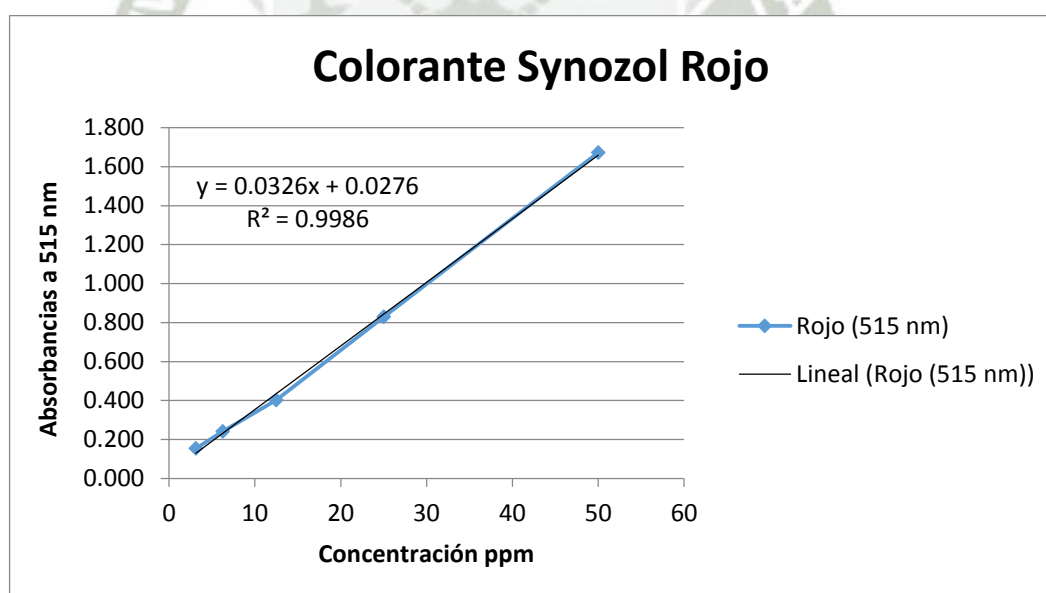
**Figura N° 4.16.-** Curva de Calibración para colorante Synozol Rojo,  $\lambda$  540 nm para pH 8



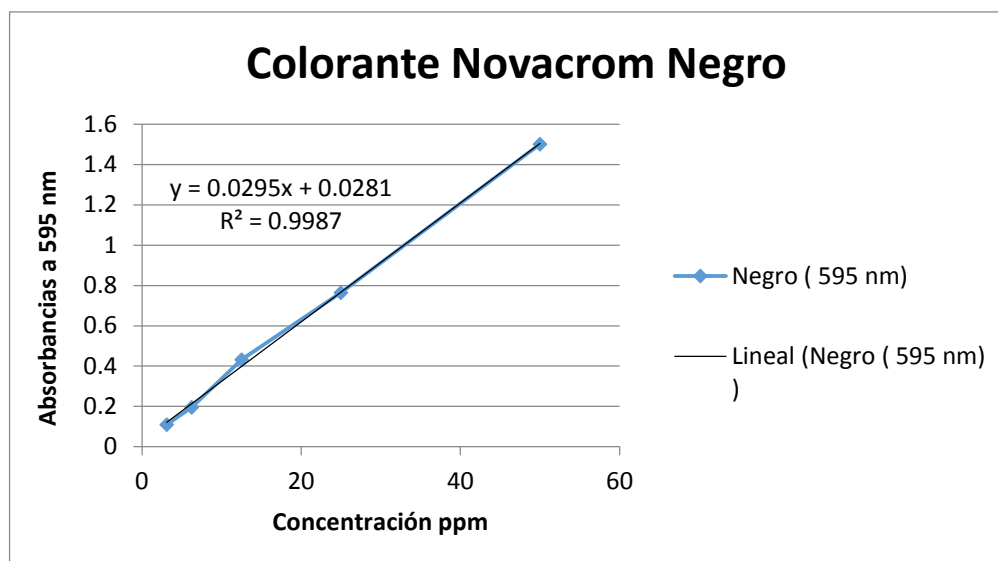
**Figura N° 4.17.-** Curva de Calibración para colorante Novacrom Negro,  $\lambda$  595 nm para pH 8



**Figura N° 4.18.-** Curva de Calibración para colorante Synozol Amarillo,  $\lambda$  415 nm para pH10



**Figura N° 4.19.-** Curva de Calibración para colorante Synozol Rojo,  $\lambda$  515 nm para pH 10



**Figura N° 4.20.- Curva de Calibración para colorante Novacrom Negro,  $\lambda$  595 nm para pH 10**

#### 4.3.3 Pruebas de Absorción de Espuma de poliuretano

Se realizaron las pruebas con cada uno de los colorantes con una concentración de 40 ppm colocando cuadraditos de espuma de poliuretano sin hongo.

En la tabla N° 4.9 se observa datos de absorbancia de cada colorante a una concentración de 40 ppm, mientras que en la tabla N° 4.10 se observa datos de concentración ppm a partir de las absorbancias de la tabla N° 4.9.

Diariamente por 7 días se evaluó si la absorbancia de la solución con colorante disminuía.

Se observó que para el día número 01 en los 3 casos (colorante Synozol Amarillo, Synozol Rojo y Novacrom Negro) hay una variación insignificativa en las absorbancias con respecto a la absorbancia inicial. Al ser insignificativo no altera la evaluación en general. Al momento de convertir absorbancia en ppm los resultados no varían es por eso que se dice que el cambio es insignificativo.

**Tabla N° 4.9.- Pruebas de Absorción de espuma de Poliuretano por 7 días  
(Absorbancias)**

<i>Absorción de espuma de poliuretano</i>							
<b>Colorante</b>	<i>Día ( Absorbancias)</i>						
	<i>01</i>	<i>02</i>	<i>03</i>	<i>04</i>	<i>05</i>	<i>06</i>	<i>07</i>
Synozol Amarillo	0.715	0.703	0.701	0.701	0.701	0.701	0.701
Synozol Rojo	0.827	0.812	0.810	0.810	0.809	0.809	0.808
Novacrom Negro	0.894	0.871	0.869	0.866	0.865	0.865	0.865

*Elaboración Propia*

**Tabla N° 4.10.- Pruebas de Absorción de espuma de Poliuretano por 7 días  
(ppm)**

<i>Absorción de espuma de poliuretano</i>							
<b>Colorante</b>	<i>Día ( Concentración ppm)</i>						
	<i>01</i>	<i>02</i>	<i>03</i>	<i>04</i>	<i>05</i>	<i>06</i>	<i>07</i>
Synozol Amarillo	41.82	41.13	41.01	41.01	41.01	41.01	41.01
Synozol Rojo	39.87	39.14	39.05	39.05	39.00	39.00	38.95
Novacrom Negro	40.66	39.57	39.47	39.33	39.28	39.28	39.28

*Elaboración propia*

#### **4.4 Evaluación de la influencia de los factores cepa, aireación, pH, colorante y temperatura sobre la remoción de colorantes**

Para identificar la relación entre los factores que pueden interferir en la remoción de los colorantes: a) cepa, b) aireación, c) pH, d) colorante y e) temperatura, se armó el sistema de decoloración como se menciona en la metodología. Cada matraz contiene hongo inmovilizado en espuma de poliuretano (12 cuadraditos). Primero se armó el sistema con aireación. A continuación en la figura N° 4.21 se muestra el sistema armado sin funcionar, tanto para temperatura a 35 °C (matraces dentro de incubadora) y para temperatura ambiente.



**Figura N° 4.21.- Sistema de matraces para pruebas de decoloración (temperatura ambiente y a 35 °C (dentro de incubadora)).**

Se puede observar los matraces con tapones de caucho en la parte superior como se explicó en metodología. Se colocaron llaves plásticas las que sirvieron para controlar aireación proveniente de los motores de pecera.



**Figura N° 4.22.- Matraces con sistema de aireación a 35°C.**

En la figura anterior se puede observar que cada matraz tiene un orificio en la tapa de caucho para colocar una jeringa de 5 ml. Por medio de esta jeringa, diariamente por 7 días se extrajo una muestra de cada solución (4 ml) para luego centrifugarla a 4000 rpm por 5 minutos, y de esta manera tener la solución lista para ser leída en el espectrofotómetro a la longitud de onda correspondiente para cada colorante.



**Figura N° 4.23.- Pellet en la base del tubo después de centrifugar**

Se puede observar en la figura N° 4.23 un pellet en la base del tubo donde se centrifugó el colorante en este caso Synozol Amarillo. Si no se hubiera centrifugado las lecturas en el espectrofotómetro hubieran sido erróneas.

Se realizó el mismo procedimiento con el sistema de matraces pero el factor aireación fue anulado, sin embargo los demás factores permanecen igual.

Para identificar la influencia de la aireación, pH, tipo de colorante y temperatura sobre la remoción de color por parte de las cepas seleccionadas, cepa 15 y cepa 32, se desarrolló una matriz experimental de tipo factorial mostradas en las Tabla 4.12, la cual fue desarrollada para cada cepa por separado, así mismo los diferentes niveles de cada factor se muestran en la Tabla 4.11.

**Tabla N° 4.11. Factores y niveles considerados para la elaboración de la matriz factorial experimental en la evaluación de remoción de colorantes.**

<b>FACTORES</b>	<b>NIVELES</b>
<b>Aireación</b>	Con aireación Sin aireación
<b>pH</b>	6 8 10
<b>Colorante</b>	Synozol Amarillo (Amarillo) Synozol Rojo (Rojo) Novacrom Negro (Negro )
<b>Temperatura</b>	T°. Ambiente 35°C

*Elaboración Propia*

La matriz experimental (Tabla 4.12) fue desarrollada para cada cepa, evaluando la concentración en ppm de la solución remanente en la cual se puede identificar la concentración final luego del tratamiento, tal y como se muestra en las Tablas 4.13 y 4.14 para la cepa 15 y 32 respectivamente.

El análisis de Múltiple factor categórico fue realizado estadísticamente, teniendo a aireación, colorante y temperatura como factores categóricos y a pH como factor cuantitativo, así mismo se hace incapié en que la concentración inicial de cada matraz fue 40 ppm del colorante respectivo.

**Tabla N° 4.12.- Matriz experimental desarrollada para la evaluación de la remoción de color por la cepa 15 y 32 independientemente.**

<b>AIREACIÓN</b>	<b>pH</b>	<b>COLORANTE</b>	<b>TEMPERATURA</b>
Con aireación	6	Amarillo	T.Ambiente
Con aireación	6	Amarillo	35°C
Con aireación	6	Rojo	T.Ambiente
Con aireación	6	Rojo	35°C
Con aireación	6	Negro	T.Ambiente
Con aireación	6	Negro	35°C
Con aireación	8	Amarillo	T.Ambiente
Con aireación	8	Amarillo	35°C
Con aireación	8	Rojo	T.Ambiente
Con aireación	8	Rojo	35°C
Con aireación	8	Negro	T.Ambiente
Con aireación	8	Negro	35°C
Con aireación	10	Amarillo	T.Ambiente
Con aireación	10	Amarillo	35°C
Con aireación	10	Rojo	T.Ambiente
Con aireación	10	Rojo	35°C
Con aireación	10	Negro	T.Ambiente
Con aireación	10	Negro	35°C
Sin aireación	6	Amarillo	T.Ambiente
Sin aireación	6	Amarillo	35°C
Sin aireación	6	Rojo	T.Ambiente
Sin aireación	6	Rojo	35°C
Sin aireación	6	Negro	T.Ambiente
Sin aireación	6	Negro	35°C
Sin aireación	8	Amarillo	T.Ambiente
Sin aireación	8	Amarillo	35°C
Sin aireación	8	Rojo	T.Ambiente
Sin aireación	8	Rojo	35°C
Sin aireación	8	Negro	T.Ambiente
Sin aireación	8	Negro	35°C
Sin aireación	10	Amarillo	T.Ambiente
Sin aireación	10	Amarillo	35°C
Sin aireación	10	Rojo	T.Ambiente
Sin aireación	10	Rojo	35°C
Sin aireación	10	Negro	T.Ambiente
Sin aireación	10	Negro	35°C

*Elaboración propia*

**Tabla N° 4.13.- Concentraciones (ppm) medidas al séptimo día de evaluación de la Cepa 15 en condiciones controladas de laboratorio.**

AIREACIÓN	pH	COLORANTE	TEMPERATURA	CONCENTRACIÓN PPM
Con aireación	6	Amarillo	T.Ambiente	19.36
Con aireación	6	Amarillo	35°C	18.56
Con aireación	6	Rojo	T.Ambiente	24.39
Con aireación	6	Rojo	35°C	20.57
Con aireación	6	Negro	T.Ambiente	17.44
Con aireación	6	Negro	35°C	18.58
Con aireación	8	Amarillo	T.Ambiente	20.67
Con aireación	8	Amarillo	35°C	19.41
Con aireación	8	Rojo	T.Ambiente	23.05
Con aireación	8	Rojo	35°C	19.88
Con aireación	8	Negro	T.Ambiente	16.44
Con aireación	8	Negro	35°C	21.15
Con aireación	10	Amarillo	T.Ambiente	20.03
Con aireación	10	Amarillo	35°C	15.73
Con aireación	10	Rojo	T.Ambiente	21.22
Con aireación	10	Rojo	35°C	18.55
Con aireación	10	Negro	T.Ambiente	22.26
Con aireación	10	Negro	35°C	16.73
Sin aireación	6	Amarillo	T.Ambiente	7.68
Sin aireación	6	Amarillo	35°C	6.73
Sin aireación	6	Rojo	T.Ambiente	20.57
Sin aireación	6	Rojo	35°C	17.79
Sin aireación	6	Negro	T.Ambiente	10.14
Sin aireación	6	Negro	35°C	6.15
Sin aireación	8	Amarillo	T.Ambiente	10.86
Sin aireación	8	Amarillo	35°C	15.00
Sin aireación	8	Rojo	T.Ambiente	15.28
Sin aireación	8	Rojo	35°C	14.53
Sin aireación	8	Negro	T.Ambiente	12.52
Sin aireación	8	Negro	35°C	11.14
Sin aireación	10	Amarillo	T.Ambiente	13.65
Sin aireación	10	Amarillo	35°C	10.90
Sin aireación	10	Rojo	T.Ambiente	21.14
<b>Sin aireación</b>	10	Rojo	35°C	18.13
<b>Sin aireación</b>	10	Negro	T.Ambiente	16.96
<b>Sin aireación</b>	10	Negro	35°C	15.36

*Elaboración Propia*

**Tabla N°4.14.- Concentraciones (ppm) medidas al séptimo día de evaluación de la Cepa 32 en condiciones controladas de laboratorio.**

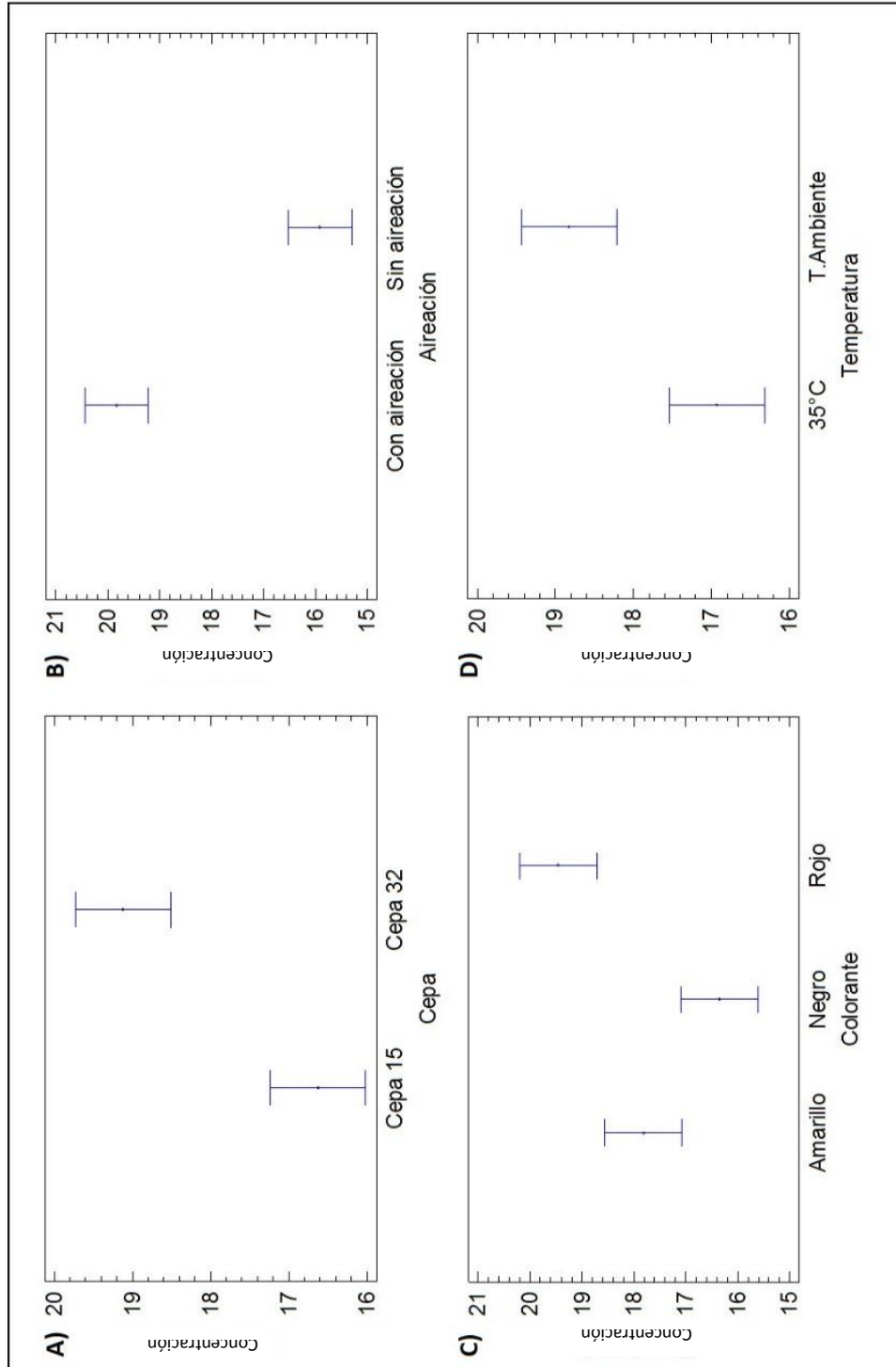
AIREACIÓN	pH	COLORANTE	TEMPERATURA	CONCENTRACIÓN PPM
Con aireación	6	Amarillo	T.Ambiente	23.33
Con aireación	6	Amarillo	35°C	18.91
Con aireación	6	Rojo	T.Ambiente	21.57
Con aireación	6	Rojo	35°C	16.92
Con aireación	6	Negro	T.Ambiente	11.79
Con aireación	6	Negro	35°C	13.60
Con aireación	8	Amarillo	T.Ambiente	26.34
Con aireación	8	Amarillo	35°C	18.48
Con aireación	8	Rojo	T.Ambiente	21.48
Con aireación	8	Rojo	35°C	19.84
Con aireación	8	Negro	T.Ambiente	25.43
Con aireación	8	Negro	35°C	17.11
Con aireación	10	Amarillo	T.Ambiente	24.11
Con aireación	10	Amarillo	35°C	19.92
Con aireación	10	Rojo	T.Ambiente	21.06
Con aireación	10	Rojo	35°C	21.19
Con aireación	10	Negro	T.Ambiente	19.06
Con aireación	10	Negro	35°C	19.73
Sin aireación	6	Amarillo	T.Ambiente	18.06
Sin aireación	6	Amarillo	35°C	16.18
Sin aireación	6	Rojo	T.Ambiente	17.96
Sin aireación	6	Rojo	35°C	15.67
Sin aireación	6	Negro	T.Ambiente	20.37
Sin aireación	6	Negro	35°C	15.23
Sin aireación	8	Amarillo	T.Ambiente	19.97
Sin aireación	8	Amarillo	35°C	18.85
Sin aireación	8	Rojo	T.Ambiente	17.03
Sin aireación	8	Rojo	35°C	16.02
Sin aireación	8	Negro	T.Ambiente	12.40
Sin aireación	8	Negro	35°C	16.47
Sin aireación	10	Amarillo	T.Ambiente	23.27
Sin aireación	10	Amarillo	35°C	21.58
Sin aireación	10	Rojo	T.Ambiente	22.49
Sin aireación	10	Rojo	35°C	20.56
Sin aireación	10	Negro	T.Ambiente	18.13
Sin aireación	10	Negro	35°C	18.24

*Elaboración Propia*

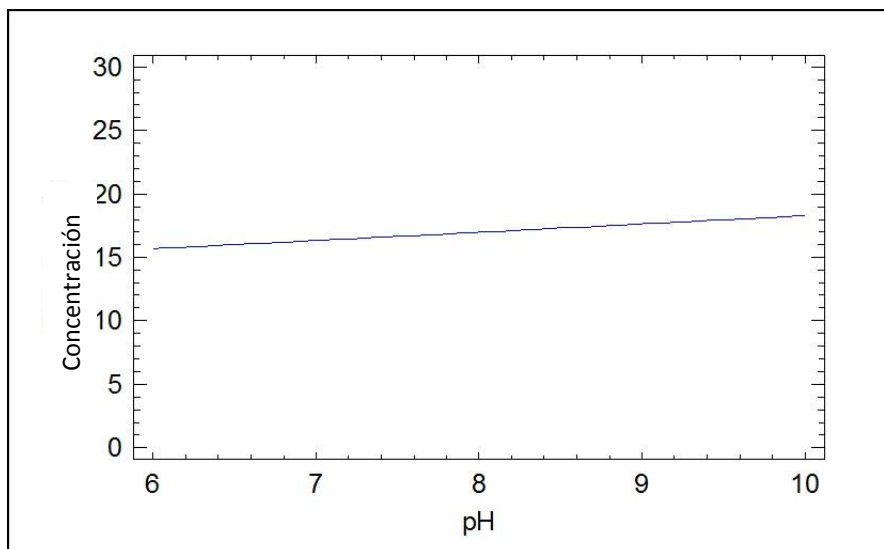
En la Figura 4.24 se muestra las concentraciones medias para cada uno de los factores categóricos evaluados, así se puede observar en A) que la cepa 15 logro una concentración final promedio de 16.63 ppm versus 19.12 ppm para la cepa 32, lo cual significa una reducción en el efluente de aproximadamente 23ppm por parte de la cepa 15. Así mismo en B) se observa la respuesta media del factor aireación, identificando claramente que el mejor tratamiento fue sin aireación puesto que la concentración final media del efluente fue de 15.92ppm versus 19.84 ppm de los tratamientos con aireación. En c) se muestra el factor colorante en la cual se evidencia que el colorante rojo sufrió un menor grado de decoloración (19.46 ppm) seguido de el colorante amarillo (17.82 ppm) y finalmente del colorante negro (16.36 ppm); en el caso de la Temperatura mostrada en D), se observa que hubo una mayor decoloración a 35 °C (16.93 ppm) que a temperatura ambiente (18.82 ppm).

Por su parte la influencia del factor pH generó una reducción en la remoción de que la variación en el rango de pH 6 a 10, fue de 16.5 a 19.1 ppm (Figura 4.25)

Gráficamente se pudo especular las mejores condiciones de trabajo las cuales corresponderían a realizarse con la cepa 15, sin aireación, a 35 °C, en presencia del colorante negro y a pH 6. Sin embargo fue necesario identificar la significancia de cada factor y evaluar las posibles interacciones que podían existir entre ellos, para lo cual se realizó un Análisis de varianza el cual se muestra en la Tabla 4.15. En dicha tabla se puede identificar los factores principales A: Cepa, B: Aireación, C: pH, D: Colorante, E: Temperatura y la combinación de dos letras representa la interacción, se pudo observar que todos los factores principales fueron significativos en el sistema (valor- $p < 0.05$ ) así como también las interacciones cepa: aireación (AB), cepa: colorante (AD) y aireación: pH (BC).



**Figura N° 4.24.- Concentraciones medias para los diferentes niveles de cada factor en estudio sobre el crecimiento de hongos xilófagos. Se muestran los factores en A) Cepas, B) Aireación, C) Colorante y D) Temperatura.**



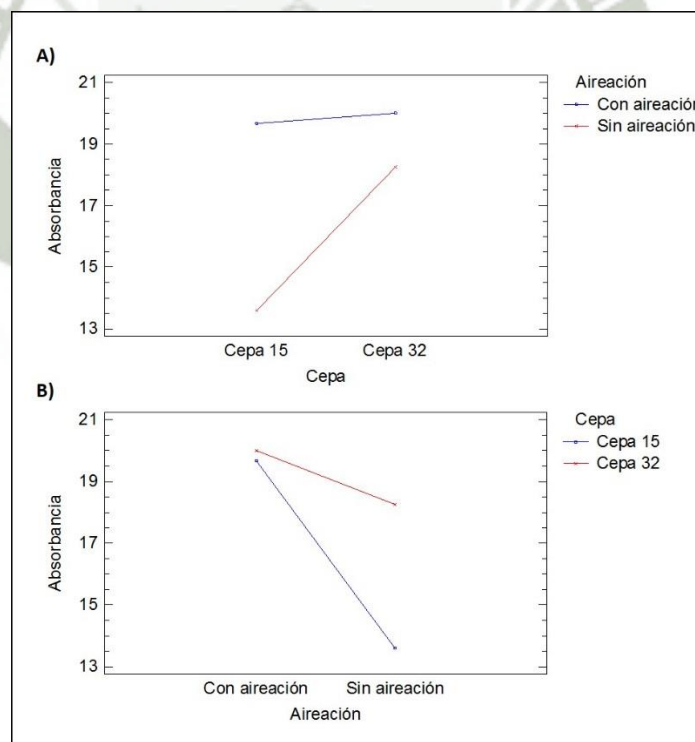
**Figura N° 4.25. Concentraciones estimadas para los diferentes niveles de pH sobre el crecimiento de hongos xilófagos**

**Tabla N° 4.15. Análisis de varianza para la concentración (ppm) en base a cinco factores predictivos y sus interacciones**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Cepa	112.152	1	112.152	18.23	0.0001
B:Aireación	275.782	1	275.782	44.84	0.0000
C:pH	81.1307	2	40.5653	6.60	0.0031
D:Colorante	115.674	2	57.837	9.40	0.0004
E:Temperatura	64.4708	1	64.4708	10.48	0.0023
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	84.7162	1	84.7162	13.77	0.0006
AC	6.06613	2	3.03307	0.49	0.6140
AD	116.635	2	58.3177	9.48	0.0004
AE	1.55817	1	1.55817	0.25	0.6172
BC	54.0449	2	27.0224	4.39	0.0181
BD	18.2659	2	9.13296	1.48	0.2374
BE	5.69008	1	5.69008	0.93	0.3413
CD	41.989	4	10.4972	1.71	0.1652
CE	5.22197	2	2.61098	0.42	0.6567
DE	5.3619	2	2.68095	0.44	0.6494
RESIDUOS	276.772	45	6.15049		
TOTAL(CORREGIDO)	1265	71			

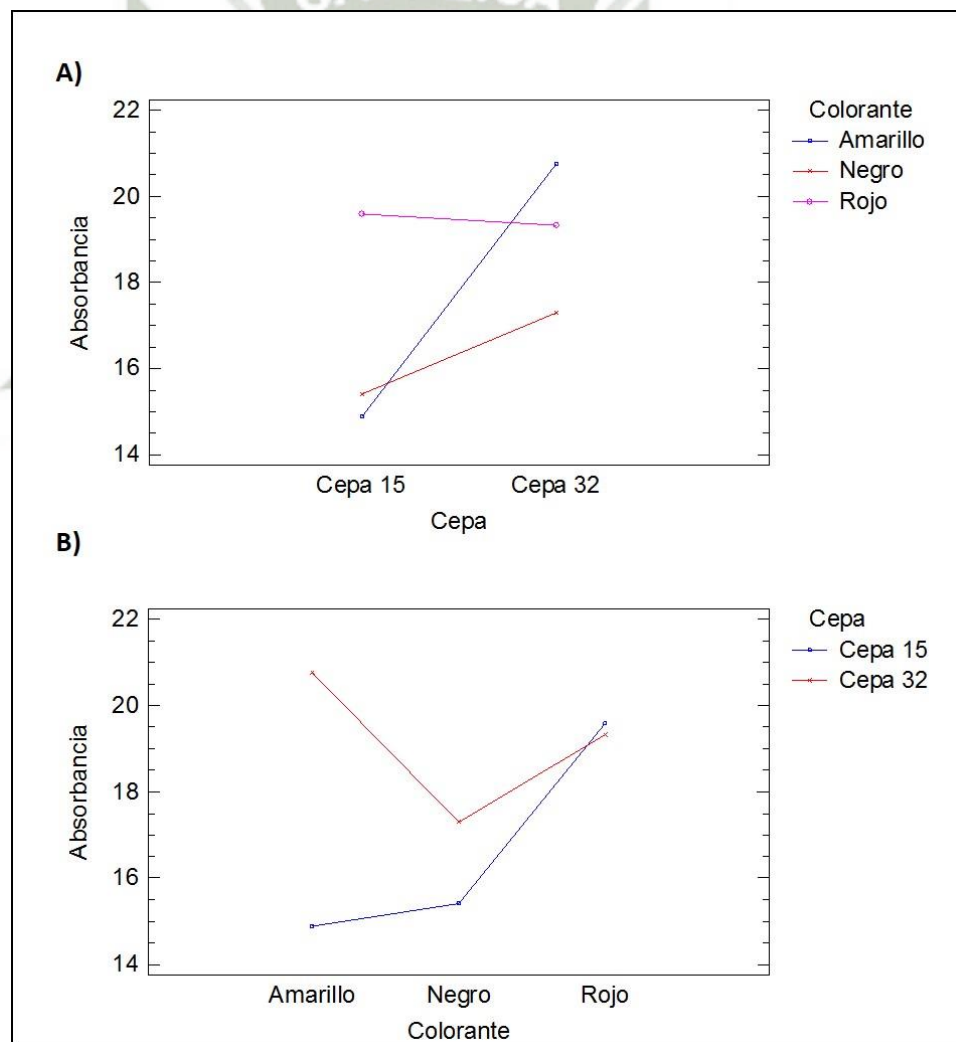
*Elaboración propia*

En la tabla N° 4.15 se observa el análisis de varianza para la concentración (ppm) en base a 5 factores predictivos (cepa, aireación, pH, temperatura, colorante) y sus interacciones en base a los datos de la tabla N° 4.13 y tabla N° 4.14 con la finalidad de evaluar cuáles de ellas no son significativas y de esta manera poder refinar el modelo matemático que se desarrolla en el apartado 4.6. En la Figura 4.26 se observa la gráfica de interacciones para cepa: aireación, en la cual se puede apreciar tanto en A) y B) que la cepa 15 cuando actúa con un sistema sin aireación presenta mayor reducción de la coloración del medio, llegando hasta aproximadamente 13 ppm a diferencia de cuándo ésta actúa en presencia de aire (20 ppm). Por su parte la cepa 32 presenta una concentración en el medio de aproximadamente 18 ppm en ausencia de aire y 20ppm en presencia de él. Se observa además que el sistema sin aireación funciona mejor con la cepa 15 comparado con la cepa 32, la primera logra concentraciones finales de 14 ppm mientras que ésta última logra reducir hasta unos 19 ppm presentes en el medio. La variación entre cepas en presencia de aire fue mínima.



**Figura N° 4.26.- Gráfica de interacciones para la los factores Cepa - Aireación**

En la Figura 4.27 se observa la gráfica de interacciones para cepa: colorante, en A) se aprecia que claramente la interacción producida entre la cepa y el colorante Amarillo, el cuál es mejor removido por la cepa 15 que por la 32, una disminución de 6 ppm aproximadamente entre las dos situaciones. EL color rojo es removido en igual cantidad tanto por la cepa 15 como por la 32. EL colorante negro también presenta mejor remoción por la cepa 15 (15 ppm). En B) se observa los mismos factores pero de manera invertida, en el eje x se muestra los colorantes; se observa como la cepa 15 degrada con mayor afinidad el colorante amarillo seguido del negro y por último el rojo, a su vez la cepa 32 remueve el colorante negro como preferente, seguido por el rojo y finalmente el amarillo, sin embargo esta reducción de color por parte de la cepa 32 es menor con respecto a la cepa 15 en todos los casos.

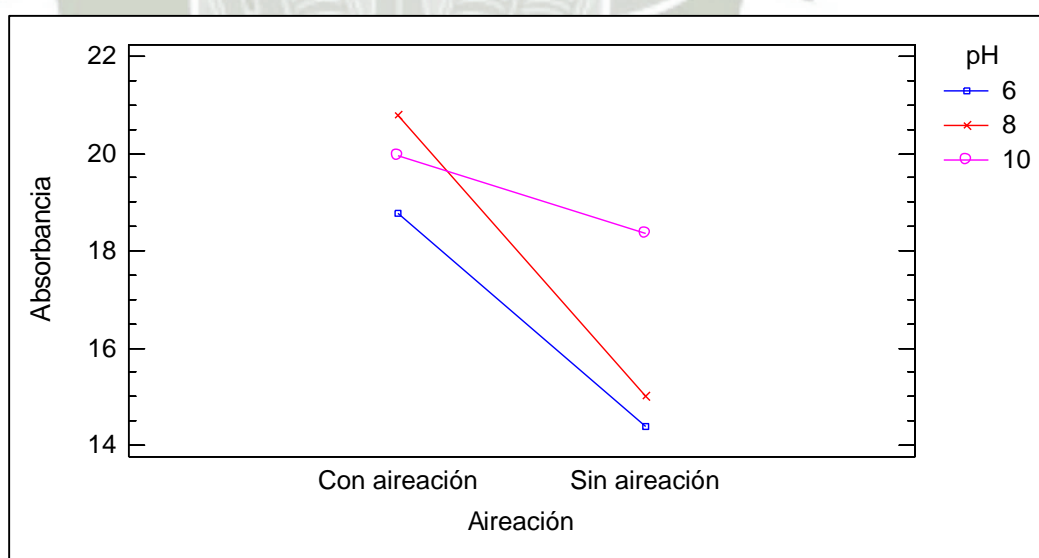


**Figura N° 4.27.- Gráfica de interacciones para los factores Cepa – Colorante**

Ésta interacción permitió conocer mejor el sistema puesto que inicialmente se especuló que el colorante Novacrom negro fue el que mejor remoción presentó se evidenció que al estar en presencia de una u otra cepa (15 o 32) su comportamiento varía. Por lo tanto se puede decir que las mejores condiciones para una decoloración eficaz en el tiempo de 7 días son: cepa N° 15, Sin aireación con respecto al colorante Synozol amarillo. Se puede comparar con la Tabla N° 4.13 donde se muestra que empleando la cepa 15, la concentración del colorante Synozol amarillo al séptimo día fue de 6.7358 ppm, a diferencia que con la cepa 32 que llegó a una concentración de 16.1809 ppm.

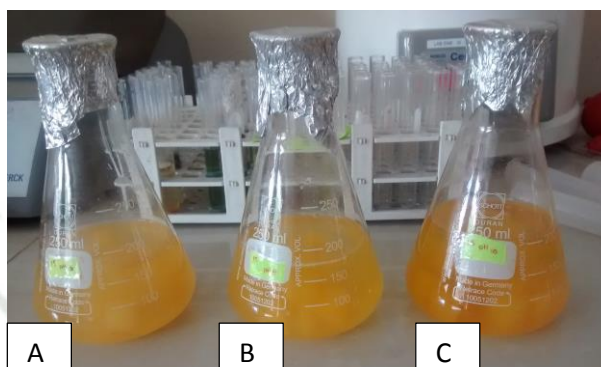
En la Figura 4.28 se observa la gráfica de interacciones para aireación: pH se pudo identificar que existe interacción entre dichos factores puesto que los sistemas con aireación lograron una remoción con concentración final de 19 ppm aproximadamente en el medio a pH 6 versus 14 ppm aproximadamente cuando se encontraban sin aireación, una variación menor existió en pH 10 con aireación (20ppm) que sin aireación (19 ppm aproximadamente)

Finalmente y luego del análisis realizado se puede indicar que las mejores condiciones de trabajo corresponden al sistema con la cepa 15, sin aireación, colorante Synozol Amarillo, pH 6 y 35°C



**Figura N° 4.28.- Gráfica de interacciones para los factores aireación: pH**

A continuación en la figura N°4.29 se muestra el cambio de tonalidad en el color Synozol Amarillo comparando 3 pH diferentes (6,8 y 10) para la cepa 15 a 35 °C para el día 5.



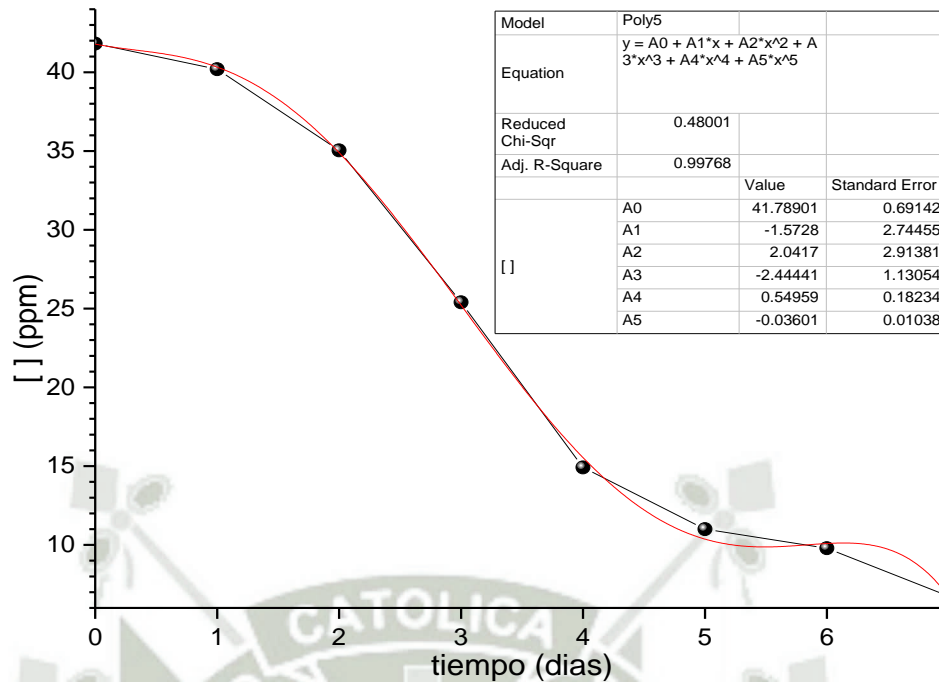
**Figura N° 4.29.- Cambio de tonalidad para el color Synozol Amarillo; A) pH 6, B) pH 8, C) pH 10**

#### **4.5 Evaluación de la cinética de remoción de colorantes**

Tras haber analizado los resultados de remoción de colorante, se obtuvo como mejor tratamiento empleando cepa N° 15, para el colorante Synozol Amarillo a 35 °C pH 6, sin aireación, se realizó el análisis en el Software de análisis OriginPro 9.0 para el mejor tratamiento con sus respectivos factores donde se eligió el modelo no lineal exponencial que mejor se ajustara a los valores obtenidos experimentalmente. Se determinó que el modelo que mejor se ajustó a los datos obtenidos experimentalmente fue el modelo Polynomial Poly 5 el que presentó un ajuste aceptable observando los valores de  $R^2$ ; el modelo presentó 6 constantes.

Con este análisis, la ecuación del modelo Poly 5 nos indica la velocidad de remoción del colorante en concentraciones ppm (días vs ppm) para cada tratamiento específicamente.

En la figura N° 4.30 se puede observar la gráfica correspondiente a la cinética de remoción del mejor tratamiento, los datos se encuentran de manera detallada en el ANEXO N° 6.2



**Figura N° 4.30.- Expresión de la modelación matemática para la remoción del colorante Synozol Amarillo, empleando la Cepa N° 15 a un pH 6 sin aireación y a 35 °C.**

#### **4.6 Definición de un modelo matemático para el sistema de remoción de colorantes**

Con la finalidad de generar un modelo matemático que explique el comportamiento del sistema en función de los cinco factores evaluados (Cepa, aireación, pH, colorante y temperatura) se realizó el análisis por medio de Modelos lineales generalizados, para ello se realizó el análisis de varianza respectivo para identificar si la construcción a un modelo lineal era adecuada. En la Tabla 4.16, se muestra que el modelo lineal generalizado completo es significativo y por lo tanto adecuado para describir el sistema desarrollado, presentando un R- Cuadrado de 73.412 por ciento, un R-Cuadrado (ajustado por g.l.) de 62.9853 por ciento y error estándar del estimado de 2.56859.

**Tabla N° 4.16.- Análisis de varianza para el modelo lineal generalizado completo construido para Concentración (ppm).**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	929.051	20	46.4525	7.04	0.0000
Residuo	336.48	51	6.59764		
Total (Corr.)	1265.53	71			

*Elaboración propia.*

El valor de R – Cuadrado mientras más términos tengan será mayor en valor (%) pero hay términos o factores en el sistema que no son significativos, es por eso que el valor de R-Cuadrado ajustado es muy importante puesto que al eliminar términos que no intervienen de manera significativa su valor aumentará, esto permitirá refinar la ecuación. Por ello y luego de este proceso se realizó un análisis de varianza adicional con los términos de nuestro modelo refinado, los cuales se detallan en la Tabla 4.17 y corresponden a los términos identificados como influyentes en el apartado 4.4.

**Tabla N° 4.17.- Análisis de varianza para la concentración (ppm) en base a cinco factores predictivos y sus interacciones del modelo lineal generalizado refinado.**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Cepa	112.152	1	112.152	16.76	0.0001
Aireación	275.782	1	275.782	41.20	0.0000
Colorante	115.674	2	57.837	8.64	0.0005
Temperatura	64.4708	1	64.4708	9.63	0.0029
pH	81.1208	1	81.1208	12.12	0.0009
Cepa*Aireación	84.7162	1	84.7162	12.66	0.0007
Cepa*Colorante	116.635	2	58.3177	8.71	0.0005
Residuo	414.98	62	6.69323		
Total (corregido)	1265.53	71			

*Elaboración propia*

Seguidamente se realizó el Análisis de varianza respectivo para el nuevo modelo lineal refinado (Tabla 4.18), observando que éste si es significativo (valor- $p < 0.05$ ), con un Cuadrado Medio de 96.5056 para el modelo y 6.69 para los residuales. Presenta un R- Cuadrado de 67.21 %, un R-Cuadrado ajustado de 62.45 % y un error estándar de 2.58713. En el ANEXO N° 08 se muestran los datos empleados para la obtención de la tabla N° 4.18.

**Tabla N° 4.18.- Análisis de varianza para la concentración (ppm) en base a cinco factores predictivos y sus interacciones del modelo lineal generalizado refinado.**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	850.551	9	94.5056	14.12	0.0000
Residuo	414.98	62	6.69323		
Total (Corr.)	1265.53	71			

*Elaboración propia.*

A continuación se desarrolló el modelo matemático correspondiente identificando los coeficientes del modelo incluidos sus límites de confianza mostrados en la Tabla 4.19, a partir de ello se desarrolló la ecuación 4.1 mostrada a continuación, la cual representa al modelo lineal refinado desarrollado con anterioridad.

**Tabla N° 4.19.- Coeficientes del modelo matemático refinado.**

<b>Término del modelo</b>	<b>Coefficiente</b>
CONSTANTE	12.678+/-3.0474
Cepa	-1.2481+/-0.6095
Aireación	1.9571+/-0.6095
Colorante	-0.0579+/-0.8619
Colorante	-1.5226+/-0.8619
Temperatura	-0.9463+/-0.6095
pH	0.65+/-0.3732
Cepa*Aireación	1.0847+/-0.6095
Cepa*Colorante	-1.6876+/-0.8619
Cepa*Colorante	0.3016+/-0.8619

$$\text{Concentración} = 12.678 - 1.2481 * \text{Cepa} + 1.9571 * \text{Aireación} - 0.0579 * \text{Colorante} - 1.5226 * \text{Colorante} - 0.9463 * \text{Temperatura} + 0.65 * \text{pH} + 1.0847 * \text{Cepa} * \text{Aireación} - 1.6876 * \text{Cepa} * \text{Colorante} + 0.3016 * \text{Cepa} * \text{Colorante}$$

**Ecuación 4.1**

Para poder usar la ecuación se detalla en la Tabla 4.20 los niveles de cada factor categórico (cepa, aireación, colorante y temperatura), así mismo en la ecuación 4.1 se puede identificar hay dos términos, en la ecuación 4.1, de Cepa \* Colorante, esto se debe a que los términos de modelo con factores categóricos dependen del número de niveles. En este caso, en el factor colorante se tiene 3 niveles como se observa en la Tabla N° 4.20, por lo tanto tendrá dos términos en la ecuación por la regla de Numero de niveles menos 1 es igual al número de términos.

**Tabla N° 4.20.- Niveles para los factores categóricos del modelo matemático refinado.**

FACTOR	Nivel		
	Primer	Segundo	Tercero
<b>Cepa</b>	15	32	-
<b>Aireación</b>	Con	Sin	-
<b>Colorante</b>	Amarillo	Negro	Rojo
<b>Temperatura</b>	35°C	Ambiente	-

La Tabla N° 4.21 muestra los valores a asignar según sea el caso del nivel de cada factor categórico que se esté ensayando, por ejemplo de trabajar con la cepa 15, se colocará 1 y si es la cepa 32 se colocará -1, en el caso especial del colorante si se trabaja con colorante Synozol Amarillo se colocara en el primer término 1 y en el segundo término 0, en caso de trabajar con colorante Negro se colocará en el primer término 0 y en el segundo término 1, y finalmente de darse el caso de trabajar con

colorante rojo en ambos términos se reemplazará por -1. Para el caso de interacciones se considerará el valor que resulte de multiplicar ambos números mostrados en R1 y R2 en la Tabla 4.21.

**Tabla N° 4.21.- Valores de “x” en la variable explicativa para cada nivel correspondiente a los factores categóricos del modelo matemático refinado.**

FACTOR	NIVELES	Nivel	
		R1	R2
Cepa	15	1	-
	32	-1	-
Aireación	Con	1	-
	Sin	-1	-
Colorante	Amarillo	1	0
	Negro	0	1
	Rojo	-1	-1
Temperatura	35°C	1	-
	T.Ambiente	-1	-

Así al tener los valores de x, indicados según la tabla N° 4.21, y el valor de pH; podemos realizar reemplazos en la ecuación 4.1 para efectuar predicciones respecto al comportamiento del sistema en cuanto a remoción de color por las cepas 15 y 32.

## CAPITULO V

## 5. CONCLUSIONES

**PRIMERA:** Se Recolectó 32 especies de hongos distintos de los árboles que presentaban podredumbre blanca en la selva peruana del Departamento de Madre de Dios para luego poder aislar 14 cepas en medio PDA. Por factores de contaminación el resto de las cepas no pudieron ser aisladas.

**SEGUNDO:** En función a su capacidad de crecimiento en placa a diferentes concentraciones (250 ppm y 1500 ppm) de 3 colorantes diferentes los cuales son: Synozol Amarillo, Synosol Rojo y Novacrom negro, se seleccionó a la Cepa 15 y Cepa 32 como las mejores con respecto a tolerancia de colorantes, dichas cepas por identificación molecular corresponden al hongo *Pestalotiosis microspora* y al hongo *Sepedonium sp* respectivamente.

**TERCERA:** Se evaluó la espuma de poliuretano como soporte inmovilizador para los hongos siendo muy efectiva y de bajo costo. Así mismo se observó que no interfiere con los valores de absorbancia en la remoción de colorantes en medio líquido.

**CUARTA:** Se evaluó mediante método colorimétrico por 8 días la influencia de factores como temperatura, pH, Aireación en la remoción de 3 colorantes diferentes (Synozol Amarillo, Synozol Rojo y Novacrom Negro) en medio líquido al cual se añadió hongo ( Cepa 15 y Cepa 32) inmovilizado en espuma de poliuretano, determinando mediante análisis visual y análisis estadístico en el Software Statgraphics Centurion XV que las mejores condiciones fueron empleando Cepa N° 15 sin aireación, a un pH 6, a 35 °C para el colorante Synozol Amarillo.

**QUINTA:** Se evaluó la cinética de remoción del colorante Synosol Amarillo empleando la Cepa N° 15 a pH 6, sin aireación a 35 °C ( mejores condiciones para

la máxima remoción de colorante de todo el sistema), en el programa estadístico Origin Pro 9.0 teniendo en consideración el tiempo ( días) vs la concentración (ppm), siendo la concentración inicial de 40 ppm.

**SEXTA:** Mediante el programa estadístico Statgraphics Centurion XV se desarrolló una ecuación matemática la cual es aplicada al sistema de remoción de colorantes mediante hongos xilófagos considerando los factores evaluados, con el fin de determinar la concentración final de colorante en medio líquido.



## CAPITULO VI

### 6. RECOMENDACIONES

- ✓ Realizar pruebas con efluentes industriales de textileras para evaluar la efectividad del proceso in vivo empleando un consorcio de cepas fúngicas las cuales puedan remover colorantes industriales, teniendo en cuenta los aditivos presentes en el efluente como por ejemplo detergentes, sales, etc ,por otro lado considerar los parámetros que son evaluados como pH, caudal del Afluente, concentración de sales, cantidad de metales presentes, DBO, DQO, temperatura, clases de colorantes, solidos suspendidos, sólidos sedimentables, etc.
- ✓ Identificar y medir la actividad enzimática que está involucrada en el proceso de remoción de los colorantes.
- ✓ Identificar posibles productos intermediarios a partir de la remoción de los colorantes.

## CAPITULO VII

## 7. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Moeller, GE y Garzon, MA, 2003. Desarrollo de tecnologías No convencionales para el tratamiento de Efluentes de la Fabricación de Colorantes del Tipo Azo.
2. Marcano, D. 1990, Introducción a la Química de los colorantes. Editorial Reverte.
3. Pearce, C., Loydb, J., Guthriea, J, 2003. The removal of colour from textile wastewater using bacterial cells. Dyes and Pigment.
4. Rodriguez, S., Fernández, m. Bermúdez, M & Morris, H. 2001. Tratamiento de efluentes industriales coloreados por Pleurotus spp. Santiago de Cuba – Cuba.
5. Alatorre, FA Moeller, G 2006 “Influencia de las características hidráulicas y geometrías de biofiltros empacados sobre la eliminación de un colorante azo”
6. Nillsson, Moeller, A Mattiasson, B., Rubindamayugi, M. Welander, U. 2006 Decolorization of synthetic and real textile wastewater by the use of white – Rot Fungi.
7. Kim, S., An J., Kim, B. 2008. The effects of Reductanta and carbon source on the Microbial Decolorization of Azo Dyes in an anaerobic sludge process.
8. Pereira E Regina, L. 2001. Decolorization of azo dyes by Phanerochaete Chrysosporium and Pleurotus Sajorcaju. Enzyme and microbial techonology
9. Mancilla, Etal. Mancilla, H, Lizama, C., gutarra, A., Rodriguez, J. Tratamiento de residuos líquidos de la industria de celulosa y textil.
10. T. Robinsons, G. Mc Mullan, R. Marchants, P. Nigam, 2001. Remediation of dyes in textile effluente: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative.
11. Cohen, Y. 2001. Biofiltration – The treatment of Fluids by Microorganism Immobilized into the filter bedding material: A review

12. Houg, W, Schmidt, A, Nortemann, B., Hempel, D., Stolz, A., Knackmuss, H, 1991. Mineralization of sulfonated azo dye mordant yellow 3 by a 6-aminonaphthalene-2-sulfonate-degrading bacterial consortium.
13. Pan. D., Adholeya, A. 2007. Biological Approaches for treatment of distillery Waste water.
14. Ren, S. Gou, J, zeng G, Sun G. 2006. Decolorization of triphenylmethane, azo, and anthraquinone dyes by a newly isolated Aeromonas Hydrophila strain.
15. Barragan, B., Costa c., peralta, J. Barrera, J. Esparza, F. Rodriguez, R, 2007. Biodegradation of organochlorine pesticides by bacteria grown in microniches of the porous structure of Green vean cofee.
16. S. R. Couto, E. Rosales, M. A. Sanroman, 2006. Decolourization of synthetic dyes by Trametes Hirsuta in expanded –Bed reactors.
17. Ramsey, J., Mok, W.H.W, Luu Y-S Savage, M. 2005. Decolorization of textile dyes by alginate.inmobilized trametes versicolor.
18. Carliell M, Barclay S. J. Naidoo N., Bucley C.A. Mulhonlland D.a. Senior. 1995. Microbial decolourization of a reactive azo dye under anaerobic conditions.
19. Guerrero, M, Briones, R Kuppusamy. Biodegradación anaerobia de colorantes tipo azo vía sulfato – reductoras. Bioprocesos ambientales, Instituto de Ingenieria. UNAM.
20. Reza, H. Sakurai, A, Sakakibara, M 2007. Decolorization of Synthetic Dyes By A New Manganese Peroxidase - Producing White Rot Fungus. Dyes and Pigmentes.
21. M.A. Martinez – Trujillo y M. García – Rivero, 2011. Aplicaciones ambientales de microorganismos inmovilizados.
22. L. Berna Botero, 1997. Industria textil y medio ambiente: parte II. Colombia textil.
23. A.Gottlieb, C. Shaw, A. Smith, A. Wheatley, S. Forsythe, 2003. The toxicity of textile reactive ao dyes after hydrolysis and decolourisation.

24. T.H. kim, Y. Lee, J. Yang, B. Lee, C. Park, S. Kim, 2004. Decolorization of dye solutions by a membrane bioreactor (MBBR) using white-rot fungi.
25. 10.- T. Robinsons, G. Mc Mullan, R. Marchants, P. Nigam, 2001. Remediation of dyes in textile effluente: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative.
26. Y.Z.Fu, T. Viraraghavan, 2001. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review.
27. G. Dávila, 2006. Enzimas Lignolíticas fúngicas para fines ambientales.
28. M. T. Moreira, I. Mielgo, G. Feijoo, J.M. Lema, 2000. Evaluation of different fungal strains in the decolourisation of synthetic dyes.
29. M. J. Lopez, G. Feijoo, M. T. Moreira, M. Lema, 2006. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in forest anda salt marsh soils by White – rot Fungi.
30. Morgan, P. Lewis S. T., Watkinson, RL. 1991. Comparason of abilities of whute – rot fungi to mineralizate selected xenobiotic compounds.
31. Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banata, I., Marchant, R, Koutinas, A, 2004. Immobilization Technologies and Support Materials Suitable Inalcohol Beverages Production.
32. 16.- S. R. Couto, E. Rosales, M. A. Sanroman, 2006. Decolourization of synthetic dyes by Trametes Hirsuta in expanded –Bed reactors.
33. Cardona, E., Tzanov, T., Costa, S. Robra, K, Cavaco, A., Gutitz, 2000. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from Trametes Hirsuta.
34. Asgher, M., Bhatti, H., Shah, S., Asad, M, Legge, R, 2007. Decolorization potencial of mixed microbial consortia for reactive and disperse textile dyestuffs.
35. Blaquez C, Caminal G, Sarra M, Vincent M, Gabarell X, 2002. Olive oil mil waste wáter decoloration and detoxification in a bioreactor by the White rot fungus PHanerochaete Flavido – Alba.

36. Boer, CG. Obici, L., Souza, C.G.M & Piralta, RM, 2004. Decolourization of synthetic dyes by solid state cultures of *Lentinula edodes* producing manganese peroxidase as the main lignolytic enzyme.
37. Castillo, L., Ortega, K, 2007. Efecto del tiempo de colonización, El soporte de Inmovilización y suplementación del medio sobre la capacidad de remoción de colorante azo negro reactivo 5 empleando *Trametes Versicolor*.
38. Couto, S. Toca, J, 2006. Industrial and biotechnological application of Laccases: A review.
39. Dávila, G., Vázquez, R. 2006. Enzimas lignolíticas fúngicas para fines ambientales.
40. Vijaya, P. & Sandhya, S. 2003. Decolorization and complete degradation of Methyl Red by a Mixed culture.
41. Sum – young, A., Min, S., Cha, I, Choi, Y, Cho, Y, Kim, Ch, Lee, 2002. Decolorization of triphenylmethane and azo dyes by *Citrobacter* sp.
42. Spadaro, J.T. Gold, MH. & Ranganathan, V. 1992. Degradation of synthetic textile dyes by *Phlebia Tremellosa*.
43. Singh-Rai, H., Shankar, M, Singh, J., Bansal, T., vats, 2005. Removal of dyes from the effluente of textile an dyestuff manufacturing industry: a review.
44. 7.- Kim, S., An J., Kim, B. 2008. The effects of Reductanta and carbon source on the Microbial Decolorization of Azo Dyes in an anaerobic sludge process.
45. J. Urra, L. Sepulveda, E. Contreras, C. Palma, 2006. Screening of static culture and comparison of batch and continuous culture for the textile dye biological decolorization by *Phanerochaete chrysosporium*.
46. 28.- K.V. Radha, Regupathi, Arunagiri, Murugesan, 2005. Decolorization studies of synthetic dyes using *Phanerochaete chrysosporium* and their kinetics.

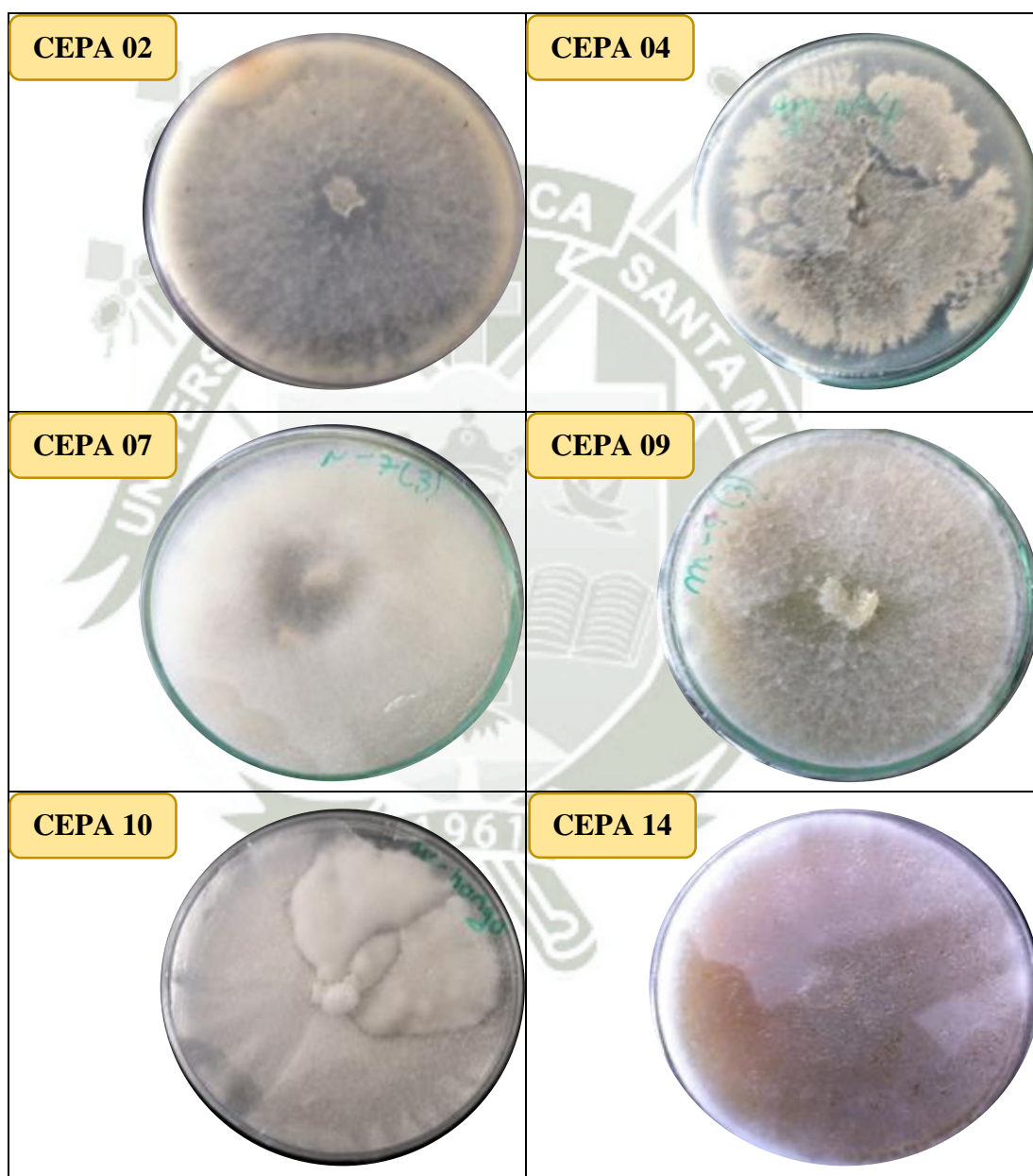
47. 4.- Rodríguez, S., Fernández, m. Bermúdez, M & Morris, H. 2001. Tratamiento de efluentes industriales coloreados por *Pleurotus* spp. Santiago de Cuba – Cuba.
48. J. Libra, M. Borchert, S. Banit, 2003. Competition strategies for the decolorization of a textile – reactive dye with the white – rot fungi *Trametes versicolor* under non- sterile conditions.
49. Yuen –Wash Choi, KevinD. Hyde and Wellcome W.H. Ho, 1999. Single spore isolation of fungi.
50. Sandoval, N & Ospina., 2008. Evaluación de inductores metálicos y co sustratos para la remoción de negro reactivo 5 empleando *Pleurotus Ostreatus* Inmovilizado en Fique.
51. Goh, T.K., 1999. Single spore isolation using a hand – made glass needle.
52. Rolando A. Ríos Ruiz, Ladislao Ruiz Rengifo, 1993. Aislamiento y Cltivo del Hongo comestible *Pleurotus afin ostreatus* en Tingo María.
53. Gonzales, F.R. y ABAD, CJ. 1969. Técnicas y métodos de laboratorio para el estudio de los Hongos Xilófagos. Universidad Agraria la Molina, Lima-Perú.
54. Koch Alma, Naranjo Blanca, Páez Maritza. Determinación de la actividad enzimática de lacasas y lignina peroxidadas de hongos degradadores de colorantes seleccionados para el tratamiento de aguas residuales de la industria textil.
55. Castillo, D., 2004. “Aislamiento de hongos degradadores de colorantes empleados en la industria textil. Proyecto previo a la obtención del título de Maestro en Tecnología Avanzada. Centro de investigaciones en Biotecnología aplicada.
56. Chaparro, D & Rosas, D., 2006. Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de la madera en la reserva natural la Montaña del Ocaso, Quimbaya – Quindo.
57. Dávila, G. & Vásquez, R., 2006. Enzimas lignolíticas fúngicas para fines ambientales.

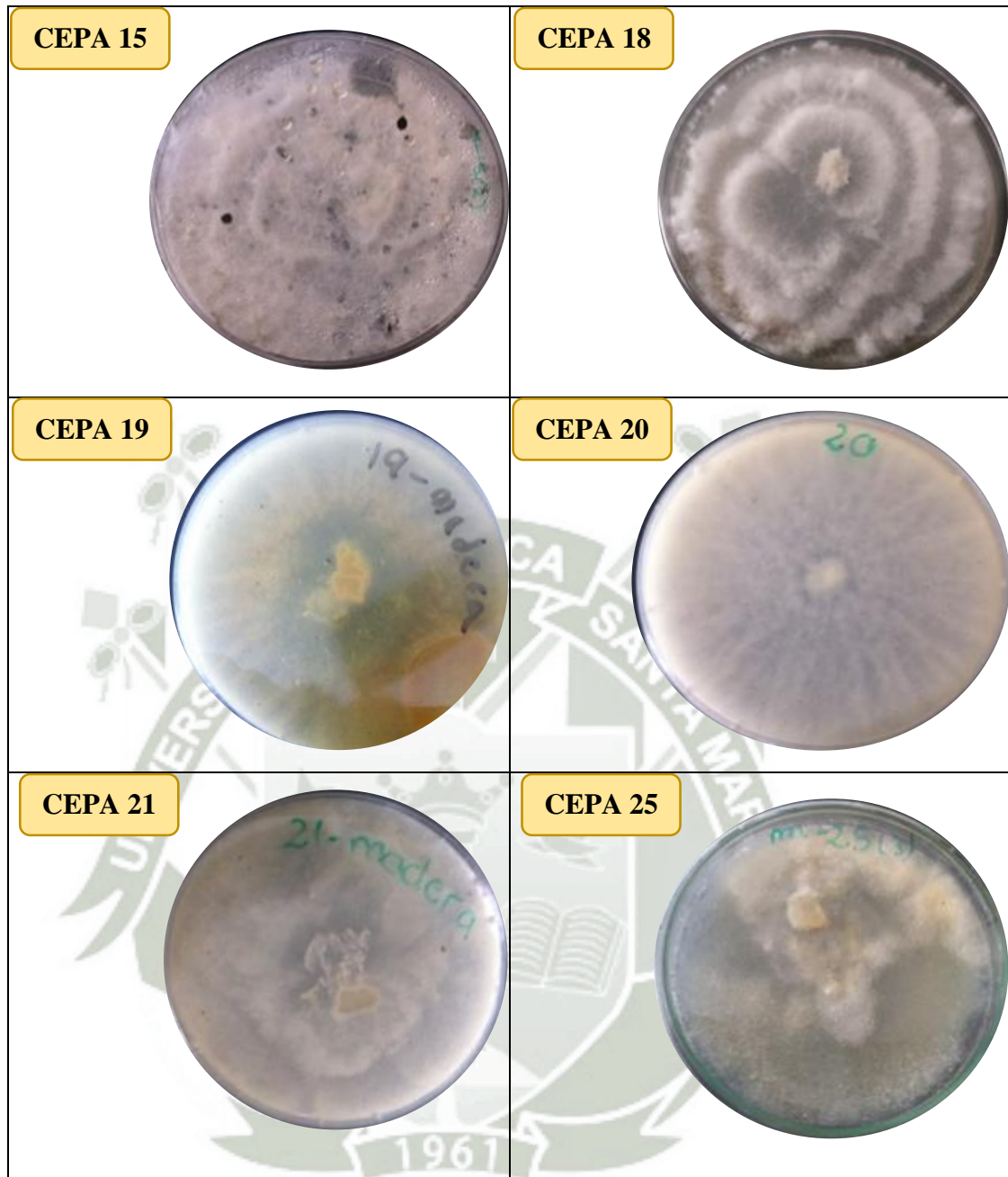
58. Gonzalez, K., 2009. Propiedades fisicoquímicas y cinéticas de la enzima lacasa inmovilizada de *Fusarium Proliferatum*.
59. Quintero, J. Feijoo, G & Lemar, J., 2006. Producción de enzimas lignolíticas con hongos basidiomicetos cultivador sobre materiales lignocelulósicos.
60. Usnayo. P., 2007. Optimización de medios de Cultivo, para la producción de enzimas lignolíticas, por cepas fúngicas aisladas del Altiplano Boliviano.
61. Rasool Ghasemzadeh, Ali Kargar and Majid Lotfi, 2011. Decolorization of Synthetic Textile Dyes by Immobilized White - Rot Fungus.
62. E.P. Chagas, L.R. Durrant, 2001. Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus Sajorcaju*.
63. O. Yesilada, D. Asma, S. Cing, 2003. Decolorization of textile dyes by fungal pellets.
64. F. Kargi, I.K. Kapdan, 2002. Biological decolorization of textile dyestuff containing wastewater by *Coriolus versicolor* in a rotating biological contactor.
65. R. Shrivastava, V. Christian, B.R.M. Vyas, 2005. Enzymatic decolorization of sulfonphthalein dyes.

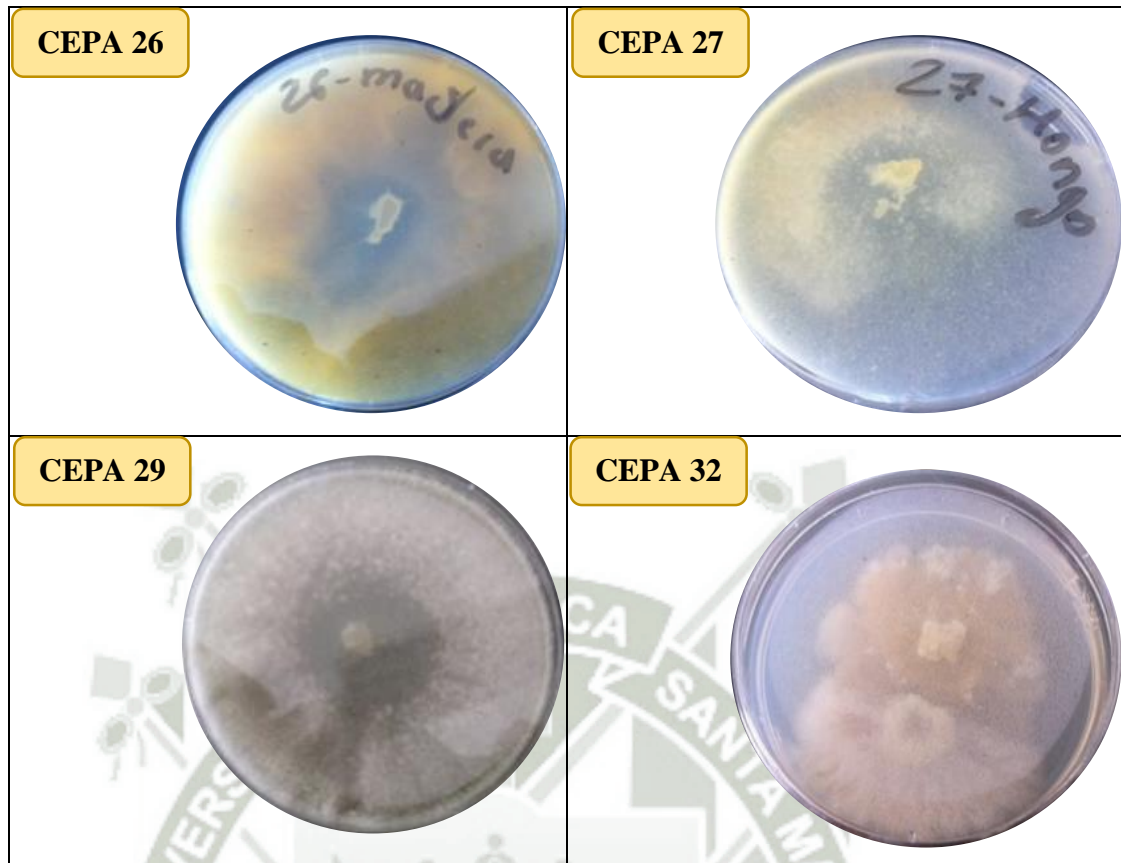
## CAPITULO VIII

### 8. ANEXOS

#### ANEXO N° 01. Hongos xilófagos sembrados en Medio PDA





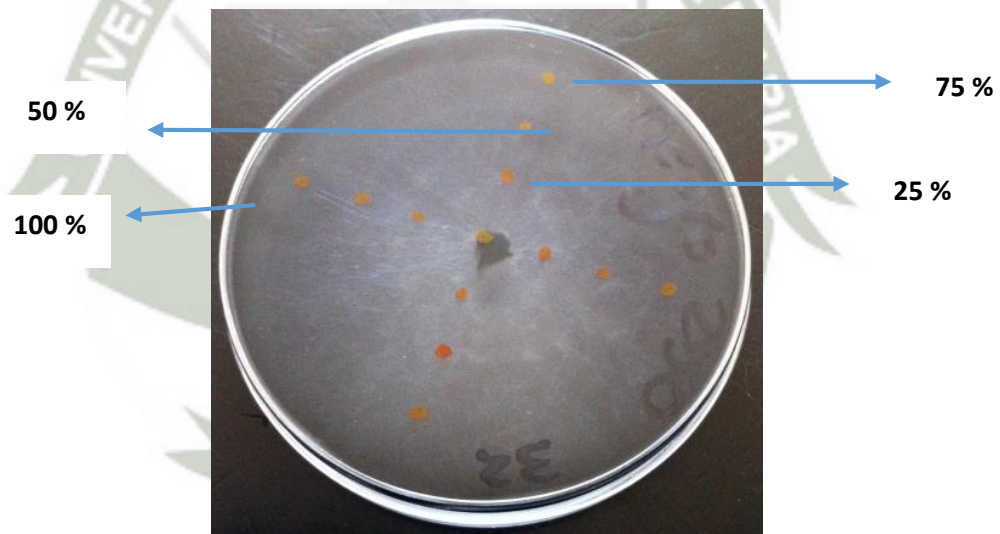


## ANEXO N° 02. Hongos Xilófagos en medio *Radha* con Colorante

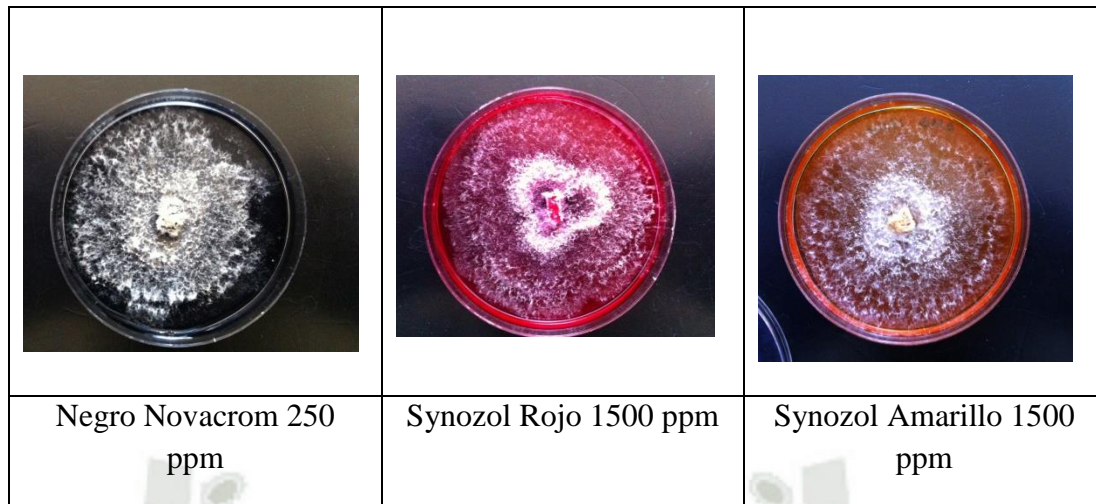


**Figura N° 8.1. Placas con medio *Radha* más Colorante**

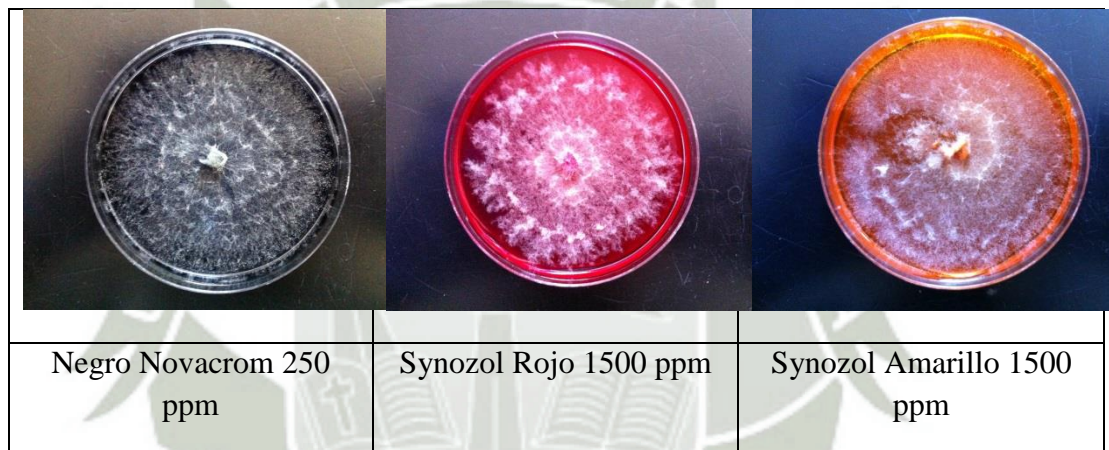
Para estimar de forma cualitativa el crecimiento, se dividió la placa en 4 puntos de referencia de acuerdo al área de 25, 50, 75 y 100 % lo que corresponde a toda la placa.



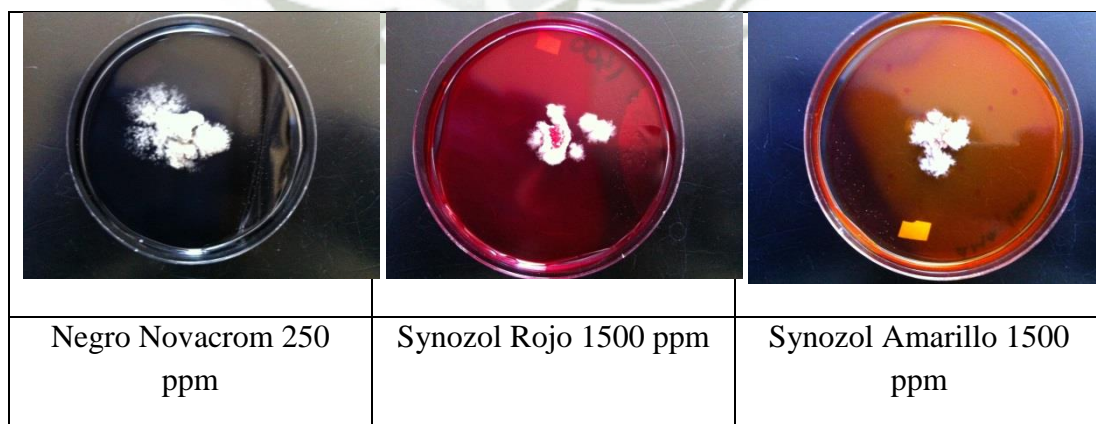
**Figura N° 8.2. Puntos de referencia en placa con medio *radha* con colorante.**



*Figura N° 8.3. Placas correspondiente a cepa N° 15*



*Figura N° 8.4. Placas correspondiente a cepa N° 32*



*Figura N° 8.5. Placas correspondiente a cepa N° 10*





Novacrom negro 1500 ppm																				
Cepa	% de crecimiento																			Promedio
	Día 01		Día 02		Día 03		Día 04		Día 05		Día 06		Día 07		Día 08		Promedio			
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2				
2	0	0	25	25	30	25	50	50	75	75	75	75	90	90	80	90	85			
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
9	12	0	25	25	35	35	50	50	60	60	60	60	75	75	75	75	75			
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
14	0	0	0	0	20	20	20	25	50	50	50	50	75	75	75	75	75			
15	25	25	50	35	50	65	60	75	75	75	80	85	85	85	90	90	90			
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	25	45	50	60	60	60			
19	0	0	25	20	35	50	50	50	65	50	75	75	75	75	75	75	75			
20	25	25	35	35	35	50	50	50	60	60	60	60	75	75	75	70	72.5			
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	25	25	25	25	25			
25	0	0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	12	12	12	12	12	12			
26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
32	25	25	35	35	50	50	50	50	65	65	75	75	80	90	90	80	85			

Novacrom negro 250 ppm																				
Cepa	% de crecimiento																			Promedio
	Día 01		Día 02		Día 03		Día 04		Día 05		Día 06		Día 07		Día 08		Promedio			
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2				
2	25	25	25	25	30	25	50	50	75	75	75	75	90	90	100	100	100			
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
9	0	0	20	20	25	35	50	50	60	60	60	60	75	75	75	75	75			
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
14	0	0	0	0	20	20	20	25	50	50	50	50	75	75	75	75	75			
15	25	25	50	35	50	65	60	75	75	75	80	85	85	85	100	100	100			
18	0	0	0	0	0	0	0	0	25	25	25	45	50	50	60	60	60			
19	0	0	25	20	35	50	50	50	65	50	75	75	75	75	75	75	75			
20	25	25	35	35	35	50	50	50	60	60	60	60	75	75	75	70	72.5			
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	25	25	25	25	25			
25	0	0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	12	12	12	12	12	12			
26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
32	25	25	35	35	50	50	50	50	65	65	75	75	80	90	100	90	95			

### Prueba LSD de Fisher para la comparación de cepas

Estas tablas aplican un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

### Pruebas de Múltiple Rangos LSD Fisher para Synosol Amarillo 1500 ppm

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
C25	2	0.0	X
C26	2	0.0	X
C10	2	0.0	X
C7	2	0.0	X
C27	2	0.0	X
C21	2	40.0	X
C9	2	50.0	X
C14	2	60.0	X
C18	2	67.5	X
C2	2	75.0	X
C19	2	90.0	X
C15	2	92.5	XX
C20	2	95.0	X
C32	2	100.0	X

### Pruebas de Múltiple Rangos LSD Fisher para Synosol Amarillo 250 ppm

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
C10	2	0.0	X
C26	2	0.0	X
C27	2	0.0	X
C7	2	0.0	X
C25	2	25.0	X
C9	2	50.0	X
C21	2	50.0	X
C18	2	75.0	X
C14	2	75.0	X
C19	2	77.5	XX
C2	2	82.5	XX
C20	2	87.5	X
C32	2	100.0	X
C15	2	100.0	X

**Pruebas de Múltiple Rangos LSD Fisher para Synosol Rojo 1500 ppm**

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
C25	2	0.0	X
C7	2	0.0	X
C26	2	0.0	X
C10	2	0.0	X
C27	2	0.0	X
C21	2	25.0	X
C14	2	55.0	X
C18	2	60.0	X
C9	2	70.0	X
C20	2	75.0	X
C19	2	75.0	X
C2	2	82.5	X
C32	2	85.0	XX
C15	2	90.0	X

**Pruebas de Múltiple Rangos LSD Fisher para Synosol Rojo 250 ppm**

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
C26	2	0.0	X
C10	2	0.0	X
C7	2	0.0	X
C27	2	0.0	X
C21	2	25.0	X
C25	2	25.0	X
C18	2	60.0	X
C14	2	75.0	X
C20	2	75.0	X
C19	2	75.0	X
C9	2	82.5	X
C15	2	90.0	X
C32	2	100.0	X
C2	2	100.0	X

**Pruebas de Múltiple Rangos LSD Fisher para Novacrom negro 1500 ppm**

	<i>Caso</i>	<i>Medi</i>	<i>Grupos</i>
	<i>s</i>	<i>a</i>	<i>Homogéneos</i>
C27	2	0.0	X
C10	2	0.0	X
C7	2	0.0	X
C26	2	0.0	X
C21	2	25.0	X
C25	2	25.0	X
C18	2	60.0	X
C20	2	72.5	X
C9	2	75.0	X
C14	2	75.0	X
C19	2	75.0	X
C32	2	85.0	X
C2	2	85.0	X
C15	2	90.0	X

**Pruebas de Múltiple Rangos LSD Fisher para Novacrom negro 250 ppm**

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos</i>
			<i>Homogéneos</i>
C27	2	0.0	X
C10	2	0.0	X
C7	2	0.0	X
C26	2	0.0	X
C21	2	25.0	X
C25	2	25.0	X
C18	2	60.0	X
C20	2	72.5	X
C9	2	75.0	X
C14	2	75.0	X
C19	2	75.0	X
C32	2	95.0	X
C15	2	100.0	X
C2	2	100.0	X

El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

**ANEXO N° 04. Tablas de Absorbancia correspondiente a las curvas de calibración**

*Tabla N° 8.1.- Absorbancias correspondientes a la curva de calibración pH 6*

Concentración ppm	Colorantes		
	Amarillo (415 nm)	Rojo (540 nm)	Negro ( 595 nm)
50	0.85	1.03	1.446
25	0.432	0.534	0.76
12.5	0.223	0.27	0.387
6.25	0.082	0.115	0.173
3.125	0.045	0.092	0.095

*Tabla N° 8.2. Absorbancias correspondientes a la curva de calibración pH 8*

Concentración ppm	Colorantes		
	Amarillo (415 nm)	Rojo (540 nm)	Negro ( 595 nm)
50	0.915	1.140	1.0875
25	0.459	0.576	0.567
12.5	0.250	0.307	0.321
6.25	0.094	0.126	0.173
3.125	0.049	0.060	0.080

*Tabla N° 8.3. Absorbancias correspondientes a la curva de calibración pH 10*

Concentración ppm	Colorantes		
	Amarillo (415 nm)	Rojo (515 nm)	Negro ( 595 nm)
50	1.26	1.672	1.501
25	0.634	0.830	0.764
12.5	0.368	0.402	0.432
6.25	0.199	0.241	0.196
3.125	0.096	0.155	0.11

**ANEXO N° 05. Datos de absorbancia para seleccionar la máxima longitud de onda de cada colorante con respecto a los 3 pH.**

Las primeros 3 tablas muestran longitudes de onda con intervalos de 50 nm. y las siguientes 6 tablas muestran longitudes de onda más precisas cada 5 nm.

**Tabla N° 8.4.- Selección de máxima longitud de onda para Synozol Amarillo (intervalos de 50 nm)**

<b>Synozol amarillo ( 40 ppm)</b>									
<b>pH</b>	<b>Longitud de onda (nm)</b>								
	<b>700</b>	<b>650</b>	<b>600</b>	<b>550</b>	<b>500</b>	<b>450</b>	<b>400</b>	<b>350</b>	<b>300</b>
<b>6</b>	0.001	0.001	0.004	0.032	0.258	0.648	0.735	0.415	1.008
<b>8</b>	0.045	0.051	0.06	0.091	0.277	0.596	0.691	0.551	1.209
<b>10</b>	0.045	0.069	0.112	0.191	0.381	0.720	0.635	1.783	3.591

**Tabla N° 8.5.- Selección de máxima longitud de onda para Synozol Rojo (intervalos de 50 nm)**

<b>Synozol rojo ( 40 ppm)</b>									
<b>pH</b>	<b>Longitud de onda (nm)</b>								
	<b>700</b>	<b>650</b>	<b>600</b>	<b>550</b>	<b>500</b>	<b>450</b>	<b>400</b>	<b>350</b>	<b>300</b>
<b>6</b>	0.003	0.002	0.018	0.851	0.741	0.187	0.174	0.288	1.057
<b>8</b>	0.001	0.002	0.024	0.753	0.651	0.186	0.198	0.345	1.135
<b>10</b>	0.053	0.077	0.129	0.625	0.657	0.535	0.463	1.590	3.219

**Tabla N° 8.6.- Selección de máxima longitud de onda para Novacrom Negro (intervalos de 50 nm)**

<b>Novacrom Negro ( 40 ppm)</b>									
<b>pH</b>	<b>Longitud de onda (nm)</b>								
	<b>700</b>	<b>650</b>	<b>600</b>	<b>550</b>	<b>500</b>	<b>450</b>	<b>400</b>	<b>350</b>	<b>300</b>
<b>6</b>	0.032	0.380	0.870	0.642	0.560	0.520	0.501	0.334	1.003
<b>8</b>	0.125	0.527	1.241	0.948	0.833	0.875	0.820	0.763	1.350
<b>10</b>	0.043	0.356	0.731	0.584	0.544	0.501	0.479	0.342	0.934

**Tabla N° 8.7.- Selección de máxima longitud de onda para Synozol Amarillo (intervalos de 5 nm) para pH 6 y 8**

		Synozol Amarillo ( 40 ppm)																				
		Longitud de onda (nm)																				
pH		450	445	440	435	430	425	420	415	410	405	400	395	390	385	380	375	370	365	360	355	350
6		0.648	0.685	0.712	0.733	0.747	0.754	0.756	0.760	0.751	0.746	0.735	0.731	0.717	0.696	0.672	0.642	0.603	0.562	0.515	0.475	0.415
8		0.596	0.619	0.641	0.661	0.674	0.682	0.687	0.688	0.686	0.685	0.684	0.680	0.674	0.667	0.656	0.644	0.625	0.608	0.585	0.562	0.551

**Tabla N° 8.8.- Selección de máxima longitud de onda para Synozol Amarillo (intervalos de 5 nm) para pH 10**

		Synozol Amarillo ( 40 ppm)																				
		Longitud de onda (nm)																				
pH		500	495	490	485	480	475	470	465	460	455	450	445	440	435	430	425	420	415	410	405	400
10		0.381	0.410	0.439	0.470	0.503	0.534	0.570	0.604	0.642	0.681	0.720	0.762	0.796	0.832	0.866	0.901	0.938	0.974	1.017	1.061	1.113

**Tabla N° 8.9.- Selección de máxima longitud de onda para Synozol Rojo (intervalos de 5 nm) para pH 6 y 8**

		Synozol Rojo ( 40 ppm)																				
		Longitud de onda (nm)																				
pH		600	595	590	585	580	575	570	565	560	555	550	545	540	535	530	525	520	515	510	505	500
6		0.018	0.030	0.053	0.088	0.146	0.228	0.337	0.481	0.623	0.761	0.851	0.901	0.909	0.898	0.886	0.884	0.881	0.879	0.865	0.811	0.741
8		0.024	0.037	0.060	0.094	0.149	0.225	0.322	0.449	0.569	0.684	0.753	0.794	0.799	0.790	0.781	0.779	0.777	0.774	0.761	0.712	0.651

**Tabla N° 8.10.- Selección de máxima longitud de onda para Synozol Rojo (intervalos de 5 nm) para pH 10**

Synozol Rojo ( 40 ppm)																					
pH	Longitud de onda (nm)																				
	550	545	540	535	530	525	520	515	510	505	500	495	490	485	480	475	470	465	460	455	450
10	0.625	0.650	0.661	0.663	0.666	0.674	0.686	0.694	0.691	0.674	0.657	0.624	0.603	0.588	0.575	0.564	0.552	0.545	0.542	0.540	0.535

**Tabla N° 8.11.- Selección de máxima longitud de onda para Novacrom Negro (intervalos de 5 nm) para pH 6,8 y 10**

Novacrom negro ( 40 ppm)																					
pH	Longitud de onda (nm)																				
	650	645	640	635	630	625	620	615	610	605	600	595	590	585	580	575	570	565	560	555	550
6	0.380	0.473	0.553	0.628	0.694	0.755	0.799	0.833	0.854	0.866	0.869	0.870	0.862	0.853	0.834	0.811	0.784	0.753	0.726	0.698	0.642
8	0.527	0.650	0.753	0.853	0.949	1.038	1.104	1.164	1.200	1.221	1.224	1.251	1.241	1.238	1.218	1.190	1.162	1.117	1.085	1.049	0.946
10	0.356	0.433	0.494	0.547	0.593	0.634	0.665	0.689	0.707	0.721	0.731	0.742	0.741	0.738	0.735	0.722	0.704	0.682	0.661	0.642	0.584

**ANEXO N° 06. Datos de absorbancia y concentraciones (ppm) para cada colorante – Remoción de colorante medio líquido**

**1.- Cepa N° 15 Con Aireación**

Día	Synozol Amarillo (Absorbancias)									Synozol Amarillo (Concentraciones)									Synozol Amarillo (Concentraciones respecto a volúmenes)								
	Ambiente			Temperatura			35 °C			Ambiente			Temperatura			35 °C			Ambiente			Temperatura			35 °C		
	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10			
00	0.735	0.799	0.988	0.735	0.799	0.988	38.906	43.443	42.977	43.443	38.906	43.443	42.977	43.443	38.906	43.443	42.977	43.443	38.906	43.443	42.977	43.443	38.906	43.443	42.977		
01	0.707	0.754	0.868	0.721	0.762	0.863	41.358	41.011	33.988	42.168	41.443	33.783	40.434	39.227	32.471	39.335	39.119	31.283	38.816	37.658	31.172	37.762	37.554	30.031	30.031		
02	0.691	0.721	0.831	0.672	0.719	0.802	31.879	37.173	31.611	37.775	37.173	30.955	40.434	39.227	32.471	39.335	39.119	31.283	38.816	37.658	31.172	37.762	37.554	30.031	30.031		
03	0.543	0.683	0.810	0.645	0.683	0.794	31.879	37.173	31.611	37.775	37.173	30.955	40.434	39.227	32.471	39.335	39.119	31.283	38.816	37.658	31.172	37.762	37.554	30.031	30.031		
04	0.426	0.541	0.775	0.517	0.577	0.659	25.116	29.497	30.176	30.376	31.443	25.422	23.786	27.389	25.791	27.023	27.443	22.307	23.106	27.138	27.762	27.946	28.928	23.388	23.388		
05	0.403	0.502	0.668	0.459	0.503	0.583	23.786	27.389	25.791	27.023	27.443	22.307	23.439	24.957	24.234	25.058	25.173	20.545	21.408	24.650	23.212	24.321	24.699	20.077	20.077		
06	0.397	0.457	0.630	0.425	0.461	0.540	23.439	24.957	24.234	25.058	25.173	20.545	22.514	24.038	23.291	21.590	22.578	18.291	20.627	21.962	21.326	22.051	22.152	18.080	18.080		
07	0.381	0.440	0.607	0.365	0.413	0.485	22.514	24.038	23.291	21.590	22.578	18.291	19.362	20.673	20.030	18.567	19.417	15.730	19.362	20.673	20.030	18.567	19.417	15.730	15.730		

Día	Synozol Rojo (Absorbancias)									Synozol Rojo (Concentraciones)									Synozol Rojo (Concentraciones respecto a volúmenes)								
	Ambiente			Temperatura			35 °C			Ambiente			Temperatura			35 °C			Ambiente			Temperatura			35 °C		
	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10			
00	0.854	0.909	1.337	0.854	0.909	1.337	41.174	39.683	40.166	41.174	39.683	40.166	39.097	39.509	38.571	38.517	39.596	33.417	41.174	39.683	40.166	41.174	39.683	40.166			
01	0.811	0.905	1.285	0.799	0.907	1.117	39.097	39.509	38.571	38.517	39.596	33.417	37.551	37.552	33.202	37.744	36.422	30.074	38.315	38.719	37.799	37.747	38.804	32.749	32.749		
02	0.779	0.860	1.110	0.783	0.884	1.008	37.551	37.552	33.202	37.744	36.422	30.074	33.493	34.900	29.460	33.396	31.465	28.356	36.049	36.050	31.874	36.234	34.965	28.871	28.871		
03	0.695	0.799	0.988	0.693	0.720	0.952	33.493	34.900	29.460	33.396	31.465	28.356	32.430	34.074	27.405	32.043	28.639	26.515	31.483	32.806	27.693	31.392	29.577	26.654	26.654		
04	0.673	0.780	0.921	0.665	0.665	0.892	32.430	34.074	27.405	32.043	28.639	26.515	29.242	31.509	25.074	25.618	26.813	22.742	29.836	31.348	25.213	29.480	26.348	24.394	24.394		
05	0.607	0.721	0.845	0.532	0.613	0.769	29.242	31.509	25.074	25.618	26.813	22.742	29.000	27.030	24.736	24.121	25.117	22.221	26.317	28.358	22.566	23.057	24.132	20.468	20.468		
06	0.602	0.618	0.834	0.501	0.574	0.752	29.000	27.030	24.736	24.121	25.117	22.221	28.372	26.813	24.675	23.928	23.117	21.577	25.520	23.787	21.768	21.226	22.103	19.234	19.234		
07	0.589	0.613	0.832	0.497	0.528	0.731	28.372	26.813	24.675	23.928	23.117	21.577	24.400	23.059	21.220	20.578	19.881	18.596	24.400	23.059	21.220	20.578	19.881	18.596	18.596		

Novacrom Negro ( Absorbancias)										Novacrom Negro ( Concentraciones)										Novacrom Negro ( Concentraciones respecto a volúmenes)																	
Dia	Temperatura					Temperatura					Temperatura					Dia	Temperatura					Temperatura					Dia	Temperatura					Temperatura				
	Ambiente					35 °C					Ambiente						35 °C					Ambiente						35 °C									
	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10		pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6		pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10					
00	0.870	1.127	1.205	0.870	1.127	1.205	39.521	40.363	39.895	39.521	40.363	39.895	39.521	40.363	39.895	39.521	40.363	39.895	39.521	40.363	39.895	39.521	40.363	39.895	39.521	40.363	39.895	39.521	40.363	39.895							
01	0.831	0.962	1.178	0.824	1.088	1.111	37.673	34.491	38.980	37.341	39.011	36.708	35.256	32.427	33.014	35.416	32.437	28.336	26.698	32.403	27.436	34.847	32.369	26.725	24.740	30.471	26.583	31.004	24.980								
02	0.780	0.904	1.002	0.798	0.988	0.985	35.256	32.427	33.014	36.109	35.416	32.437	28.336	26.698	32.403	27.436	34.847	26.725	24.740	30.471	26.583	31.004	24.980	25.777	22.036	28.708	25.445	29.616	20.200								
03	0.634	0.743	0.984	0.615	0.972	0.983	28.336	26.698	32.403	27.436	34.847	32.369	26.725	24.740	30.471	26.583	31.004	24.980	25.777	22.036	28.708	25.445	29.616	20.200	22.412	19.722	26.505	23.265	26.626	19.624							
04	0.600	0.688	0.927	0.597	0.864	0.765	26.725	24.740	30.471	26.583	31.004	24.980	25.777	22.036	28.708	25.445	29.616	20.200	22.412	19.722	26.505	23.265	26.626	19.624	20.280	19.117	25.895	21.607	24.598	19.454							
05	0.580	0.612	0.875	0.573	0.825	0.624	25.777	22.036	28.708	25.445	29.616	20.200	22.412	19.722	26.505	23.265	26.626	19.624	20.280	19.117	25.895	21.607	24.598	19.454													
06	0.509	0.547	0.810	0.527	0.741	0.607	22.412	19.722	26.505	23.265	26.626	19.624																									
07	0.464	0.530	0.792	0.492	0.684	0.602	20.280	19.117	25.895	21.607	24.598	19.454																									

2.- Cepa N° 15 Sin aireación

Novacrom Negro ( Absorbancias)										Novacrom Negro ( Concentraciones)										Novacrom Negro ( Concentraciones respecto a volúmenes)																	
Dia	Temperatura					Temperatura					Temperatura					Dia	Temperatura					Temperatura					Dia	Temperatura					Temperatura				
	Ambiente					35 °C					Ambiente						35 °C					Ambiente						35 °C									
	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10		pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6		pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10					
00	0.715	0.790	0.992	0.715	0.790	0.992	41.821	42.957	39.070	41.821	42.957	39.070	41.821	42.957	39.070	41.821	42.957	39.070	41.821	42.957	39.070	41.821	42.957	39.070	41.821	42.957	39.070	41.821	42.957	39.070							
01	0.687	0.726	0.867	0.701	0.683	0.718	40.202	39.497	33.947	41.012	37.173	27.840	38.468	37.227	24.480	36.503	30.038	24.807	35.058	29.335	22.881	27.023	28.146	19.930	27.197	23.876	19.684	16.214	23.497	15.504							
02	0.657	0.684	0.636	0.623	0.551	0.644	38.468	37.227	24.480	36.503	30.038	24.807	35.058	29.335	22.881	27.023	28.146	19.930	27.197	23.876	19.684	16.214	23.497	15.504	20.491	19.984	18.291	12.225	22.362	14.193							
03	0.598	0.538	0.597	0.459	0.516	0.525	35.058	29.335	22.881	27.023	28.146	19.930	20.491	19.984	18.291	12.225	22.362	14.193	17.659	15.065	17.799	11.127	20.957	13.209	8.931	12.632	15.873	7.832	17.443	12.676							
04	0.462	0.437	0.519	0.272	0.430	0.417	27.197	23.876	19.684	16.214	23.497	15.504	20.491	19.984	18.291	12.225	22.362	14.193	17.659	15.065	17.799	11.127	20.957	13.209	8.931	12.632	15.873	7.832	17.443	12.676							
05	0.346	0.365	0.485	0.203	0.409	0.385	20.491	19.984	18.291	12.225	22.362	14.193	17.659	15.065	17.799	11.127	20.957	13.209	8.931	12.632	15.873	7.832	17.443	12.676	0.146	0.229	0.426	0.127	0.318	0.348							
06	0.297	0.274	0.473	0.184	0.383	0.361	17.659	15.065	17.799	11.127	20.957	13.209	8.931	12.632	15.873	7.832	17.443	12.676	0.146	0.229	0.426	0.127	0.318	0.348													
07	0.146	0.229	0.426	0.127	0.318	0.348	8.931	12.632	15.873	7.832	17.443	12.676																									

Synozol Rojo ( Absorbancias)									
Dia	Temperatura								
	Ambiente			35 °C			35 °C		
	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10
00	0.827	0.908	1.323	0.827	0.908	1.323	0.827	0.908	1.323
01	0.696	0.845	1.204	0.756	0.809	1.166	0.696	0.845	1.166
02	0.666	0.693	1.197	0.602	0.643	1.106	0.666	0.693	1.106
03	0.660	0.621	0.931	0.576	0.589	0.925	0.660	0.621	0.925
04	0.655	0.581	0.895	0.519	0.511	0.841	0.655	0.581	0.841
05	0.513	0.540	0.846	0.511	0.423	0.802	0.513	0.540	0.802
06	0.500	0.412	0.839	0.508	0.409	0.745	0.500	0.412	0.745
07	0.497	0.405	0.829	0.430	0.385	0.715	0.497	0.405	0.715

Synozol Rojo ( Concentraciones respecto a volúmenes)									
Dia	Temperatura								
	Ambiente			35 °C			35 °C		
	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10
00	39.870	39.639	39.736	39.870	39.639	39.736	39.870	39.639	39.736
01	32.870	36.162	35.364	35.711	34.628	34.222	32.870	36.162	34.222
02	30.808	29.080	34.436	27.840	26.993	31.757	30.808	29.080	31.757
03	29.894	25.531	26.049	26.079	24.223	25.876	29.894	25.531	25.876
04	29.036	23.388	24.479	22.991	20.588	22.955	29.036	23.388	22.955
05	22.230	21.275	22.594	22.143	16.697	21.379	22.230	21.275	21.379
06	21.184	15.905	21.903	21.524	15.790	19.365	21.184	15.905	19.365
07	20.578	15.282	21.141	17.794	14.534	18.134	20.578	15.282	18.134

Novacrom Negro ( Absorbancias)									
Dia	Temperatura								
	Ambiente			35 °C			35 °C		
	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10
00	0.864	1.151	1.205	0.864	1.151	1.205	0.864	1.151	1.205
01	0.627	0.758	1.112	0.759	0.657	1.003	0.627	0.758	1.003
02	0.602	0.703	0.896	0.590	0.631	0.931	0.602	0.703	0.931
03	0.597	0.657	0.745	0.531	0.554	0.725	0.597	0.657	0.725
04	0.523	0.534	0.699	0.485	0.508	0.622	0.523	0.534	0.622
05	0.423	0.502	0.672	0.361	0.449	0.607	0.423	0.502	0.607
06	0.403	0.489	0.643	0.204	0.376	0.573	0.403	0.489	0.573
07	0.285	0.402	0.610	0.187	0.357	0.555	0.285	0.402	0.555

Novacrom Negro ( Concentraciones respecto a volúmenes)									
Dia	Temperatura								
	Ambiente			35 °C			35 °C		
	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10
00	39.237	41.217	39.895	39.237	41.217	39.895	39.237	41.217	39.895
01	27.445	26.687	36.008	33.575	23.164	32.387	27.445	26.687	32.387
02	25.747	24.263	28.244	25.201	21.803	29.383	25.747	24.263	29.383
03	24.988	22.219	22.844	22.048	18.773	22.206	24.988	22.219	22.206
04	21.230	17.719	20.923	19.573	16.868	18.522	21.230	17.719	18.522
05	16.508	16.309	19.644	13.858	14.611	17.684	16.508	16.309	17.684
06	15.302	15.539	18.343	7.002	12.001	16.755	15.302	15.539	16.755
07	10.145	12.524	16.964	6.150	11.146	15.309	10.145	12.524	15.309

Novacrom Negro ( Concentraciones)									
Dia	Temperatura								
	Ambiente			35 °C			35 °C		
	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10
00	39.237	41.217	39.895	39.237	41.217	39.895	39.237	41.217	39.895
01	28.005	27.231	36.742	34.261	23.637	33.047	28.005	27.231	33.047
02	26.820	25.274	29.420	26.251	22.712	30.607	26.820	25.274	30.607
03	26.583	23.637	24.302	23.455	19.972	23.624	26.583	23.637	23.624
04	23.076	19.260	22.742	21.275	18.335	20.132	23.076	19.260	20.132
05	18.336	18.121	21.827	15.398	16.235	19.624	18.336	18.121	19.624
06	17.389	17.658	20.844	7.957	13.637	18.471	17.389	17.658	18.471
07	11.796	14.562	19.725	7.152	12.961	17.861	11.796	14.562	17.861

### 3.- Cepa N° 32 Con Aireación

Día	Synozol Amarillo ( Absorbancias)									Synozol Amarillo ( Concentraciones)									Synozol Amarillo ( Concentraciones respecto a volúmenes)								
	Temperatura									Temperatura									Temperatura								
	Ambiente			35 °C			Ambiente			35 °C			Ambiente			35 °C			Ambiente			35 °C					
	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10			
00	0.735	0.799	0.988	0.735	0.799	0.988	42.977	43.443	38.906	42.977	43.443	38.906	42.977	43.443	38.906	42.977	43.443	38.906	42.977	43.443	38.906	42.977	43.443	38.906			
01	0.694	0.783	0.952	0.709	0.789	0.974	40.607	42.578	37.430	41.474	42.903	38.332	39.971	41.727	36.682	38.428	39.267	37.565	38.372	40.720	35.618	38.428	39.267	37.565			
02	0.683	0.780	0.944	0.684	0.752	0.892	39.971	42.416	37.102	40.029	40.903	34.971	34.971	41.474	38.428	39.267	37.565	38.372	40.720	35.618	38.428	39.267	37.565	37.565			
03	0.677	0.652	0.940	0.664	0.727	0.843	39.624	35.497	36.939	38.873	39.551	32.963	32.963	36.939	38.428	39.267	37.565	38.372	40.720	35.618	38.428	39.267	37.565	37.565			
04	0.625	0.624	0.876	0.524	0.576	0.734	36.618	33.984	34.316	30.780	31.389	28.496	28.496	33.984	34.316	30.780	31.389	28.496	33.984	34.316	30.780	31.389	28.496	28.496			
05	0.502	0.602	0.801	0.478	0.482	0.684	29.509	32.795	31.242	28.121	26.308	26.447	26.447	32.795	31.242	28.121	26.308	26.447	32.795	31.242	28.121	26.308	26.447	26.447			
06	0.473	0.573	0.745	0.423	0.419	0.652	27.832	31.227	28.947	24.942	22.903	25.135	25.135	31.227	28.947	24.942	22.903	25.135	31.227	28.947	24.942	22.903	25.135	25.135			
07	0.461	0.562	0.723	0.372	0.393	0.604	27.139	30.632	28.045	21.994	21.497	23.168	23.168	30.632	28.045	21.994	21.497	23.168	30.632	28.045	21.994	21.497	23.168	23.168			

Día	Synozol Rojo ( Absorbancias)									Synozol Rojo ( Concentraciones)									Synozol Rojo ( Concentraciones respecto a volúmenes)								
	Temperatura									Temperatura									Temperatura								
	Ambiente			35 °C			Ambiente			35 °C			Ambiente			35 °C			Ambiente			35 °C					
	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10			
00	0.854	0.909	1.337	0.854	0.909	1.337	41.174	39.683	40.166	41.174	39.683	40.166	41.174	39.683	40.166	41.174	39.683	40.166	41.174	39.683	40.166	41.174	39.683	40.166			
01	0.843	0.908	1.287	0.782	0.847	1.253	40.643	39.639	38.632	37.696	36.987	37.589	37.589	39.639	38.632	37.696	36.987	37.589	39.639	38.632	37.696	36.987	37.589	37.589			
02	0.752	0.850	1.008	0.754	0.829	0.927	36.246	37.117	30.074	36.343	36.204	27.589	27.589	37.117	30.074	36.343	36.204	27.589	37.117	30.074	36.343	36.204	27.589	27.589			
03	0.727	0.776	0.973	0.681	0.812	0.924	35.039	33.900	29.000	32.816	35.465	27.497	27.497	35.039	33.900	29.000	32.816	35.465	35.039	33.900	29.000	32.816	35.465	35.465			
04	0.681	0.719	0.852	0.571	0.769	0.870	32.816	31.422	25.288	27.502	33.596	25.840	25.840	31.422	25.288	27.502	33.596	25.840	31.422	25.288	27.502	33.596	25.840	25.840			
05	0.650	0.693	0.850	0.487	0.751	0.861	31.319	30.291	25.227	23.444	32.813	25.564	25.564	30.291	25.227	23.444	32.813	25.564	30.291	25.227	23.444	32.813	25.564	25.564			
06	0.535	0.674	0.837	0.438	0.687	0.842	25.763	29.465	24.828	21.077	30.030	24.982	24.982	29.465	24.828	21.077	30.030	24.982	29.465	24.828	21.077	30.030	24.982	24.982			
07	0.521	0.571	0.826	0.409	0.527	0.831	25.087	24.987	24.491	19.676	23.074	24.644	24.644	24.987	24.491	19.676	23.074	24.644	24.987	24.491	19.676	23.074	24.644	24.644			

Novacrom Negro ( Absorbancias)							Novacrom Negro ( Concentraciones)							Novacrom Negro ( Concentraciones respecto a volúmenes)						
Día	Temperatura						Día	Temperatura						Día	Temperatura					
	Ambiente			35 °C				Ambiente			35 °C				Ambiente			35 °C		
	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10		pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10		pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10
00	0.870	1.127	1.205	0.870	1.127	1.205	00	39.521	40.363	39.895	39.521	40.363	39.895	00	39.521	40.363	39.895	39.521	40.363	39.895
01	0.832	0.972	1.060	0.869	0.927	1.151	01	37.720	34.847	34.980	29.583	33.246	38.064	01	36.966	34.150	34.280	28.991	32.581	37.303
02	0.752	0.837	0.821	0.722	0.852	0.957	02	33.929	30.043	26.878	24.514	30.577	31.488	02	32.572	28.841	25.803	23.533	29.353	30.229
03	0.510	0.790	0.773	0.692	0.766	0.824	03	22.460	28.370	25.251	23.479	27.516	26.980	03	21.112	26.668	23.736	22.071	25.865	25.361
04	0.507	0.773	0.747	0.555	0.731	0.817	04	22.318	27.765	24.369	18.755	26.270	26.742	04	20.532	25.544	22.420	17.255	24.169	24.603
05	0.638	0.692	0.712	0.539	0.688	0.803	05	19.047	24.883	23.183	18.203	24.740	26.268	05	17.143	22.394	20.865	16.383	22.266	23.641
06	0.427	0.766	0.694	0.488	0.597	0.729	06	18.526	27.516	22.573	16.445	21.502	23.759	06	16.303	24.214	19.864	14.471	18.922	20.908
07	0.409	0.824	0.682	0.470	0.552	0.705	07	17.673	29.580	22.166	15.824	19.900	22.946	07	15.199	25.439	19.063	13.609	17.114	19.733

#### 4.- Cepa N° 32 Sin Aireación

Synozol Amarillo ( Absorbancias)							Synozol Amarillo ( Concentraciones)							Synozol Amarillo ( Concentraciones respecto a volúmenes)						
Día	Temperatura						Día	Temperatura						Día	Temperatura					
	Ambiente			35 °C				Ambiente			35 °C				Ambiente			35 °C		
	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10		pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10		pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10
00	0.715	0.790	0.992	0.715	0.790	0.992	00	41.821	42.957	39.070	41.821	42.957	39.070	00	41.821	42.957	39.070	41.821	42.957	39.070
01	0.696	0.587	0.985	0.649	0.679	0.985	01	40.723	31.984	38.783	38.006	36.957	38.783	01	39.908	31.944	38.007	37.246	36.218	38.007
02	0.635	0.563	0.853	0.607	0.576	0.778	02	37.197	30.686	33.373	35.578	31.389	30.299	02	35.709	29.459	32.038	34.155	30.134	29.087
03	0.527	0.554	0.752	0.518	0.542	0.754	03	30.954	30.200	29.234	30.434	29.551	29.316	03	29.097	28.388	27.480	28.608	27.778	27.557
04	0.514	0.502	0.731	0.495	0.530	0.732	04	30.202	27.389	28.373	29.104	28.903	28.414	04	27.786	25.198	26.103	26.776	26.590	26.141
05	0.485	0.475	0.727	0.381	0.512	0.690	05	28.526	25.930	28.209	22.514	27.930	26.693	05	25.673	23.337	25.388	20.263	25.137	24.023
06	0.380	0.460	0.713	0.368	0.473	0.685	06	22.457	25.119	27.635	21.763	25.822	26.488	06	19.762	22.105	24.319	19.151	24.319	23.399
07	0.355	0.425	0.699	0.317	0.401	0.651	07	21.012	23.227	27.061	18.815	21.930	25.094	07	18.070	19.975	23.273	16.181	18.860	17.844

Synosol Rojo ( Concentraciones respecto a volúmenes)									
Dia	Temperatura								
	Ambiente			35 °C			35 °C		
	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10
00	36.117	40.030	39.736	39.870	40.030	39.736	39.870	40.030	39.736
01	35.332	38.846	37.108	37.865	33.465	36.730	36.610	32.796	35.995
02	31.875	30.666	27.928	34.362	28.987	29.920	32.988	27.827	28.723
03	30.575	28.106	26.135	33.879	28.204	28.080	31.846	26.512	26.395
04	29.124	24.388	24.761	26.914	24.378	26.945	29.480	22.428	24.789
05	23.143	23.545	23.450	26.055	23.204	24.399	25.448	20.884	21.959
06	20.376	21.644	22.200	20.691	20.683	24.245	18.208	18.201	21.336
07	17.960	17.039	19.347	18.227	18.639	23.908	15.675	16.030	20.561

Synosol Rojo ( Concentraciones)									
Dia	Temperatura								
	Ambiente			35 °C			35 °C		
	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10
00	36.117	40.030	39.736	39.870	40.030	39.736	39.870	40.030	39.736
01	36.053	39.639	37.865	37.357	33.465	36.730	36.610	32.796	35.995
02	33.203	31.943	29.092	34.362	28.987	29.920	32.988	27.827	28.723
03	32.527	29.900	27.804	33.879	28.204	28.080	31.846	26.512	26.395
04	31.657	26.509	26.914	32.043	24.378	26.945	29.480	22.428	24.789
05	25.715	26.161	26.055	28.275	23.204	24.399	25.448	20.884	21.959
06	23.155	24.596	25.227	20.691	20.683	24.245	18.208	18.201	21.336
07	20.884	19.813	22.497	18.227	18.639	23.908	15.675	16.030	20.561

Synosol Rojo ( Absorbancias)									
Dia	Temperatura								
	Ambiente			35 °C			35 °C		
	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10
00	0.827	0.917	1.323	0.827	0.917	1.323	0.827	0.917	1.323
01	0.748	0.908	1.262	0.775	0.766	1.225	0.748	0.908	1.262
02	0.689	0.731	0.976	0.713	0.663	1.003	0.689	0.731	0.976
03	0.675	0.684	0.934	0.703	0.645	0.943	0.675	0.684	0.934
04	0.657	0.606	0.905	0.665	0.557	0.906	0.657	0.606	0.905
05	0.534	0.598	0.877	0.587	0.530	0.823	0.534	0.598	0.877
06	0.481	0.562	0.850	0.430	0.472	0.818	0.481	0.562	0.850
07	0.434	0.452	0.761	0.379	0.425	0.807	0.434	0.452	0.761

Novacrom Negro ( Concentraciones respecto a volúmenes)									
Dia	Temperatura								
	Ambiente			35 °C			35 °C		
	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10
00	32.071	41.217	42.098	40.659	41.217	42.098	40.659	41.217	42.098
01	36.362	29.337	31.556	35.108	28.465	35.642	35.108	28.465	35.642
02	32.162	26.381	27.300	33.171	28.121	32.403	31.844	26.996	31.107
03	29.799	23.423	23.481	31.512	26.982	29.454	29.621	25.363	27.687
04	28.773	17.686	22.358	30.280	25.345	24.912	27.857	23.318	22.919
05	25.545	15.188	20.133	29.190	21.573	24.166	26.271	19.416	21.749
06	22.976	12.815	19.506	22.166	23.313	20.968	20.515	18.452	19.387
07	20.375	12.401	18.130	21.081	17.720	19.153	15.240	16.472	18.247

Novacrom Negro ( Concentraciones)									
Dia	Temperatura								
	Ambiente			35 °C			35 °C		
	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10
00	32.071	41.217	42.098	40.659	41.217	42.098	40.659	41.217	42.098
01	37.104	29.936	32.200	35.825	29.046	36.369	35.825	29.046	36.369
02	33.502	27.480	28.437	33.171	28.121	32.403	33.171	28.121	32.403
03	31.701	24.918	24.980	31.512	26.982	29.454	31.512	26.982	29.454
04	31.275	19.224	24.302	30.280	25.345	24.912	30.280	25.345	24.912
05	28.384	16.875	22.369	29.190	21.573	24.166	28.384	16.875	22.369
06	26.109	14.562	22.166	23.313	20.968	22.091	23.313	20.968	22.091
07	23.692	14.420	21.081	17.720	19.153	21.217	23.692	14.420	21.217

Novacrom Negro ( Absorbancias)									
Dia	Temperatura								
	Ambiente			35 °C			35 °C		
	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10	pH 6	pH 8	pH 10
00	0.894	1.151	1.270	0.894	1.151	1.270	0.894	1.151	1.270
01	0.819	0.834	0.978	0.792	0.809	1.101	0.819	0.834	0.978
02	0.743	0.765	0.867	0.736	0.783	0.984	0.743	0.765	0.867
03	0.705	0.693	0.765	0.701	0.751	0.897	0.705	0.693	0.765
04	0.696	0.533	0.745	0.675	0.705	0.763	0.696	0.533	0.745
05	0.635	0.467	0.688	0.652	0.599	0.741	0.635	0.467	0.688
06	0.587	0.402	0.682	0.528	0.582	0.678	0.587	0.402	0.682
07	0.556	0.398	0.650	0.410	0.531	0.654	0.556	0.398	0.650

**ANEXO N° 07. Evaluación de la influencia de factores cepa, aireación, ph, colorante y temperatura. Análisis multifactor categórico.**

**Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para concentraciones (ppm) con intervalos de confianza del 95.0%**

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Error Est.</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
MEDIA GLOBAL	72	17.878			
Cepa					
Cepa 15	36	16.6299	0.412222	15.8051	17.4548
Cepa 32	36	19.1261	0.412222	18.3012	19.9509
Aireación					
Con aireación	36	19.8351	0.412222	19.0102	20.66
Sin aireación	36	15.9209	0.412222	15.096	16.7457
pH					
6	24	16.5697	0.504867	15.5595	17.5799
8	24	17.8946	0.504867	16.8843	18.9048
10	24	19.1697	0.504867	18.1595	20.1799
Colorante					
Amarillo	24	17.8201	0.504867	16.8098	18.8303
Negro	24	16.3554	0.504867	15.3451	17.3656
Rojo	24	19.4585	0.504867	18.4483	20.4687
Temperatura					
35°C	36	16.9317	0.412222	16.1069	17.7566
T.Ambiente	36	18.8243	0.412222	17.9994	19.6491
Cepa por Aireación					
Cepa 15,Con aireación	18	19.6718	0.58297	18.5052	20.8383
Cepa 15,Sin aireación	18	13.5881	0.58297	12.4216	14.7546
Cepa 32,Con aireación	18	19.9984	0.58297	18.8319	21.165
Cepa 32,Sin aireación	18	18.2537	0.58297	17.0871	19.4202
Cepa por Colorante					
Cepa 15,Amarillo	12	14.8844	0.71399	13.4557	16.3131
Cepa 15,Negro	12	15.4089	0.71399	13.9802	16.8376
Cepa 15,Rojo	12	19.5964	0.71399	18.1677	21.0251
Cepa 32,Amarillo	12	20.7557	0.71399	19.327	22.1844
Cepa 32,Negro	12	17.3018	0.71399	15.8731	18.7305
Cepa 32,Rojo	12	19.3206	0.71399	17.8919	20.7493
Aireación por pH					
Con aireación,6	12	18.7574	0.71399	17.3287	20.1861
Con aireación,8	12	20.7785	0.71399	19.3498	22.2072
Con aireación,10	12	19.9694	0.71399	18.5407	21.3981
Sin aireación,6	12	14.382	0.71399	12.9533	15.8107
Sin aireación,8	12	15.0106	0.71399	13.5819	16.4393
Sin aireación,10	12	18.37	0.71399	16.9413	19.7987

**ANEXO N° 08.- DATOS ANOVA DEL MODELO LINEAL REFINADO**

Fila	Observado	Ajustado	Residuo
1	19.3624	17.5725	1.78986
2	18.5671	15.68	2.88705
3	24.3999	22.2845	2.11539
4	20.5777	20.392	0.185735
5	17.4405	18.097	-0.656515
6	18.5817	16.2045	2.37723
7	20.6725	18.8725	1.79995
8	19.4174	16.98	2.4374
9	23.0592	23.5845	-0.525313
10	19.881	21.692	-1.81097
11	16.441	19.397	-2.95602
12	21.1542	17.5045	3.64972
13	20.0302	20.1726	-0.142352
14	15.7302	18.28	-2.54976
15	21.2204	24.8845	-3.66412
16	18.556	22.992	-4.43598
17	22.2696	20.697	1.57257
18	16.7306	18.8045	-2.07389
19	7.6803	11.4889	-3.80857
20	6.7358	9.59633	-2.86053
21	20.5777	16.2008	4.37686
22	17.7941	14.3083	3.4858
23	10.1447	12.0133	-1.86865
24	6.1504	10.1208	-3.97041
25	10.8639	12.7889	-1.92498
26	15.0012	10.8963	4.10486
27	15.2818	17.5008	-2.21905
28	14.534	15.6083	-1.0743
29	12.5236	13.3134	-0.789754
30	11.1463	11.4208	-0.274512
31	13.6507	14.0889	-0.438185
32	10.9016	12.1963	-1.29474
33	21.1412	18.8009	2.34035
34	18.1339	16.9083	1.22559
35	16.9639	14.6134	2.35054
36	15.3605	12.7208	2.63968
37	23.3393	21.2744	2.0649
38	18.915	19.3819	-0.466854
39	21.5748	19.8393	1.73554

Fila	Observado	Ajustado	Residuo
40	16.9216	17.9467	-1.02512
41	11.7998	17.8205	-6.02069
42	13.6088	15.9279	-2.31915
43	26.3439	22.5744	3.7695
44	18.4877	20.6819	-2.19416
45	21.4888	21.1393	0.349532
46	19.8436	19.2467	0.596874
47	25.4389	19.1205	6.31841
48	17.1143	17.228	-0.113651
49	24.1188	23.8744	0.244393
50	19.9245	21.9819	-2.05737
51	21.0621	22.4393	-1.37717
52	21.194	20.5467	0.647267
53	19.0628	20.4205	-1.3577
54	19.7334	18.528	1.20544
55	18.0699	19.5296	-1.4597
56	16.1809	17.6371	-1.45616
57	17.9603	18.0945	-0.134167
58	15.6753	16.2019	-0.526626
59	20.3751	16.0757	4.29941
60	15.2395	14.1832	1.05635
61	19.9752	20.8296	-0.854407
62	18.8596	18.9371	-0.0774653
63	17.0392	19.3945	-2.35527
64	16.0297	17.5019	-1.47223
65	12.4011	17.3757	-4.9746
66	16.4716	15.4832	0.988443
67	23.2729	22.1296	1.14329
68	21.5811	20.2371	1.34403
69	22.4969	20.6945	1.80242
70	20.5609	18.8019	1.75896
71	18.13	18.6757	-0.545705
72	18.2466	16.7832	1.46344
	PROMEDIO	17.87799208	-0.00000017

SUMA DE CUADRADOS	
MODELO	RESIDUO
0.0933	3.2036
4.8312	8.3351
19.4172	4.4749
6.3202	0.0345
0.0480	0.4310
2.8006	5.6512
0.9890	3.2398
0.8064	5.9409
32.5641	0.2760
14.5466	3.2796
2.3074	8.7381
0.1395	13.3205
5.2652	0.0203
0.1616	6.5013
49.0910	13.4258
26.1530	19.6779
7.9468	2.4730
0.8584	4.3010
40.8206	14.5052
68.5861	8.1826
2.8130	19.1569
12.7428	12.1508
34.3947	3.4919
60.1742	15.7642
25.8989	3.7055
48.7441	16.8499
0.1423	4.9242
5.1515	1.1541
20.8356	0.6237
41.6954	0.0754
14.3573	0.1920
32.2817	1.6764
0.8517	5.4772
0.9403	1.5021
10.6576	5.5250
26.5967	6.9679
11.5355	4.2638
2.2617	0.2180
3.8467	3.0121
0.0047	1.0509

MODELO	RESIDUO
0.0033	36.2487
3.8029	5.3785
22.0562	14.2091
7.8619	4.8143
10.6361	0.1222
1.8733	0.3563
1.5438	39.9223
0.4225	0.0129
35.9568	0.0597
16.8420	4.2328
20.8055	1.8966
7.1220	0.4190
6.4643	1.8433
0.4225	1.4531
2.7278	2.1307
0.0580	2.1204
0.0469	0.0180
2.8093	0.2773
3.2483	18.4849
13.6515	1.1159
8.7119	0.7300
1.1217	0.0060
2.2998	5.5473
0.1415	2.1675
0.2523	24.7466
5.7351	0.9770
18.0761	1.3071
5.5654	1.8064
7.9327	3.2487
0.8536	3.0939
0.6363	0.2978
1.1986	2.1417
<b>850.5525</b>	<b>414.9801</b>

Análisis de Varianza					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	<b>850.5525</b>	9	94.5058	14.1196	0
Residuo	<b>414.9801</b>	62	6.6932		
Total (Corr.)	1265.53	71			