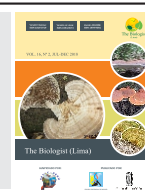




The Biologist (Lima)



ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL

ACTION OF *PLEUROTUS OSTREATUS* (JACQ EX FR) KUMM IN THE REMOVAL OF BLUE COLOR TURKEY IN BIOREACTORS AIR LIFT

ACCIÓN DE *PLEUROTUS OSTREATUS* (JACQ. EX FR) KUMM EN LA REMOCIÓN DEL COLORANTE AZUL TURQUESA EN BIORREACTORES AIR LIFT

Ladislao Ruiz^{1*}; José Iannacone^{2,3}; Iván Tocto¹; Analiz Ruiz¹ & Paradise Harirchian¹

¹Laboratorio de Micología y Tecnología de la Propagación. Escuela Profesional de Ingeniería en Recursos Naturales Renovables. Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María, Perú

²Laboratorio de Ecología y Biodiversidad Animal (LEBA). Facultad de Ciencias Naturales y Matemática. Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV), El Agustino, Lima, Perú.

³Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Ricardo Palma (URP), Santiago de Surco, Lima, Perú.

*ladislaoruiz.lad@gmail.com/joseiannacone@gmail.com

ABSTRACT

White rot fungi are a biotechnological alternative for the remediation of contaminated ecosystems. The objective was to evaluate the action of *Pleurotus ostreatus* (Jacq ex Fr) Kumm in the removal of turquoise blue dye in air lift bioreactors. The mycelium of nine white rot fungi was isolated from fragments of the fruiting body collected from forest areas in Tingo María, these were transferred in Sabouraud broth containing 100, 200 and 400 mg·L⁻¹ of turquoise blue dye as a pollutant and incubated for 14 days at room temperature. The selected fungus (*P. ostreatus*) was reproduced in 80 mL of Sabouraud broth and pulsed in the air lift bioreactors containing 800 mL of Minimal Salt medium with 100, 200 and 400 mg·L⁻¹ of turquoise blue dye. They were determined to 9 species of fungi, distributed in 9 genera and 5 families, being mostly Polyporaceae (4 genus) and Coriolaceae (2 genus). The removal of the turquoise blue dye in air lift bioreactors by the selected fungus *P. ostreatus* achieves a significant removal efficiency at 20 days of 76.93, 69.25 and 84.76% at concentrations of 100, 200 and 400 mg·L⁻¹ respectively, with most removal in the first 5 days and reduced in the following 15 days. Likewise, greater consumption of dissolved oxygen was observed in the first ten days; increase in carbon dioxide after five days and a minimum decrease in internal temperature and pH. This shows that *P. ostreatus* may have a marked removal action on this dye.

Keywords: isolations – mushrooms – pollutants – removal – biodegradation

RESUMEN

Los hongos de pudrición blanca, constituyen una alternativa biotecnológica para la restitución de ecosistemas contaminados. El objetivo fue evaluar la acción de *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr) Kumm en la remoción del colorante azul turquesa en biorreactores air lift. Se aislaron el micelio de nueve hongos de pudrición blanca a partir de fragmentos del cuerpo fructífero colectados de áreas boscosas en Tingo María, éstos fueron transferidos en caldo Sabouraud conteniendo 100, 200 y 400 mg·L⁻¹ de colorante azul turquesa como contaminante inducido para seleccionar al que muestre mejor desarrollo micelial durante 14 días a temperatura ambiente. El hongo seleccionado (*P. ostreatus*), fue reproducido en 80 mL de caldo Sabouraud y repicado en los biorreactores air lift conteniendo 800 mL de Medio Mínimo de Sales con 100, 200 y 400 mg·L⁻¹ de colorante azul turquesa. Se determinaron a 9 especies de hongos, distribuidas en 9 géneros y 5 familias, siendo en su mayoría Polyporaceae (4 géneros) y Coriolaceae (2 géneros). La remoción del colorante azul turquesa en biorreactores air lift por el hongo seleccionado *P. ostreatus* logra una eficiencia de remoción significativa a los 20 días de 76,93, 69,25 y 84,76% a concentraciones de 100, 200 y 400 mg·L⁻¹ respectivamente, notándose claramente mayor remoción en los primeros 5 días y reducida en los 15 días siguientes. Así mismo, como parámetros medidos en los biorreactores se obtuvieron mayor consumo de oxígeno disuelto en los diez primeros días; incremento del dióxido de carbono después de los cinco días y un mínimo descenso de la temperatura interna y del pH. Esto demuestra que *P. ostreatus*, tienen una marcada acción de remoción de éste colorante.

Palabras clave: aislamientos – hongos – contaminantes – remoción – biodegradación

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, las nuevas tecnologías han hecho hincapié en el avance y aplicación de tácticas de remediación sustentables, consideradas como menos costosas y menos destructivas del medio, comparadas con las tecnologías de tratamientos físicos y químicos (Carbajal, 2014). Actualmente, la población humana enfrenta el desafío de convertir los procesos productivos en procesos limpios y eficientes; para esto necesitamos el desarrollo de tecnologías apropiadas y económicas a fin de restaurar los sitios dañados ambientalmente, precisamente la biorremediación constituye una de las alternativas con muchos beneficios ambientales (Shedbalkar *et al.*, 2008).

Los principales métodos de tratamientos biológicos son la biosorción, biorremediación y biodegradación, reconocidos como métodos efectivos para el tratamiento de decoloración y degradación de colorantes en aguas residuales industriales altamente contaminadas, aquí los contaminantes pueden ser metabolizados por los

microorganismos por reacciones bioquímicas redox, aunque también pueden realizar reacciones de hidroxilación, hidrólisis, deshalogenación y desaquilación (Alatorre & Moeller, 2006). La biosorción, es un proceso que utiliza a la biomasa (Kuhad *et al.*, 1997).

Los tintes y colorantes sintéticos son compuestos químicos xenobióticos que presentan estructuras moleculares complejas y están destinados a ser inestables (Boyter, 2007), y por eso las plantas de tratamiento convencionales tienen un bajo porcentaje de remoción (Alatorre & Moeller, 2006). Los colorantes azoicos son utilizados en grandes cantidades en las industrias textil y alimentaria, siendo su vertido sin tratamiento a las fuentes de agua, incluso a bajas concentraciones, produciendo una intensa coloración que genera un fuerte impacto visual y tóxico al ambiente (Kuppusamy, 1995; Rodríguez *et al.*, 1999). La biorremediación de colorantes se puede lograr a través de biosorción o biodegradación. Aquí las moléculas de colorante se unen a la superficie de la biomasa, mientras que, en la biodegradación, las enzimas son responsables de degradar grandes

moléculas de colorante tóxicos en compuestos más simples y menos tóxicos (Jadhav & Govindwar, 2006).

En los hongos, a pesar de su gran importancia, los estudios sobre su biodiversidad son muy escasos (Guzmán, 2003). El número de especies de hongos en el mundo se ha estimado en 1 500 000 especies; contrastando, marcadamente con las 70 000 descritas (Hawksworth, 1991), por lo que son de los grupos de organismos más pobremente estudiados. En el Perú, existen pocos estudios referidos a hongos, solo se registran investigaciones realizadas por Pavlich (1976) sobre Ascomycetos y Basidiomycetos en la ceja de montaña y selva tropical; Door & Abad (1990) en hongos comestibles en bosque de Dantas-Huánuco; Ríos & Ruiz (1993) en el cultivo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr) Kumm; Grazis (2004) en la micoflora en Madre de Dios; Mori *et al.* (2011) en Ascomycetos y Basidiomycetos macroscópicos en bosque de Puerto Almendras. Los hongos en general, mayormente responden bien al aislamiento en medio agar papa dextrosa (Guzmán & Mata, 1993).

Los hongos causantes de pudrición blanca, es decir, los hongos que mineralizan la lignina y sus derivados (Eaton & Hale, 1993; Pointing *et al.*, 2003) en su mayoría son Basidiomycetes, que accionan la degradación por la presencia de tres tipos de enzimas: Lignina peroxidasa (LiPs), Mn-Peroxidasas (Mn- Ps) las cuales dependen del peróxido de hidrógeno, y Lacasa, la cual depende del oxígeno molecular (Baldrian, 2002), razón por el cual estos hongos pueden accionar en compuestos que tienen estructuras aromáticas similares, como muchos compuestos orgánicos persistentes (Kuhad *et al.*, 1997). Esos procesos biodegradativos se llevan a cabo en presencia de oxígeno (Albert, 1998). Los hongos de pudrición blanca son bastante reconocidos por su capacidad para metabolizar una amplia variedad de compuestos orgánicos persistentes (Mileski *et al.*, 1988; Valentín *et al.*, 2006; Tišma *et al.*, 2010), y por demostrar una elevada capacidad degradativa, debido a que son más tolerantes a altas concentraciones del contaminante que las bacterias (Evans & Hedger, 2001; Ponce & Bobadilla, 2015). *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor* (L.:Fr.) Quél. fueron estudiados en la remoción de colorantes textiles, principalmente de colorantes

tipo azo, logrando porcentajes de degradación del 90%, incluso 100% entre 7 a 20 días (Garzón, 2009; Kaushik & Malik, 2009).

Pleurotus ostreatus, tiene la capacidad de degradar a los colorantes rojo erionil, azul terasil, rojo cibacrón y turquesa erionyl, en más de un 80% en 9 días de tratamiento en efluentes líquidos simulados (Cardona *et al.*, 2009). Rodríguez *et al.* (1999) al analizar el efecto de extractos fúngicos enzimáticos extracelulares crudos de *Trametes trogii* Berk, 1850 y *P. ostreatus*, en la eliminación de 23 colorantes, demostraron una alta actividad de la MnP y de Lacasa de *P. ostreatus* asociada con la degradación de los colorantes. Con el hongo *Phanerochaete chrysosporium* Burdsall logran biodegradar los colorantes nigrosina, fucsina básica, verde malaquita y mezcla en 90,15%, 89,8%, 83,25% y 78,4%, respectivamente (Rani *et al.*, 2014). Lo que demuestra el potencial de éstos extractos fúngicos extracelulares para eliminar colorantes en el suelo y en el agua. Últimamente, el empleo de los hongos de la pudrición blanca, ha demostrado gran potencial para la biodegradación de un amplio espectro de contaminantes como los plaguicidas químicos (Quintero, 2011), y estaría asociada a la presencia de enzimas extracelulares, lo que muestran evidencias del potencial de biodegradación de diferentes especies de hongos de la pudrición blanca (Camacho-Morales *et al.*, 2017).

Parámetros referidos a O₂, CO₂, pH, y temperatura son esenciales conocer en el proceso de operación de los biorreactores y la remoción del contaminante, porque cualquier organismo vivo fuera de su hábitat natural experimenta condiciones ambientales que limitan su crecimiento (Galindo *et al.*, 2007). En efecto todas estas condiciones incluyendo la inadecuada manipulación generan cambios dentro del biorreactor y “estresan” a los organismos que necesitan adaptarse a dichos cambios para poder crecer y esto está íntimamente ligado a limitación de nutrientes y depende del tipo de sustrato con el cual se trabaja (Chávez *et al.*, 2003; Osorio *et al.*, 2011).

El presente estudio tuvo como objetivo, determinar la capacidad de degradación del colorante azul turquesa por el hongo *P. ostreatus* en cultivo sumergido en biorreactores air lift.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del área de colección de los hongos

Las colecciones de las especies de hongos se realizaron del Bosque Reservado y Jardín Botánico de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS) en Tingo María, Perú, situada ecológicamente en la formación vegetal bosque muy húmedo Pre-montano Sub Tropical bmh-PST (Holdridge, 1987), y de acuerdo a las regiones naturales del Perú pertenece a Rupa Rupa o Selva Alta. La precipitación anual promedio es de 3428,8 mm, siendo mayor entre los meses de septiembre a abril y alcanza un máximo extremo en el mes de enero con un promedio mensual de 483,6 mm. Tiene una humedad relativa de 87%, temperatura máxima de 29,4 °C, mínima 19,2 °C, y media anual de 24,3 °C. Las pruebas de remoción se realizaron en el Laboratorio de Micología y Tecnología de la Propagación de la UNAS, Tingo María, Perú.

Colección, descripción e identificación de los hongos

Para la colección se utilizó una ficha, donde se realizaron las anotaciones generales e información de la zona, así como acotaciones propiamente de cada muestra referidas a sus características externas. Las muestras fueron codificadas, descritas y fotografiadas; una parte para el aislamiento y otra parte de las muestras de cada especie fueron secadas a estufa a 60 °C por un periodo de tiempo de 24 a 72 h dependiendo del espécimen (Robledo, 2006; Ryvarde, 2007), esto con la finalidad de conservar en buen estado, se depositaron en la colección de hongos del Laboratorio de Micología y Tecnología de la Propagación de la UNAS. La identificación genérica y específica de Polyporaceos fue realizada con el apoyo de Leif Ryvarde (Noruega), y a través de comparación con fotografías del catálogo “Hongos de Allpahuayo–Mishana” (Espinoza *et al.*, 2006).

Aislamiento y siembra en medio de cultivo

El cuerpo fructífero fresco y limpio, de la más alta calidad en tamaño, color y forma de cada espécimen, con la ayuda de una pinza y bisturí fueron aislados de una pequeña porción o fragmento aproximadamente de 0,5 cm² del contexto cercana a la base o pie de la muestra. Los fragmentos cortados en pedazos fueron

desinfectados con hipoclorito de sodio al 5% en una proporción de 1:10x1 min, seguidamente los inóculos fueron enjuagados en agua destilada estéril y secados en papel filtro (Botelho & Ramos, 1985; Ríos & Ruiz, 1993; Alexopoulos *et al.* 1996; Saldarriaga, 2001); finalmente, los inóculos fueron depositados en el centro de cada placa Petri de 90 mm de diámetro conteniendo el medio agar papa dextrosa. Esta operación se hizo cuidadosamente en la cámara de flujo para evitar el riesgo de contaminación. Posteriormente, las placas sembradas fueron codificadas y selladas con parafilm e incubadas a oscuridad a 28 °C entre 8 a 15 días, lapso de tiempo en que el micelio cubrió el área total de las placas Petri.

Preparación de caldo Sabouraud

Para 1 litro de caldo Sabouraud se usaron dextrosa (40 g), peptona (10 g) y agua destilada (1 L), esterilizado en autoclave y vertido en matraces en la cámara de flujo laminar. Este medio fue empleado para activación de las cepas de los hongos, por lo que requieren nutrientes bastantes ricos en carbono (Aquiuhuat *et al.*, 2012).

Preparación de medio mínimo de sales (MMS)

La preparación de 1 litro de MMS, requiere de: fosfato de potasio dibásico (5,23 g), fosfato de potasio monobásico (1,91 g), sulfato de magnesio (0,09 g), sulfato de amonio (1 g), trozo de elemento (1 mL) (el trozo de elemento, ha sido preparado usando las siguientes proporciones: ácido bórico (20 mg), sulfato de Zn (30 mg), sulfato de cobre (1 mg), molibdato de sodio (3 mg), sulfato de hierro (10 mg), sulfato de magnesio (2,6 mg) y agua destilada (1 L)). Al medio se agregó el colorante a concentraciones de 100 mg·L⁻¹, 200 mg·L⁻¹ y 400 mg·L⁻¹. El medio fue autoclavado en frascos de vidrio y se repartió 75 mL de la solución en matraces Erlenmeyer esterilizados de capacidad de 200 mL (Prado *et al.*, 2013).

Selección del hongo frente al colorante como contaminante inducido

Al medio mínimo de sales se añadió glucosa (0,25 g·L⁻¹), extracto de levadura al 0,1% y el colorante (100 mg·L⁻¹, 200 mg·L⁻¹ y 400 mg·L⁻¹) se esterilizó en la autoclave. El medio frío se repartió la solución en matraces Erlenmeyer esterilizados y se procedió a inocular 7,5 mL del caldo Sabouraud en activación el micelio axénico de las nueve cepas de hongos. Se dejó incubar por 14 días a temperatura

ambiente. La evaluación fue mediante observaciones de crecimiento y biomasa fúngica.

Acondicionamiento de los biorreactores air lift

Los biorreactores fueron acondicionados en el laboratorio, se desinfectó con alcohol ácido al 1% por 2 días y luego se añadió agua con hipoclorito de sodio por 1 día y finalmente se enjuagaron con agua destilada.

Proceso y operación en biorreactores air lift para la biodegradación

La cepa seleccionada *P. ostreatus* fue repicada en caldo Sabouraud del cual se prepararon los inóculos de 80 mL (10%) referidos al volumen total del medio en los biorreactores. Se agregaron las diferentes concentraciones del colorante azul turquesa (100 mg·L⁻¹, 200 mg·L⁻¹ y 400 mg·L⁻¹) en cada biorreactor adicionados de extracto de levadura (0,1%) y glucosa (0,25 g·L⁻¹) como inductor y co-metabolito respectivamente. El proceso fue realizado por el periodo de 20 días, a temperatura ambiente y en una situación totalmente estéril acondicionado para procesos biotecnológicos. La operación fue iniciada al poner en funcionamiento la fuente de aireación con un filtro de una solución saturada de ClNa para que el aire que ingrese a los biorreactores sea estéril. Se tomaron datos al inicio, a los 5, 10, 15 y 20 días.

Proceso de extracción de biomasa fúngica

En un tubo de centrifuga de PVC (VWR) con tapa rosca se tomaron una fracción de 50 mL del biorreactor en funcionamiento y totalmente homogéneo, se realizaron la disociación por medio de centrifugación a 2,500 rpm para separar la biomasa (sedimento) del sobrenadante, en el cual se encontraría el contaminante en solución. Los sobrenadantes (efluentes) fueron almacenados en refrigeración (4 a 8 °C) hasta la realización de las pruebas espectrofotométricas cuantitativas de la presencia del contaminante. Asimismo, la biomasa separada obtenida en los tubos, fue procesada para la determinación de la densidad celular por peso seco de la biomasa.

Densidad celular fúngica

La biomasa separada por centrifugación fue lavada con agua destilada estéril por tres veces y secada en estufa durante 8 h a 80 °C (López *et al.*, 2006). La densidad celular fue determinada por la medida del peso seco de la biomasa celular (micelio):

$$\text{Biomasa} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) = X_2 - X_1$$

X₁: Peso del papel solo

X₂: Peso del papel con biomasa

Concentración del colorante azul turquesa

La concentración del colorante fue cuantificada en el Laboratorio de Fotoquímica de la UNAS, mediante el espectrofotómetro ultravioleta UV Vis (Thermo Orion™ AquaMate 8000). Antes se ha tenido que determinar la curva patrón con una longitud de onda (λ =550), con diluciones de muestras de contenido conocido para realizar su registro.

Eficiencia de remoción

Calculado mediante una correlación porcentual entre la concentración inicial y la concentración final del colorante presente en los biorreactores, y de acuerdo a los tratamientos establecidos, mediante la siguiente fórmula:

$$E_r = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100$$

Donde:

E_r = eficiencia de remoción (%)

C_i = Concentración inicial del elemento (mg·L⁻¹).

C_f = Concentración final del elemento (mg·L⁻¹).

Parámetros analizados

Oxígeno disuelto

Se registró mediante el oxímetro HANNA (electrodo de membrana) poniendo el medidor en operación y sumergiendo el electrodo en las muestras, los resultados se reportan en mg·L⁻¹ (APHA, 1999).

Dióxido de carbono

Se determinó utilizando fenoltaleína al 1% como indicador y NaOH 0,01M como titulante, cada 5 gotas gastadas de hidróxido indica 1 mg·L⁻¹ de CO₂ (Hach, 2002).

Temperatura

La temperatura interna de operación fue medida introduciendo el termómetro digital en los biorreactores.

Medición de pH

Medido con pHmetro EXTECH debidamente calibrado para la determinación del pH (Método N° 0.1132 de AOAC, 2000).

Análisis de datos

Los datos respecto a la remoción del colorante azul turquesa en biorreactores air lift utilizando *P. ostreatus* fueron procesados en hojas de cálculo Ms Excel y para comparar la tasa de remoción bajo diferentes concentraciones de colorante, se aplicó el Análisis de la Varianza de una Vía (ANOVA) a un nivel de significación del 0,05 en el software estadístico SPSS v. 23.

RESULTADOS

Aislamiento e identificación de los hongos

Se aislaron en medio agar papa dextrosa e identificaron a nueve especies, clasificadas en cinco familias, dos del orden agaricales, siete del orden Aphyllophorales (Polyporales), pertenecientes al Phylum Basidiomycota. Todos son hongos que generan pudrición blanca y fueron colectados de la zona de Tingo María, Huánuco-Perú (Fig. 1, Tabla 1).



Trametes elegans



Ganoderma applanatum



Rigidoporus lineatus



Coriolopsis polyzona



Earliella scabrosa



Pycnoporus sanguineus



Schizophyllum commune



Pleurotus ostreatus



Polyporus craterellus

Figura 1. Láminas de nueve hongos de pudrición blanca aislados e identificados (Fotos Ladislao Ruiz).

Tabla 1. Hongos de pudrición blanca colectados e identificados.

N°	Código	Nombre Científico	Familia
1	FTM-200	<i>Trametes elegans</i> (Fr.) Fr.	Polyporaceae
2	FTM-203	<i>Ganoderma applanatum</i> (Pers.) Pat.	Ganodermataceae
3	FTM-204	<i>Rigidoporus lineatus</i> (Pers.) Ryvarden	Coriolaceae
4	FTM-206	<i>Coriolopsis polyzona</i> (Pers.) Ryvarden	Coriolaceae
5	FTM-211	<i>Earliella scabrosa</i> (Pers.) Gilb. & Ryvarden	Polyporaceae
6	FTM-212	<i>Pycnoporus sanguineus</i> (L.) Murril	Polyporaceae
7	FTM-216	<i>Schizophyllum commune</i> Fries	Schizophyllaceae
8	FTM-220	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq. ex Fr) Kumm	Pleurotaceae
9	FTM-226	<i>Polyporus craterellus</i> Berk. & M.A. Curtis	Polyporaceae

Selección del hongo para la prueba en los biorreactores

El hongo seleccionado a través de esta prueba fue *P. ostreatus*, debido a que mostró desde regular a buen desarrollo del micelio en un medio mínimo de

sales a tres concentraciones del colorante azul turquesa como contaminante inducido, razón por el cual, fue seleccionado para los experimentos de remoción en los biorreactores air lift (Tabla 2).

Tabla 2. Cultivo puro de los nueve hongos en un medio mínimo de sales a diferentes concentraciones del colorante azul turquesa.

Uso como contaminante	CC. (mg·L ⁻¹)	Repet.	FTM	FTM	FTM	FTM	FTM	FTM	FTM	FTM	FTM
			200	203	204	206	211	212	216	220	226
Colorante Azul turquesa	400	R1	x	0	xx	0	X	x	x	xxx	xx
		R2	x	x	x	0	xx	x	x	xx	x
		R3	x	x	xx	0	xxx	xx	x	xxx	xx
	200	R1	xx	x	xx	xxx	xx	xxx	xx	xxx	x
		R2	xx	xx	x	xxx	xxx	x	xx	xxx	x
		R3	xx	xx	xx	xx	xx	xxx	xx	xxx	x
	100	R1	xx	xx	x	xxx	xxx	xxx	xx	xxx	xx
		R2	xx	xx	x	xx	xx	xxx	xx	xx	xx
		R3	xx	xx	x	xxx	xxx	xxx	xx	xxx	xx

0 = No se desarrolló el micelio del hongo, x (1) = Escaso desarrollo del micelio, xx (2) = Regular desarrollo del micelio, xxx (3) = Buen desarrollo del micelio del hongo.

FTM-200 = *Trametes elegans*; FTM-203 = *Ganoderma applanatum*; FTM-204 = *Rigidoporus lineatus*; FTM-206 = *Coriolopsis polyzona*; FTM-211 = *Earliella scabrosa*; FTM-212 = *Pycnoporus sanguineus*; FTM-216 = *Schizophyllum commune*; FTM-220 = *Pleurotus ostreatus*; FTM-226 = *Polyporus craterellus*.

Remoción del colorante azul turquesa por *Pleurotus ostreatus*

Se determinó las concentraciones de las muestras a cada 5 días durante los 20 días de

operación en los biorreactores (fig. 2). Se aprecian notoriamente, mayor reducción de las concentraciones del colorante en los primeros cinco días de operación en los biorreactores

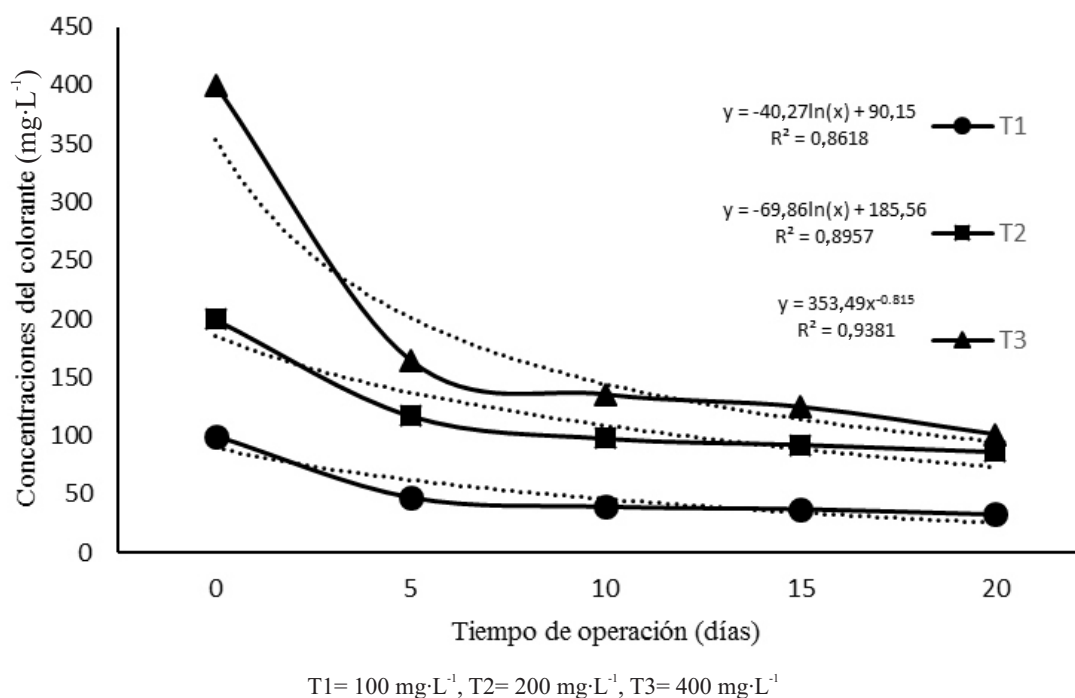


Figura 2. Concentración del colorante azul turquesa durante el proceso de operación en los biorreactores con *Pleurotus ostreatus*.

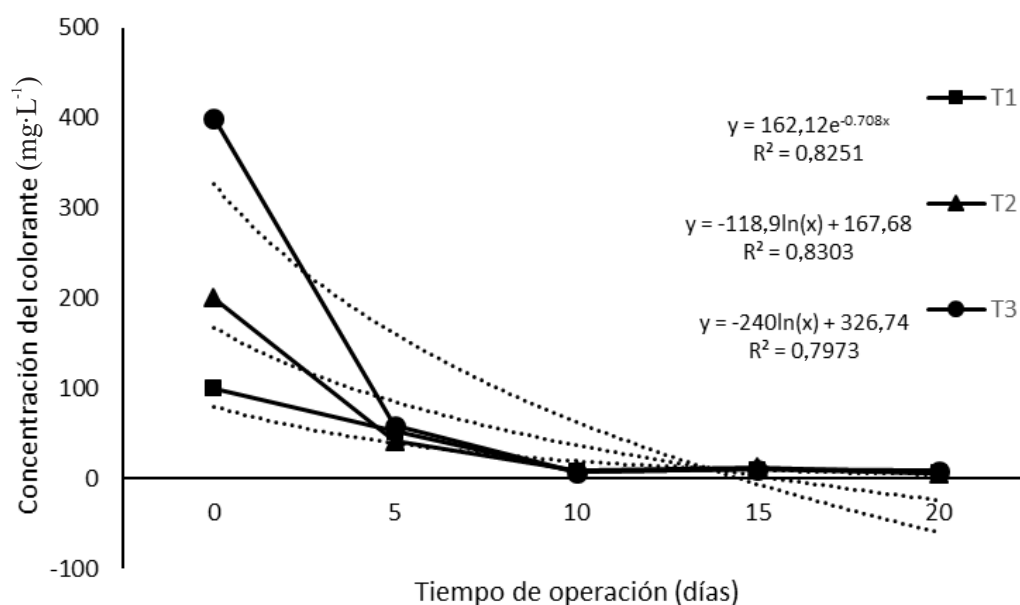


Figura 3. Eficiencia de remoción del colorante azul turquesa durante el periodo de operación en los biorreactores con *Pleurotus ostreatus*.

No se determinó diferencias estadísticas significativas (p valor = 0,05) entre las eficiencias de remoción de colorantes entre las tres

concentraciones, lo que significa que *P. ostreatus* no tiene acción distinta entre los tres tratamientos (Figura 4).

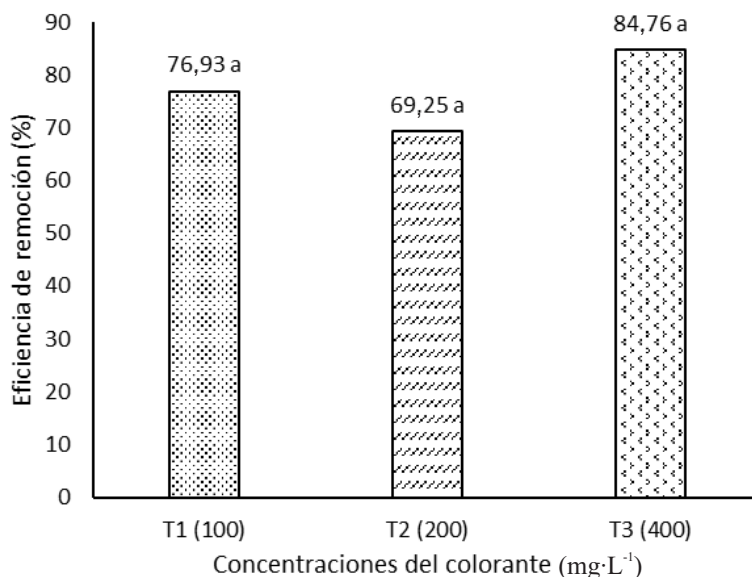


Figura 4. Eficiencia total de biodegradación del colorante azul turquesa en los biorreactores con *Pleurotus ostreatus*.

Parámetros medidos durante el tiempo de operación en los biorreactores

Los parámetros medidos durante el proceso de operación en los biorreactores fueron el oxígeno disuelto (OD), dióxido de carbono (CO₂), temperatura interna y pH. Esto con la finalidad de conocer el comportamiento de estas cuantificaciones durante el periodo de operación de los biorreactores.

Oxígeno disuelto (OD)

El consumo de oxígeno disuelto, se reduce conforme progresa el proceso de operación en los biorreactores. En los 10 primeros días se observa mayor consumo de oxígeno y en los días siguientes una aparente estabilización o un consumo mínimo (Fig. 5).

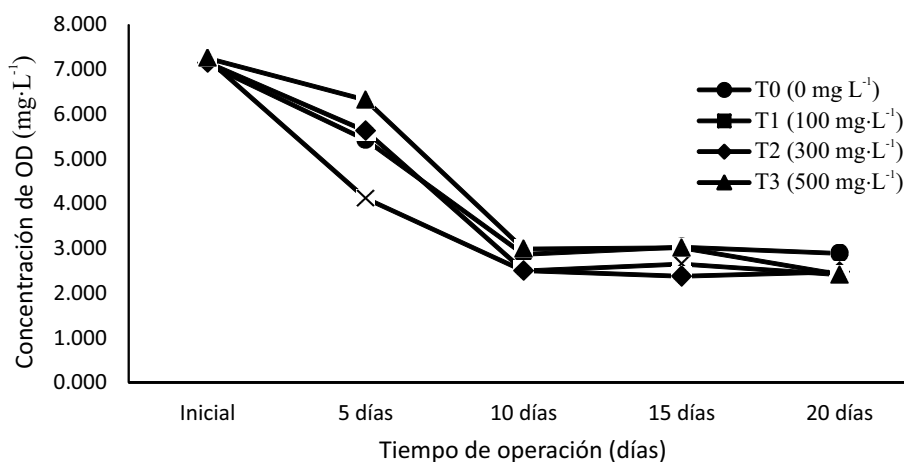


Figura 5. Consumo promedio de oxígeno disuelto (OD) durante la operación en los biorreactores.

Dióxido de carbono

Todos los tratamientos, durante los primeros 5 días de operación muestran una concentración estable

de CO₂, después del día 5 hasta el día 20 presentan un incremento conforme se da el proceso de operación en los biorreactores (Fig. 6).

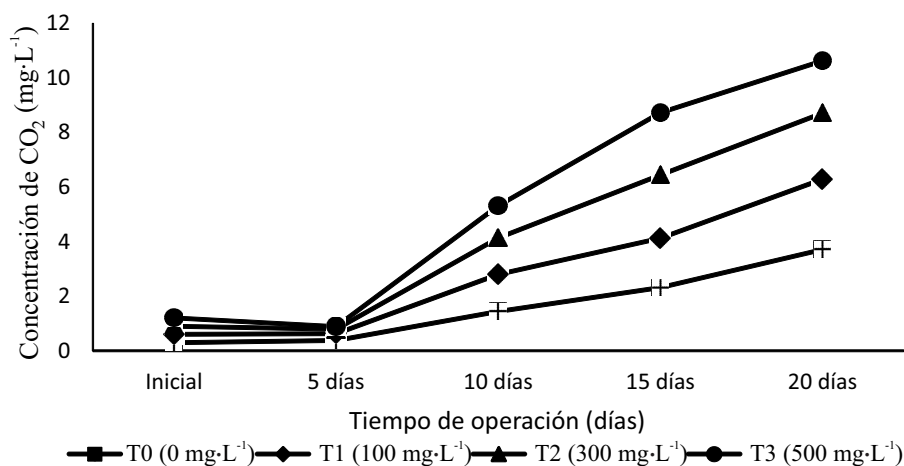


Figura 6. Promedios de concentración de dióxido de carbono durante la operación.

Temperatura

Durante los primeros 5 días de operación en los biorreactores, las temperaturas internas de los tratamientos sufren una caída de 0,5 a 1 °C, después a los 10° días de operación se recupera a la temperatura inicial, especialmente los tratamientos con mayor concentración del colorante (300 y 500

mg·L⁻¹). Posteriormente, a los 15 días se nota una baja en la temperatura (26,5 a 27,5 °C) con una tendencia a estabilizarse a los 20 días. Es decir, se aprecia una cierta fluctuación de la temperatura en el proceso, pero con la tendencia de ir reduciendo (Fig. 7).

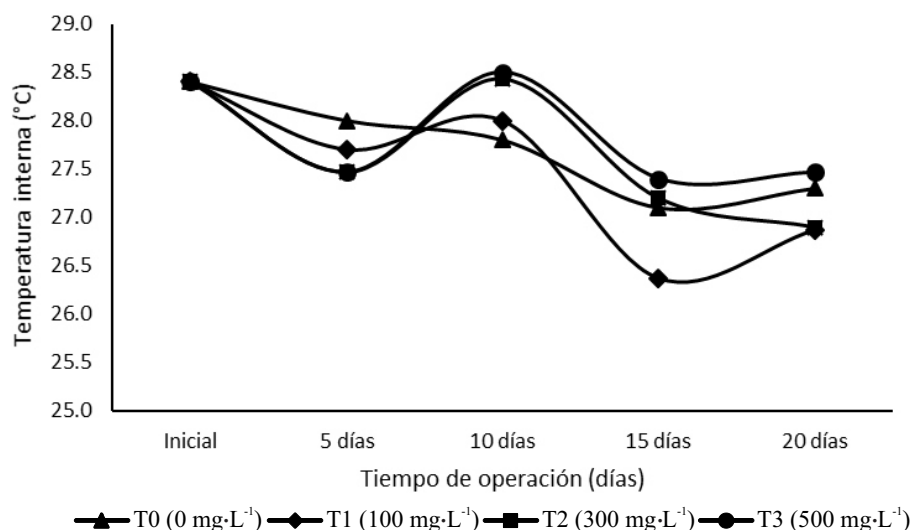


Figura 7. Temperatura interna durante la operación en los biorreactores.

Lectura de pH

Desde el primer día de iniciado el proceso hasta los 20 días de operación en los biorreactores, se

aprecia una tendencia de reducción del pH en todos los tratamientos, a medida que transcurren los días de prueba (Fig. 8).

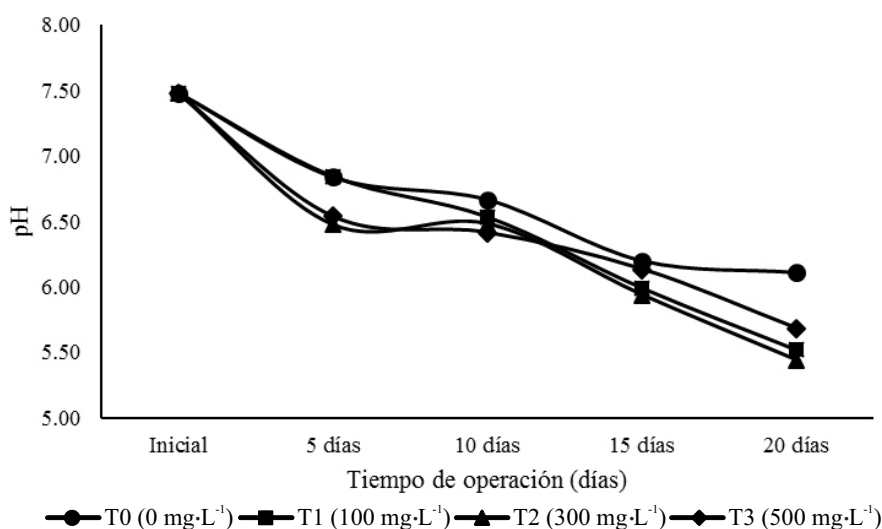


Figura 8. Promedio de lectura de pH durante la operación en los biorreactores.

DISCUSIÓN

Se aislaron nueve hongos de pudrición blanca, es decir hongos que crecen en madera en descomposición, clasificadas en cinco familias, dos del orden agaricales, siete del orden Aphyllophorales (Polyporales), pertenecientes al Phylum Basidiomycota. Esto concuerda con los reportados por Pavlich (1976) en estudio realizado en la selva de Perú, donde 94 de 103 hongos fueron Basidiomycetes; asimismo, Gazis (2004) reporta a 60 especies de Basidiomycetes en Madre de Dios, Perú. En las zonas tropicales, los hongos lignícolas son más abundantes, debido a las altas temperaturas, humedad y en efecto por la capa delgada de suelo, lo que favorece la rápida descomposición de la materia orgánica como la madera y hojarasca (Guzmán, 2003). El aislamiento de micelio, ha respondido muy bien en medio agar papa dextrosa (PDA), este medio de cultivo es recomendado para el aislamiento de la mayoría de hongos, sin embargo, cada especie tiene sus propios requerimientos nutricionales (Guzmán & Mata, 1993).

Se obtuvo una eficiencia de remoción del colorante

azul turquesa de 76,93%, 69,25% y 84,76% en concentraciones de 100 mg·L⁻¹, 200 mg·L⁻¹ y 400 mg·L⁻¹ respectivamente en 20 días de operación en biorreactores. Demostrando que la concentración de 400 mg·L⁻¹ sigue siendo eficiencia para ser removido por el hongo *P. ostreatus*. Estos valores concuerdan con Ponce & Bobadilla (2015) que indican que *Anthracophyllum discolor* (Mont.) Singer removió el colorante Turquesa Erionyl alcanzando un porcentaje del 91,84%, en biorreactor con medio de Kirk Modificado, y demuestran el gran potencial para biodegradar un amplio espectro de xenobioticos como los insecticidas químicos (Quintero, 2011), y de manera general, diferentes especies de hongos son capaces de degradar compuestos contaminantes que poseen estructuras similares a la lignina (Camacho-Morales *et al.*, 2017).

En el presente estudio, *P. ostreatus* resultó ser eficiente en la remoción del colorante azul turquesa en los primeros 7 días en las tres concentraciones (100, 200 y 400 mg·L⁻¹). Al respecto, los hongos de poredumbre blanca *P. ostreatus* y *T. versicolor* fueron estudiados en la remoción de colorantes textiles, principalmente de colorantes tipo azo, logrando porcentajes de degradación de 90%,

incluso 100% para algunos colorantes en tiempos que varían entre 7 a 20 días (Cardona *et al.*, 2009). Asimismo, con el hongo *Phanerochaete chrysosporium* logran biodegradar los colorantes nigrosina, fucsina básica, verde malaquita y mezcla en 90,15%, 89,8%, 83,25% y 78,4% respectivamente (Rani *et al.*, 2014). Esta variabilidad en tiempos y porcentajes se presentará siempre, ya que cada microorganismo actúa de forma diferente de acuerdo a las condiciones del medio, al colorante usado, o a la concentración (Garzón, 2009).

En relación a las condiciones de oxígeno disuelto, CO₂, pH y temperatura, presentaron variaciones en el proceso de operación en los biorreactores. Concordante a esto, Galindo *et al.* (2007) mencionan que, todo organismo vivo colocado fuera de su hábitat natural experimenta condiciones ambientales que limitan su crecimiento. Donde las condiciones de cultivo no son necesariamente homogéneas (dentro del biorreactor) ni constantes (a través del tiempo), por lo que se ocasionan cambios en el entorno en relación a la temperatura, daños mecánicos debidos al flujo de aire, pH, concentración de oxígeno y nutrientes, etc. En efecto todas estas condiciones incluyendo la inadecuada manipulación generan cambios dentro del biorreactor “estresan” a los organismos que necesitan adaptarse a dichos cambios para poder crecer.

El pH en los biorreactores generó un ligero mantenimiento de 7,23 a 6,12 al final del tratamiento, resultado que no concuerda con Osorio *et al.* (2011), quien muestra un incremento de pH y menciona que este comportamiento se debe a la liberación de amonio durante la fase de metabolismo endógeno en que entra el hongo cuando hay condiciones ambientales de limitación de nutrientes. Esto perceptiblemente, depende del tipo de sustrato con el cual se trabaja.

Las condiciones de operación para la remoción del colorante azul turquesa se realizaron a 28,4 °C de temperatura interna, pH entre 7,00 a 8,00, hasta 20 días de tiempo de operación, 0,72 vvm de flujo de entrada de aire, 800 mL de volumen del biorreactor en un área de cultivo de 0,078 m² teniendo como co-metabolito e inductor a glucosa y extracto de levadura. La temperatura interna en los biorreactores registra un valor mínimo de 26,0 °C y

máximo 28,4 °C. Estudios realizados con *P. ostreatus* con colorantes índigo y verde presente en un efluente, reportando temperaturas óptimas de biodegradación de 28 °C y 32 °C, se debe probablemente a que, dependiendo del sustrato presente, se activan diferentes sistemas enzimáticos responsables de la decoloración (Chávez *et al.*, 2003); en este caso, probablemente difiere porque trabajaron con medios en cajas Petri y no en biorreactores.

Responsabilidades éticas

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo los datos obtenidos son auténticos y originales.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

AGRADECIMIENTO

A Leif Ryvarden, micólogo, profesor en la Universidad de Oslo, Noruega, por su importante contribución en la identificación de los especímenes Polyporaceos a nivel genérico y específico. A Fritz Palomino, por el apoyo desinteresado en el proceso de elaboración de este documento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alatorre, F. & Moeller, G. 2006. *Influencia de las características hidráulicas y geométricas de biofiltros empacados sobre la eliminación de un colorante Azo*. XV Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales.
- Albert, L.A. 1998. *Introducción a la toxicología ambiental; Contaminantes ambientales y criterios de evaluación*. Concepción, Chile: Metepec. pp.101-120.
- Alexopoulos, C.; Mims, C. W. & Blackwell, M. 1996. *Introductory Mycology*. 4th ed. New York: John Wiley & Sons.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemist International). 2000. *Official*

- Methods of Analysis*. 17th ed. Gaithersburg, MD.
- APHA/AWWA/7 WAB. 1999. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. American Public Health Association, N.W., Washington. USA.
- Aquiahuat, M.A.; Volke, T.; Prado, L.A.; Shirai, K.; Ramírez, F. & Salazar, M. 2012. *Manual de prácticas de laboratorio. Microbiología general*. Iztapalapa, México: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Baldrian, P. 2002. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 32: 78-91.
- Botelho, S.F. & Ramos, V.L. 1985. *Cogumelos comestíveis*. São Paulo, Brasil: Icome. 83 p.
- Boyer, H. 2007. *Environmental legislations USA. Environmental aspects of textile dyeing*. Cambridge.
- Carbajal, M.L. 2014. *Degradación de compuestos fenólicos por el hongo causante de pudrición blanca Trametes versicolor* (tesis doctoral). Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. 106 p.
- Camacho-Morales; R.L., Gerardo-Gerardo, J.L.; Guillén, K. & Sánchez, J.E. 2017. Producción de enzimas ligninolíticas durante la degradación del herbicida paraquat por hongos de la pudrición blanca. *Revista Argentina de Microbiología*, 49: 189-196.
- Cardona, M.; Osorio, J. & Quintero, J., 2009. Degradación de colorantes industriales con hongos ligninolíticos. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquía*, 48: 27-37.
- Chávez, N.A.; Jáuregui, J. & Saucedo, B. 2003. Biodegradación de los colorantes indigo y verde presentes en un efluente de la industria textil, utilizando hongo ligninolítico. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 30: 11-16.
- Door, C. & Abad, J. 1990. Identificación de hongos comestibles silvestres en el bosque Dantas, Huánuco. *Revista forestal del Perú*, 17: 21-37.
- Eaton, R. & Hale, M. 1993. *Wood, decay, pests and prevention*. Chapman and Hall, London.
- Espinoza, M.; Mata, M.; Pavlich, M. & Mori, D. 2006. *Hongos de Allpahuayo-Mishana. Reserva Biológica Allpahuayo-Mishana, Iquitos, Perú*. (On Line). Field Museum, Chicago, USA.
- Evans, C. & Hedger, J.N. 2001. *Degradation of cell wall polymers*. In: *Fungi in bioremediation*. G. M. Gadd (ed.). Cambridge, Cambridge University Press.
- Galindo, E.; Peña, C. & Serrano, L., 2007. *Domesticar microorganismos en un biorreactor: los retos del bioingeniero*. México: UNAM. pp. 131-143.
- Garzón, R.C. 2009. *Cinética de degradación de colorantes textiles de diferentes clases químicas por hongos y bacterias inmovilizados sobre fibra de Agave tequilana Webber var. Azul* (Tesis pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Grazis, R. 2004. *Evaluación preliminar de la micoflora localizada en los alrededores del centro de investigación "Río los Amigos", Manu-Madre de Dios* (Tesis pregrado). Universidad Ricardo Palma, Lima, Perú.
- Guzman, G. 2003. *Los hongos de El Edén, Quintana Roo. Introducción a la microbiota tropical de México*. Instituto de Ecología, A.C. y la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 102 p.
- Guzmán, G. & Mata, G. 1993. *El cultivo de los hongos comestibles, con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agroindustriales* (Tesis de grado). Instituto Politécnico Nacional, México.
- Hach (Hach Company en Ames). 2002. *Manual de acuicultura de agua dulce, procedimientos para el Kit de prueba modelo FF-2*. Hach, Iowa.
- Hawksworth, D. L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. *Mycological Research*, 95: 641-655.
- Holdridge, R. 1987. *Ecología basada en zonas de vida*. 3^{ra} ed. 216 p. San José, Costa Rica: Servicio editorial IICA.
- Jadhav, J.P. & Govindwar, S.P. 2006. Biotransformation of malachite green by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463. *Yeast*, 23: 315-323.
- Kaushik, P. & Malik, A. 2009. Fungal dye decolorization: Recent advances and future potential. *Environment International*,

- 35:127–141.
- Kuhad, R.C.; Singh, A. & Eriksson, K. 1997. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 57: 46-125.
- Kuppusamy, I. 1995. *Impacto Ambiental de la Industria Textil en México: Avances en la biodegradación anaerobia y precipitación de colorantes tipo azo*. Segundo Minisimposium Internacional sobre Remoción de contaminantes de Aguas y Suelos. Ciudad de México.
- López, C.S.; Vivar, L.; Mazabel, C.; Garcia, R. & Sias, R. 2006. *Biorremediación de contaminantes por fermentación sumergida utilizando biopelículas de microorganismos nativos de suelos tropicales de la zona de Tingo María*. Facultad de Recursos Naturales Renovables, Tingo María, Perú: Universidad Agraria de la Selva.
- Mileski, J.G.; Bumpus, J.A.; Jurek, M.A. & Aust, S.D. 1988. Biodegradation of pentachlorophenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 2885-2889.
- Mori, T.; Bendayán, M.E.; Tresierra, Á.; -Ayala, García, M.; Ruiz, E.; Bardales, J.; Reátegui, R.; Espinoza, F. & Dávila, C. 2011. Ascomycetes y Basidiomycetes macroscópicos en bosques de Puerto Almendras (Loreto, Perú). *Folia Amazónica*, 20: 7-14.
- Osorio, J.; Vidal, A.I. & Quintero, J.C. 2011. Decoloración de aguas residuales textiles utilizando el hongo ligninolítico anamorfo R1 de *Bjerkandera* sp. *Revista Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia*, 57: 85-93.
- Pavlich, H.M. 1976. *Ascomycetes y Basidiomycetes del Perú. I, con énfasis en especies de la ceja de montaña y selva tropical*. Memorias del Museo de Historia Natural "Javier Prado" N° 17. Lima, Perú: UNMSM.
- Pointing, S.B.; Parungao, M.M. & Hyde, K.D. 2003. Production of wood-decay enzymes, mass loss and lignin solubilization in wood by tropical Xylariaceae. *Mycological Research*, 107: 231-235.
- Ponce, L.M. & Bobadilla, N.E. 2015. *Degradación del colorante industrial turquesa Erionyl con el hongo Anthracophyllum discolor empleando un reactor de tanque agitado* (tesis pregrado). Universidad de Antioquia, Colombia.
- Prado, A.; Rodríguez, G.; Figueroa, I. & Shirari, K. 2013. *Manual de prácticas de laboratorio de microbiología de los alimentos*. Iztapalapa, México: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Quintero, J.C. 2011. Pesticides degradation by white rot fungi: A review. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 64: 5867-5882.
- Rani, B.; Kumar, V.; Singh, J.; Bisht, S.; Teotia, P.; Sharma, S. & Kela, R. 2014. Bioremediation of dyes by fungi isolated from contaminated dye effluent sites for bio-usability. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45: 1055-1063.
- Ríos, R.A. & Ruiz, L. 1993. Aislamiento y cultivo del hongo comestible *Pleurotus afin ostreatus* (Jacq. ex Fr) Kumm en Tingo María. *Folia amazónica*, 5: 5-14.
- Robledo, G. 2006. *Taxonomía, ecología y diversidad de Poliporos*. Cusco, Perú: Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal.
- Rodríguez, E.; Pickard, M.A. & Vazquez-Duhalt, R. 1999. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Current microbiology*, 38: 27-32.
- Ryvarden, L. 2007. *Fundamentos taxonómicos en identificación de Poliporaceos y Ascomycetos Tropicales y Neotropicales*. Oslo, Noruega: Norway.
- Saldarriaga, P. 2001. *Manual de Micología aplicada*. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia.
- Shedbalkar, U.; Dhanve, R. & Jadhav, J. 2008. Biodegradation of triphenylmethane dye cotton blue by *Penicillium ochrochloron* MTCC517. *Journal of Hazardous Materials*, 157: 472-479.
- Tišma, M.; Zelic, B.; Vasic-Racki, D. 2010. White-rot fungi in phenols, dyes and other xenobiotics treatment – a brief review. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 2: 34-47.
- Valentín, L.; Feijoo, G.; Moreira, M.T. & Lema, J.M. 2006. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in forest and salt

marsh soils by white-rot fungi. International Biodeterioration & Biodegradation, 58: 15 - 21.

Received December 15, 2017.
Accepted February 18, 2018.