

**DEGRADACIÓN DE LIGNINA EN LODOS PROVENIENTES DE LA INDUSTRIA
PAPELERA MEDIANTE DEL EMPLEO DEL *Ganoderma Lucidum*.**

PRESENTADO POR:

**MÓNICA LEANDRA MONTOYA FRANCO
GUSTAVO ANDRÉS MUÑOZ HERRERA**



**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍA
ESCUELA DE QUÍMICA
PROGRAMA DE QUÍMICA INDUSTRIAL**

**DEGRADACIÓN DE LIGNINA EN LODOS PROVENIENTES DE LA INDUSTRIA
PAPELERA MEDIANTE DEL EMPLEO DEL *Ganoderma Lucidum*.**

PROYECTO DE GRADO

PRESENTADO POR:

**MÓNICA LEANDRA MONTOYA FRANCO
GUSTAVO ANDRÉS MUÑOZ HERRERA**

DIRECTORA:

LILIANA BUENO



**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍA
ESCUELA DE QUÍMICA**

PROGRAMA DE QUÍMICA INDUSTRIAL

**Pereira, Colombia
2014**

INDICE GENERAL

| | |
|---|----|
| INDICE DE TABLAS | 3 |
| INDICE DE FIGURAS | 4 |
| RESUMEN | 5 |
| ABSTRACT | 6 |
| 1 INTRODUCCIÓN | 7 |
| 2 MARCO TEÓRICO | 8 |
| 2.1 La Industria del papel | 8 |
| 2.2 La lignina | 11 |
| 2.3 Degradación de la lignina | 14 |
| 2.3.1 Microorganismos Lignolíticos | 14 |
| 2.3.1.1 <i>Ganoderma lucidum</i> | 16 |
| 2.3.2 Enzimas Implicadas en la degradación de la lignina | 11 |
| 2.3.3 Factores ambientales que determinan la degradación fúngica de la lignina | 19 |
| 2.3.4 Alternativas para la gestión de los lodos residuos generados en la fabricación de papel | 22 |
| 2.3.4.1 En la industria cerámica | 23 |
| 2.3.4.2 Industria cementera | 24 |
| 2.3.4.3 Reciclaje mediante vermicultura | 24 |
| 3. FORMULACIÓN DE PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN | 25 |
| 4. OBJETIVOS | 26 |
| 4.1 Objetivo General | 26 |
| 4.2 Objetivos Específicos | 26 |
| 5. METODOLOGÍA | 27 |
| 5.1 Toma y transporte de la muestra total del lodo | 27 |
| 5.2 Caracterización del lodo | 28 |
| 5.2.1 pH del lodo | 28 |

| | |
|---|----|
| 5.2.2 Materia Orgánica | 28 |
| 5.2.2.1 Preparación de las soluciones | 29 |
| 5.2.2.2 Lectura Fotómetro | 29 |
| 5.2.3 Porcentaje de humedad por gravimetría | 30 |
| 5.3 Medios de cultivo para el <i>Ganoderma lucidum</i> | 30 |
| 5.3.1 Medio Agga papa-dextrosa | 30 |
| 5.4 Preparación del inóculo del hongo <i>Ganoderma lucidum</i> | 31 |
| 5.5 Cuantificación del <i>Ganoderma lucidum</i> por UFC | 31 |
| 5.6 Inoculación en el lodo | 33 |
| 5.7 Cuantificación de lignina | 34 |
| 5.7.1 Digestión ácida | 34 |
| 5.8 Análisis estadístico | 34 |
| 6.RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 35 |
| 6.1 Caracterización del lodo | 35 |
| 6.2 Cuantificación del <i>Ganoderma lucidum</i> por UFC | 36 |
| 6.3 Inoculación y etapa de crecimiento micelial | 37 |
| 6.4 Cuantificación de Lignina | 40 |
| 7.CONCLUSIONES | 46 |
| 8. RECOMENDACIONES | 47 |
| 9.REFERENCIAS | 48 |
| 10.ANEXOS | 58 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1: Porcentaje final de Materia Orgánica en lodos | 35 |
| Tabla 2: Recuento de UFC (Unidades Formadoras de Colonias) | 37 |
| Tabla 3: Resultados del análisis de varianza..... | 41 |
| Tabla 4: Análisis no paramétrico para la variable tiempo | 41 |
| Tabla 5: Análisis no paramétrico para la variable concentración | 43 |
| Tabla 6: Porcentaje total de degradación de lignina respecto a cada inóculo. | 45 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Estructura química de la lignina..... | 13 |
| Figura2: Cajas de Petri mostrando ensayo de oxidasas | 19 |
| Figura 3: Secciones transversales de madera de un área blanca de un trozo de madera podrida. | 19 |
| Figura 4: Lodo recolectado listo para pruebas en el laboratorio | 27 |
| Figura 5: Imagen de la toma de pH | 28 |
| Figura 6: Recuento UFC/10-5 de 10 fríjoles, siembra por vertido en placa en PDA | 32 |
| Figura 7: Recuento UFC/10-5 de 20 fríjoles, siembra por vertido en placa en PDA | 32 |
| Figura 8: Recuento UFC/10-5 de 30 fríjoles, siembra por vertido en placa en PDA | 33 |
| Figura 9: Lodo inoculado con 10 fríjoles con <i>G.lucidum</i> | 38 |
| Figura 10: Lodo inoculado con 20 fríjoles con <i>G.lucidum</i> | 39 |
| Figura 11: Lodo inoculado con 20 fríjoles con <i>G.lucidum</i> | 39 |
| Figura 12: Porcentaje promedio de lignina en el lodo con respecto a lo largo de las ocho semanas..... | 40 |
| Figura 13: Promedio de los porcentajes de lignina durante las 8 semanas según la cantidad de <i>G.lucidum</i> , 0, 10 ,20, 30 fríjoles en el lodo..... | 42 |
| Figura 14: Porcentaje de lignina degradada por <i>G.lucidum</i> en los lodos que contienen diferentes cantidades de inóculo..... | 43 |

RESUMEN

La lignina es una macromolécula conformada de monómeros aromáticos, que se encuentra en la madera y se forma durante la transformación biológica de la pared de celulosa original de la célula viva en el tejido de sostén de los tallos de los árboles y arbustos. En el proceso de la fabricación de papel es indispensable su eliminación, donde la mayoría de este polímero queda en los lodos de desecho de esta industria. Diariamente se producen toneladas de este desecho, que van a parar a rellenos sanitarios, donde no tiene las condiciones para su degradación.

El propósito de este trabajo es determinar una manera efectiva de degradar la lignina por medio del *Ganoderma lucidum*, este es un hongo de la pudrición blanca de la madera, esta clase de hongos son conocidos entre otras cosas, por ser los degradadores de lignina por excelencia de la naturaleza. Otras de sus características es que es de fácil crecimiento y gran adaptabilidad al ambiente.

Posterior a una caracterización de los lodos, tres diferentes concentraciones de *Ganoderma lucidum* fueron inoculadas en iguales condiciones de humedad, temperatura y pH, en lodos de desecho papelerero para llevar a cabo la degradación de la lignina. La concentración está dada por el número de frijoles inoculados previamente por con micelio. Se inóculo 10, 20 ,30 frijoles a muestras de 1 kg de lodos de desecho provenientes de la empresa papelera Colombia Kimberly S.A., a temperatura ambiente y condiciones de pH neutro.

Durante ochos semanas se estuvieron midiendo los porcentajes de lignina presente en las muestras, y se encontró que a pesar de la eficacia de las tres concentraciones para degradar lignina conforme pasaba el tiempo, las muestra de lodo que contenían 30 frijoles inoculados con *G.lucidum* tuvieron mayor porcentaje de lignina degradada al final del estudio.

ABSTRACT

Lignin is a macromolecule composed of aromatic monomers, which is in the wood and is formed during the biological processing of the original cellulose wall of the living cell to the supporting tissue of the stems of trees and shrubs. In the process of papermaking it is essential that lignin is removed from the wood. Most of this remaining polymer is contained in the waste sludge. Every day, tons of waste is going to landfills where the conditions are not suitable for degradation.

The purpose for this project was to determine an effective way to degrade the Lignin by the *Ganoderma Lucidum*, this is a white rot fungus found in wood. This fungus is one of the best lignin degraders in nature. *Ganoderma Lucidum* has the ability to grow and is able to adapt well to the environment.

Following characterization of the sludge, three different concentrations of *Ganoderma Lucidum* were inoculated in the same conditions of humidity, temperature and pH, in the papermaking waste sludge to carry out the degradation of lignin. The concentration determined by the number of kidney beans previously inoculated with mycelium. It was inoculated with 10, 20, 30 kidney beans inside samples of 1 kg of waste sludge from the paper company Kimberly Colombia SA, at room temperature and neutral pH conditions.

The percentage of lignin present in the samples was measured during an eight-week time period. In spite of the efficacy of three concentrations to degrade lignin, as time passed, it was found that the sludge sample that contained 30 beans with *Ganoderma Lucidum* had the highest percentage of degraded lignin at the end of this work.

1. INTRODUCCIÓN

La producción industrial de papel en Colombia está concentrada en pocas empresas, con elevadas economías a escala e intensivas en capital. Dentro de las empresas que sobresalen por su nivel de activos están: Cartón Colombia, Colombiana Kimberly, Propal, Productos Familia, Cartones América y Papeles Nacionales, entre otras. Colombia es el quinto productor de papel en Latinoamérica, con una participación del 5% en el total y 0,24% en el total mundial (Pulp & Paper International (PPI), 2001).

De la cadena productiva del papel se generan gran cantidad de residuos orgánicos e inorgánicos de difícil degradación en el medio ambiente. Dentro de los programas de gestión ambiental de este sector los residuos sólidos generados son fuente importante de materia prima para otras industrias, en el caso específico de los lodos papeleros de desecho, se depositan en rellenos especializados.

El problema de estos lodos es su alto contenido de lignina, lo que los hace de difícil y lenta degradación, una alternativa biotecnológica es hacerles un manejo con un microorganismo lignolítico, capaz de degradar gran parte del contenido de lignina en estos lodos, como consecuencia no arrojar al ambiente unos lodos tan recalcitrantes para que se dé una mejor biodegradación.

Los microorganismos encargados de la degradación de la lignina en la madera son los hongos de la pudrición blanca (White-Rot Fungi), grupo al que pertenece el *Ganoderma lucidum*, que ha sido ampliamente estudiado por sus propiedades medicinales, en este trabajo se verifica la capacidad de este micelio para degradar la lignina de los lodos residuales de una fábrica de papel para uso personal

2. MARCO TEÓRICO

2.1 La industria del papel

El papel es un material que ha jugado un rol vital en el desarrollo del mundo moderno desde su aparición en la antigua China hasta los días actuales pero que poco ha variado en el fundamento en su proceso de producción a lo largo del tiempo. La cadena productiva de pulpa, papel e industria gráfica comprende desde la producción de la pulpa química elaborada a partir de la madera o el bagazo de caña, hasta la producción de papel y la producción de imprentas y editoriales.

A nivel mundial, la capacidad de producción de pulpa, papel y cartón se ha concentrado en economías industrializadas como Estados Unidos, Japón, Brasil, Suecia, y Finlandia con el 70% de la producción mundial (FAO, Capacidades de pasta y papel, 2012). Aunque Colombia no aparece en el panorama mundial como un país productor de papel, este sector de la economía tiene una importante participación en la generación de empleo y en la producción industrial: 7% y 7,2%, respectivamente. Según datos de la ANDI, genera más 6.000 empleos y, según cifras de 2011 el valor de sus activos supera los 7,3 billones de pesos, alcanzando ingresos operacionales por 3,4 billones de pesos.

Es inevitable el aumento en la demanda de papel, ya que es un indicador de desarrollo, el inconveniente con la producción y consumo de papel se encuentra entre los mayores generadores de contaminantes del aire y del agua, así como generadores de gases causantes del cambio climático (WorldWatch Institute, 2004).

La industria del papel y la celulosa ocupa el tercer lugar a nivel mundial en el uso intensivo de agua, siendo los Estados Unidos de América el productor de más de la mitad de la pulpa y Europa Occidental el segundo con $8 \cdot 10^{10}$ toneladas de papel por año (Thompson G. et al., 2001). Como es de esperarse en nuestro país se encuentra entre los principales generadores de residuos industriales.

La cadena de producción del papel parte de la explotación de la madera, que sirve como materia prima para la pulpa química, o del bagazo de la caña de azúcar. La madera fragmentada o el bagazo son mezclados con químicos, tales como hidróxido de sodio o sulfato de sodio, posteriormente pasa a cocción bajo presión, aquí es donde se separa las fibras de celulosa de la lignina (sustancia que sirve como aglomerador natural de las fibras) que las une, este proceso se conoce como sulfato Kraft implementado desde 1879.

Pero tradicionalmente, en la industria de la pulpa y del papel por ser el principal destino de estos materiales lignocelulósicos, la lignina ha sido eliminada de las fibras vegetales mediante técnicas fisicoquímicas como: triturado o molienda mecánica, 1848; proceso sulfito, 1857 hasta llegar al proceso actual, de tal modo que la lignina presente en la pulpa se somete a una extracción o degradación posterior con agente blanqueantes, produciendo lo que se denomina como pasta o pulpa de papel.

Cuando hay disponibilidad de pulpa para ser vendida o almacenada por largo tiempo, la pulpa debe ser secada, cortada en hojas y empacada, dando como resultado "pulpa de mercado", diferenciándose dos tipos: la pulpa cruda de pino (denominada fibra larga) y la blanqueada de eucalipto (fibra corta) (ASPAPPEL, 2008). La de eucalipto, es la mejor pulpa de fibra corta producida a nivel mundial.

En Colombia, la producción de pulpa de mercado es menor al 3% de la producción total de la cadena, la mayor parte se importa principalmente de Canadá. Gran parte de las calidades de papel requieren de la operación de blanqueado, que emplea usualmente sustancias como peróxido de hidrógeno o dióxido de cloro, aunque en Colombia no se utiliza cloro en el blanqueado.

La cadena de producción es sucedida de varios procedimientos químicos, mecánicos y semiquímicos que dan origen a múltiples tipos de celulosa. De todo este proceso quedan residuos de diversas tipologías, en función de la materia prima utilizada, los procesos específicos de cada fábrica y el producto final de comercialización (Akmehmet B. I. y Arslan I., 1998), como lo son principalmente

residuos de corteza y madera, una enorme cantidad de aguas residuales, donde el contenido de color es elevado, el cual se debe principalmente al alto contenido de óxidos y de lignina parcialmente degradada procedente de la recuperación de lejías de cocción (Kringstad K.P. et al., 1984, Sahoo D.K. y Gupta R., 2005), lodos de destintado procedentes del reciclado de papel, desechos separados mecánicamente de pasta elaborada de residuos de papel y cartón, residuos de lodos calizos, residuos procedentes de la clasificación de papel y cartón destinados al reciclado, entre otros.

Muchas sustancias orgánicas de origen natural que podrían catalogarse como residuos, se valorizan en la propia fábrica como biomasa para la producción de energía, esto incluye normalmente residuos de corteza y madera, y pueden incluir lodos del tratamiento de aguas.

Pero el lodo residual es un problema real para desechar, proviene de fibras de materiales de carga y estucado obtenidos por separación mecánica que se genera en los procesos de depuración y fabricación bien sea empleando fibra virgen o reciclada; alrededor del 50% de los residuos totales de la planta son de este tipo, dependiendo del tipo de papel que se procese.

A pesar que en su gran mayoría es material orgánico que podría ser degradado naturalmente, pero al producirse a escala industrial, la naturaleza tarda mucho tiempo en degradarla por si sola. Considerándose entonces la idea de hacer una mejor disposición final de estos lodos antes de liberarlos al medio ambiente y disminuir de esta forma la contaminación en un mundo que día tras día busca alternativas más limpias.

2.2 La lignina

La lignina, cuyo nombre proviene del latín *lignus*: “leño”, es exclusiva de los tejidos leñosos y se forma durante la transformación biológica de la pared de celulosa original de la célula viva en el tejido de sostén de los tallos de los árboles y arbustos (Núñez, 2008).

Químicamente es un complejo racémico heteropolímero fenólico, en la medida que la lignina es un alto polímero sintetizado “dentro” de los tejidos celulares, todo aislamiento o deslignificación implica transformaciones del mismo con modificaciones o degradaciones.

La lignina, presente en todas las plantas vasculares, representa un promedio del 25% de la biomasa de las plantas terrestres, está íntimamente asociada con los polisacáridos de la pared celular, tales como la celulosa y la hemicelulosa; para los organismos herbívoros, e.g. los rumiantes, limita la digestibilidad y por lo tanto los rendimientos energéticos. Esto es porque la enorme lignificación limita la accesibilidad de las enzimas digestivas hidrolíticas a los polisacáridos de la pared celular (Rastogi y Dwivedi, 2008).

La lignificación de la pared celular vegetal es regulado por el desarrollo de la planta; sin embargo, su deposición es también inducida por varios estreses abiótico y bióticos, tales como estrés metabólico, cicatrización, infecciones patógenas también como cambios en la estructura de la pared celular (Caño-Delgado et al., 2003; Tronchet et al., 2010).

De la composición típica de la madera, la lignina representa el 30%, aclarando que individualmente puede haber significativas variaciones en este valor. En general las coníferas suelen tener menos hemicelulosa y más lignina que las latifoliadas (Núñez, 2008). Es el residuo de las plantas degradado más lentamente por su compleja estructura y además porque no posee una uniformidad química (Leonor Carrillo, 2003).

La molécula de lignina presenta un elevado peso molecular, que resulta de la unión de varios ácidos y alcoholes fenilpropílicos (cumarílico, coniferílico y sinapílico) (Taiz, Lincoln; Zeiger, Eduardo, 2006). El acoplamiento aleatorio de estos radicales da origen a una estructura tridimensional, polímero amorfo,

característico de la lignina (Figura 1). Desde la perspectiva agroindustrial, la lignina ejerce un impacto negativo en la utilización de biomasa vegetal en la industrial de la pulpa y papel (Rastogi y Dwivedi, 2014).

Es la sustancia que los productores de papel no quieren ver en su madera, la manipulación genética de árboles para producir menos lignina o un tipo de lignina diferentes que podría ser más fácilmente retirada son de tremendo interés económico (Taiz, Lincoln; Zeiger, Eduardo, 2006). A pesar de esto, la deslignificación es la meta más importante en la producción del papel, porque para su fabricación es necesario separar las fibras de celulosa, que están unidas por lignina y producir la pulpa, durante este proceso aproximadamente 80% se disuelve, la estructura residual de la lignina en la pulpa es significativamente diferente de su estructura en la madera, pues se rompen los enlaces arilo éter, se condensan y forman uniones entre polisacáridos.

Sin embargo, la lignina que termina en los lodos papeleros de desecho resultado de la deslignificaciones de difícil manejo. La degradación de esta es un proceso de oxidación complejo, indirecto y al azar (Francisco Castillo Rodríguez, 2005), que naturalmente puede darse por los microorganismos presentes en el suelo, especialmente los de descomposición blanca, pero dado que en los lodos papeleros la concentración de lignina es elevada se requieren ayudas externas para lograr la degradación parcial de este componente, es allí donde los hongos (principal agente degradador de materia orgánica en los ecosistemas) cobran importancia.

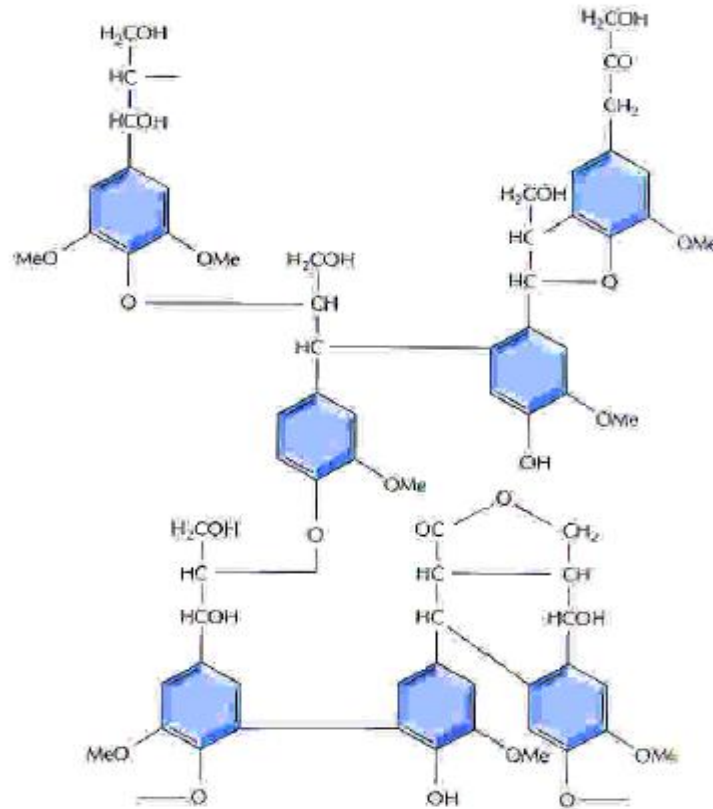


Figura 1. Estructura química parcial de la lignina

La biodegradación de la lignina es fundamental en el reciclaje del carbono en los ecosistemas terrestres y después de la celulosa, es el mayor componente de la materia vegetal y la forma más abundante de material aromático en la biosfera (Yaovapa, 2005), constituyendo probablemente el proceso ecológico más complejo de la biosfera (Sinsabaugh y Moorhead, 1997; Sinsabaugh et al, 2002).

La utilización de hongos que degradan la madera para la solución de problemas ambientales es una alternativa de creciente expansión en biotecnología. Los primeros estudios acerca de la capacidad degradativa de estos hongos fueron realizados por Kirk y Yang en 1979 sobre el basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* (Ernesto Shimizu et al. 2009). Los estudios actuales demuestran que el tratamiento de efluentes con hongos ligninolíticos no sólo producen decoloración (hasta el 80%) sino también destoxificación (WesenbergD., Kyriakides I., Agathos S. N. 2003).

Estos hongos tienen un sistema enzimático especial para atacar la lignina. La reacción inicial comienza con la actividad de enzimas extracelulares tal es el caso de la manganeso peroxidasa. La formación de peroxidasa es promovida por la limitación de nitrógeno y la descomposición de la lignina (Leonor Carrillo, 2003). En la década pasada, muchas aproximaciones han sido desarrolladas para monitorear la diversidad fúngica natural llevando al descubrimiento de nuevas enzimas objetivo (Jean-Claude Sigoillot, 2012), y se han desarrollado muchos modelos que relacionan el proceso de descomposición con variables climáticas, edáficas (del suelo o plantas), de composición del residuo o incluso microbiológicas (Moorhead et al, 1996).

2.3. Degradación de la lignina

2.3.1. Microorganismos lignolíticos

Teniendo en cuenta la compleja estructura de la lignina y si se compara las severas condiciones químicas de estos procesos técnicos de la industria papelera, con las suaves condiciones de reacción de la catálisis enzimática, no debería sorprender el hecho de que la comunidad científica haya tardado tanto tiempo en descubrir una vía de enfoque alternativo. Pero como tantas ocasiones, la naturaleza proporciona la solución, que en este caso con los microorganismos ligninolíticos.

Los estudios en ecología microbiana en las últimas décadas han llevado a la idea del llamado “loop” microbiano (Azam y Cho, 1987) que presupone que una gran cantidad de la producción primaria no es consumida directamente por herbívoros sino que es aprovechada por los microorganismos heterotróficos convirtiéndose en biomasa microbiana (Lowell y Konopka, 1985).

Los microorganismos actúan de vínculo de unión entre los procesos de producción primaria y secundaria, propician la reintroducción de compuestos inorgánicos en el sistema y producen biomasa microbiana susceptible de servir como alimento a organismos detritívoros. Con esta nueva concepción, el proceso

de descomposición deja de tener un carácter terminal para adquirir uno central en el control del sistema regulando la dinámica de nutrientes del sistema, y actuando de vía de redistribución de la energía (Wetzel, 1992).

La capacidad para catabolizar la celulosa y hemicelulosa es una característica común para diversos hongos y otros microorganismos. Por el contrario, al ser la lignina un heteropolímero muy recalcitrante, solamente es mineralizado (transformado hasta dióxido de carbono y agua) en forma limitada por algunas bacterias y extensivamente por un grupo de hongos.

Los hongos lignolíticos son los que pertenecen en mayor cantidad al grupo de los basidiomicetes, más conocidos como los hongos de la pudrición blanca, o white-rotfungus (WRF) (Leonor Carrillo, 2003; Dávila & Vásquez, 2006), con más de 22 000 especies entre las que se encuentran: *Planerochaetespp.*, *Pleurotus spp.*, *Ganoderma spp.*, *Phellinus spp.*, *Eucalyptus spp.*, *Daedalea spp.*, *Puccinia spp.* (SBPointing, 2001; CMMS Silva et al., 1996; Z Zheng et al., 2002).

Las bacterias que están involucradas en la degradación y modificación de la lignina en la naturaleza se les denominan actinomicetos. De los mecanismos de degradación de lignina bacteriana más estudiados tenemos el de la especie *Pseudomonas* y el de los actinomicetos Gram-positivos (*W. Zimmermann*, 1990). Los actinomicetos también pueden descomponer lignina, pero típicamente degradan menos del 20% del total. En sistemas aerobios, la descomposición de la lignina se realiza sin problemas, pero en sistemas con poca o nula aireación, puede persistir durante cientos de años.

La aplicación de WRF y otros organismos en procesos biotecnológico requiere previamente demostrar su potencial poder degradante y su adaptación para el crecimiento en presencia de agentes tóxicos (Aggelis G. et al., 2002) (Iara M. A. et al., 2003). De ahí que, desde hace mucho tiempo, las perspectivas biotecnológicas de estos microorganismos y sus enzimas hayan sido consideradas muy prometedoras, tanto en el desarrollo alternativo de

deslignificación de la madera, pulpeo o blanqueo, como para el tratamiento de efluentes o la biorrecuperación de suelos u aguas subterráneas contaminadas.

2.3.1.1 *Ganoderma lucidum*

Ganoderma lucidum es un hongo medicinal, de la familia de los Polyporaceae, llamado "Lingzhi" en China y "Reishi" en japonés, es uno de los más famosos de la medicina tradicional china. En las regiones de China y otros países asiáticos, Lingzhi se ha utilizado como un remedio para promover la salud y la longevidad (Shiao, 2003). El aspecto del Lingzhi es como el de la mayoría de hongos de la podredumbre blanca, el cual es blanco y suave, de apariencia similar al algodón, en estado verde, mientras su esporocarpio es coriáceo, y plano, con un sombrero conspicuo rojo barniz, arriñonado en forma de tapa y, según la edad del ejemplar, de color blanco o marrón en la zona de los poros.

Debido a sus beneficios de salud percibidos, Lingzhi ha ganado gran popularidad como un alimento saludable en China, Japón, Corea y Taiwán. Este basidiomiceto se encuentra distribuido por todo el mundo, tanto en zonas tropicales como en templadas, crece como saprófito sobre una gran variedad de árboles (Haug R.T. 1991.).

Se ha trabajado con hongos de la podredumbre blanca (WRF) en biotecnología y más que todo en biorremediación, demostrándose potencial de degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs), atrazinas, colorantes poliméricos de la industria del textil y del blanqueamiento del papel, incluso herbicidas como el propanil que es tan usado en Brasil, algunas de sus enzimas tienen potencial para desintoxicarse de compuestos xenobióticos (SB Pointing, 2001; CMMS Silva et al., 1996; CMMS Silva et al., 2005; Z Zheng et al., 2002).

Como hongo de la podredumbre blanca el *Ganoderma lucidum* podría utilizar diversos sustratos para el crecimiento micelial y la producción de metabolitos. Estudios han confirmado que el este hongo puede degradar el tricloroetileno y

fármacos como el ibuprofeno y carbamazepinas (Marco-Urrea et al., 2009). Estos hongos han incrementado el interés en el área de la patología de plantas desde donde se han reportados ataques de *G.lucidum* a las raíces de muchas especies arbóreas (E. Novaes, 2004).

Otro de los aspectos importantes de *G.lucidum* está relacionado con el gran potencial lignolítico gracias a su alta producción de enzima lacasa (oxidativa) (CMMS Silva et al., 2005; Sitarz et al., 2013). En un estudio de identificación de la lacasa en el *G.lucidum*, se observa que sólo este, dentro de varios WRF estudiados, fue capaz de crecer vigoroso en extracto de malta o en un medio con lignina y metales alcalino (Sitarz et al, 2013).

Aunque no se encuentran muchos reportes del uso específico del *Ganoderma lucidum* en la degradación de lignina, su actividad enzimática si es bien conocida y atractiva para mejorar el rendimiento en producción de ligninasas y posiblemente para usarlas en aplicaciones a nivel industrial.

2.3.2 Enzima implicadas en la degradacion de la lignina

El sistema para degradar la lignina se basa en su amplia especificidad de sustrato, siendo el responsable de la transformación y la mineralización de contaminantes orgánicos estructuralmente similares a la lignina. Debido a los tipos de enlaces y su estructura heterogénea, la lignina no se puede romper por hidrólisis enzimática como la mayoría de polímeros naturales (celulosa, almidón, proteínas...etc.).

Las enzimas responsables de los procesos lignolíticos son tres: la lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP), y lacasa, a las cuales se refieren frecuentemente como enzimas modificadoras de lignina (LMEs). (CMMS Silva et al., 2005). Las dos peroxidases involucradas en la despolimerización de la lignina fueron descritas por primera vez en el hongo ligninolítico *P. chrysosporium*.

De ellas, seis fueron identificadas como isoenzimas de LiP (EC 1.11.1.7), mientras que cuatro correspondieron a isoenzimas de MnP (EC 1.11.1.13). Ambas son capaces de oxidar a la lignina, y derivados de la misma, además de una variedad de compuestos modelo (Dávila y Vásquez, 2006).

Estas enzimas componen un complejo extracelular que producen los microorganismos lignolíticos cuando han sido expuestos a condiciones de limitación de nutrientes en el medio de cultivo (Córdoba, 2009; Selvam et al., 2003), un ejemplo de ello son los hongos de pudrición blanca que producen fenol-oxidasas extracelulares y generalmente dan positivo en los ensayos de oxidasas sobre medios con ácido tánico o gálico y con goma de guayaco.

Los hongos de pudrición castaña, por el contrario, no producen fenol-oxidasas extracelulares y generalmente dan negativo los mismos ensayos (Figura 2) (Gilbertson & Ryvarden, 1986). Estas enzimas extracelulares degradan todos los componentes de la pared celular causando simultáneamente canales de erosión para formar en la pared celular, son muy selectivas en degradar sólo la lignina sin descomponer la celulosa (Figura 3) (Erikson et al, 1990). Las lacasas (benzodiol:oxígeno, óxidoreductasas) son glicoproteínas que requieren de oxígeno (O_2) para oxidar fenoles, polifenoles, aminas aromáticas, sustratos orgánicos por medio de la sustracción de un electrón transformándolo en H_2O_2 y radicales activos (Selvam et al., 2003).

La lignina peroxidasas contienen un grupo hemo-férrico y es oxidada por el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las lignina peroxidasas se diferencian de otras peroxidasas por su alto potencial de óxido-reducción, lo que permite oxidar directamente compuestos aromáticos no fenólicos (Usnayo, 2007).

Tanto las lacasas como las lignina peroxidasas pueden ser fuertemente inducidas por la adición de elementos como cobre, manganeso, magnesio y determinadas por mediadores o sustratos como ABTS (ácido 2,2 azinobis, 3 etil-benzotiazolina-6-sulfónico), siringaldazina, 2,6 dimetoxifenol, O-toluidina e intermediarios de la

degradación de la lignina entre los que se encuentra el alcohol veratrílico (Sandoval & Ospina, 2008).

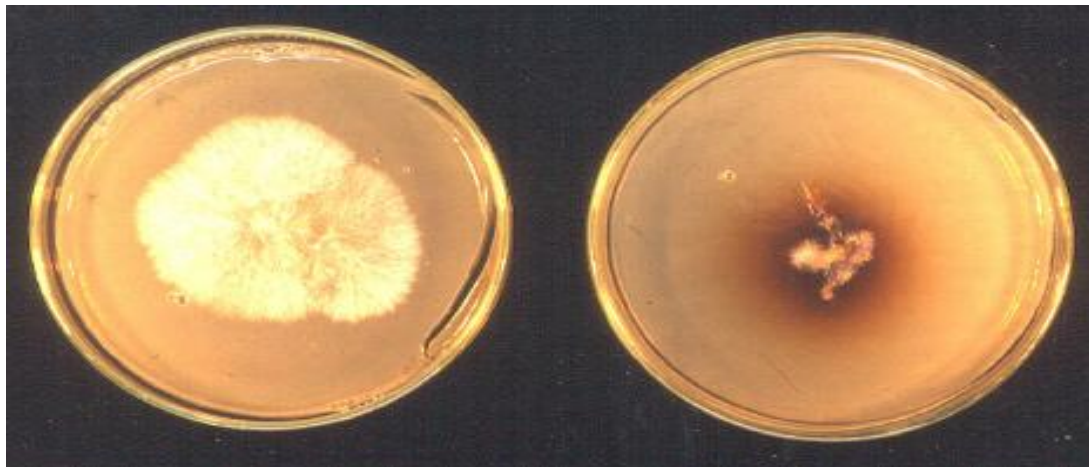


Figura 2. Cajas de Petri mostrando ensayo de oxidasas, derecha: reacción positiva, izquierda: reacción negativa. (Gilbertson&Ryvarden, 1986)

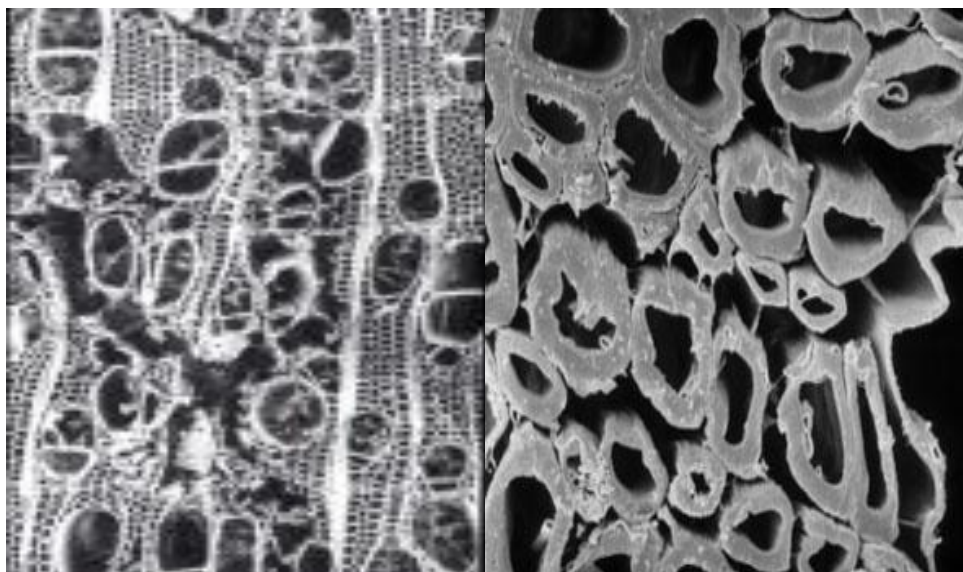


Figura 3.

Secciones transversales de madera de un área blanca de un trozo de madera podrida, la imagen de la izquierda muestra células de madera deslignificadas. La imagen de la derecha muestra células que ya no poseen lamela intermedia (esta es el área entre las células que tienen alta concentración de lignina) sólo paredes secundarias ricas en celulosa que se mantienen después de la descomposición avanzada (Erikson et al, 1990).

Tanto las lacasas como las lignina peroxidadas pueden ser fuertemente inducidas por las adición de elementos como cobre, manganeso, magnesio y determinadas por mediadores o sustratos como ABTS (ácido 2,2 azinobis, 3 etil-benzotiazolina-6-sulfónico), siringaldazina, 2,6 dimetoxifenol, O-toluidina e intermediarios de la degradación de la lignina entre los que se encuentra el alcohol veratrílico (Sandoval & Ospina, 2008).

El cuadro 1 nos muestra las reacciones y los cofactores utilizados por las dos enzimas ligninolíticas mencionadas (Sandoval & Ospina, 2008). El pH óptimo de estas enzimas, dependiendo del sustrato que se está oxidando puede variar entre 3,5 y 7,5 (González, 2009).

Cuadro 1. Cofactores utilizados y reacciones realizadas por las enzimas ligninolíticas, lacasas y lignina peroxidasa.

| ENZIMA | COFACTOR | REACCIONES |
|-----------------------------------|-----------------------------------|---|
| Lacasas (EC 1.10.3.2) | O ₂ , Cu ²⁺ | Oxidación de fenoles a radicales fenoxilo |
| Lignina Peroxidasas (EC 1.11.1.7) | H ₂ O ₂ | Oxidación de núcleos aromáticos no fenólicos hasta radicales catiónicos |

2.3.3 Factores ambientales que determinan la degradación fúngica de la lignina.

La tasa a la cual se metaboliza la lignina está dada por varios factores del medio ambiente, y los suelos que varían en sus características físicas y químicas poseen marcadas diferencias en su capacidad lignolítica. Varios factores influyen en la descomposición de la lignina, las condiciones para el mejor desenvolvimiento de los hongos de la podredumbre blanca. Estos son: nitrógeno adecuado, humedad, temperatura, aireación, pH y presencia de otros carbohidratos, todos parecen ser muy importantes para descomponer la lignina y compuestos lignocelulósicos del sustrato.

La descomposición se emplea de forma general para referirse a la desintegración de materiales orgánicos de origen animal, microbiano o vegetal (Mason, 1976). Este proceso de desintegración engloba a su vez dos subprocesos simultáneos: por un lado la fragmentación de partículas de un tamaño mayor en otras cada vez menores, hasta que los componentes estructurales (incluidos los celulares) no son ya reconocibles y por otro lado el catabolismo de los compuestos orgánicos (Satchell, 1974).

Los saprófitos comunes en el suelo pueden ser eficaces transformadores de sustratos edáficos en tejidos microbianos. Algunos de ellos pueden asimilar entre el 30 % y 50% del carbono presente en la materia orgánica que descomponen, lo que representa una tasa de conversión muy superior a la de las bacterias, que es del 5 al 20%. Esto significa que el crecimiento muy rápido de los hongos puede originar una elevada demanda del nitrógeno disponible en el suelo, aunque esta puede quedar mitigada por su relación C/N, que es superior a la que presentan las bacterias (Wild, 1992).

El nitrógeno inorgánico presente en el suelo es un factor limitante para el proceso. Sin embargo la aplicación de sales de amonio y nitratos pueden mejorar la descomposición de la lignina, en un tratamiento similar al del suelo (Alexander, 1980). Los hongos disponen de diversos métodos para sobrevivir durante épocas desfavorables, como el calor y la sequía del suelo (producción de esporas en cuerpos fructíferos, clamidósporas, esclerotes, etc.). Por otro lado, la excesiva humedad suele ser desfavorable para ellos (Wild, 1992).

El *G.lucidum* antiguamente era recolectado en sus hábitats naturales (crecía sobre la corteza de ciruelos, arces y robles de zonas húmedas tropicales o templadas), bosques con las condiciones de altura, humedad y temperatura (28°C-32°C) óptimas para el crecimiento del mismo. Sin embargo hoy en día el *Ganoderma lucidum* se cultiva en hábitats artificiales, sobre sustratos artificiales en base a aserrines u otro material lignocelulósicos como salvado de trigo o avena, que permiten el crecimiento y el desarrollo del hongo en condiciones prácticamente idénticas a las naturales, lo aconsejable es que la humedad del

sustrato se encuentre entre el 40% y el 70 %, la humedad relativa del ambiente entre 60% y 70%, y la temperatura esté en el intervalo de 21 °C y 28 °C.

Debido a que la degradación de la lignina es un proceso aerobio, el *G. lucidum* debe mantenerse aireado cuidadosamente de manera que se mantenga un intercambio gaseoso con la atmosfera, pero evitando la contaminación y la pérdida de humedad. Generalmente el *G.lucidum* tolera mejor situaciones acidas y el escaso suministro de calcio que otros microorganismos, y su presencia cuantitativa en los suelos ácidos es igual que en los neutros, de la misma manera la degradación de lignina *in vitro*se presenta en medio con pH entre neutro y acido, aunque el proceso es rápido a pH menor de 5 y ocasionalmente por debajo de pH 4.

2.3.4 Alternativas para la gestión de los lodos residuo generados en la fabricación de papel.

Los lodos de residuo generados en las fábricas de papel se caracterizan por poseer propiedades fisicoquímicas y mecánicas especiales, que le imprimen un comportamiento variable al estar expuesto a condiciones ambientales, dado a su proceso normal de descomposición; también poseen una cantidad relativamente baja de materia orgánica, lo que les ha quitado una gran posibilidad para el reciclaje y la valorización (Hoyos, *et al.*, 2000; Garrett, 1995; Tay, 2000).

Actualmente los rellenos sanitarios siguen siendo uno de los destinos principales para la gestión de estos residuos en muchos países, entre los cuales se encuentra Colombia, pero este destino no maximiza las posibilidades de este recurso, sino que aumenta su impacto sobre el medio ambiente, por lo que ha sido un objetivo tanto de las autoridades como de la industria, fomentar y potenciar el aprovechamiento o valorización de estos residuos (Cardoso y Tomasini, 2002).

El aprovechamiento en el marco de la Gestión Integral de Residuos Sólidos se define como “*el proceso mediante el cual, a través de un manejo integral de los residuos sólidos, los materiales recuperados se reincorporan al ciclo económico y productivo en forma eficiente, por medio de la reutilización, el reciclaje, la incineración con fines de generación de energía, el compostaje o cualquier otra modalidad que conlleve beneficios sanitarios, ambientales, sociales y/o económicos*” (Decreto 1505 de 2003). En este sentido, quedan incluidos en el concepto de valorización el reciclaje, el aprovechamiento energético de los mismos, y cualquier otro tratamiento que, bajo condiciones establecidas, consiga aprovechar recursos contenidos en los residuos de tal manera que estos cumplan una función útil.

La valorización más común de estos lodos está en la industria de materiales de construcción, en la fabricación de ladrillos y cemento para ser más exactos. También existen alternativas de valorización de estos lodos de residuo papeleros. Estas alternativas son menos populares y algunas se encuentran en fase de experimentación, cuando las condiciones técnicas, ambientales y económicas lo permitan podrán ser utilizadas.

2.3.4.1. En la industria cerámica

La utilización de estos lodos en la fabricación de productos cerámicos, como ladrillos, supone así mismo un ahorro energético en las construcciones realizadas con estos ladrillos. Este tipo de lodos poseen entre su composición carbonato de calcio (material que se incorpora al producto final), lignina y algunas fibras de celulosa, las cuales merman las tensiones de cocción de las arcillas y confieren mejores propiedades al producto final (el ladrillo), como una menor conductividad térmica y un mayor calor específico, que se ve reflejado en una reducción en la factura de la energía eléctrica de las edificaciones finales construidas con estos ladrillos (Alleman & Berman, 1992; ASPAPEL, 2008).

En Colombia tenemos el caso de la empresa Green Works Company, que se encargan de la fabricación de materiales de construcción a partir de estos lodos, ellos denominan a los ladrillos como *ecobloques*, estos bloques no requieren horneado ya que sólo son secados a temperaturas medias, aprovechando incluso el calor del sol, ahorrándose así hasta un 80% de energía respecto a la producción de ladrillos convencionales, sin el uso de combustibles fósiles no se generan gases ni productos contaminantes. Es importante aclarar que estos ecobloques se deben utilizar como elemento de mampostería, o sea como material no estructural (MIT Technology Review, 2013).

Otra alternativa en el aprovechamiento es los lodos es la fabricación de paneles prefabricados para la construcción, muy usados tanto en tabiques como en techos falsos, en reemplazo de los paneles comerciales de yeso y fibrocemento o en ocasiones el Gyplac (drywall). El lodo viene a ser para de la una mezcla con yeso, en una proporción hasta del 80-20 % (p/p) respectivamente, con calidad garantizada al cumplir con todas las pruebas establecidas por la ASTM para la resistencia, representando un 24% menos en peso que los paneles de yeso y un 64,7% menos que las de fibrocemento (Quinchía et al, 2007).

2.3.4.2. Reciclaje mediante vermicultura

Una solución alternativa es el reciclaje de estos lodos residuales para producir abono orgánico, a través de un proceso de lombricultura (Hoyos Hurtado, 2000). La investigación se llevó a cabo en la Universidad Nacional Agraria la Molina en Lima, Perú, donde el lodo provino incluso de la empresa Kimberly Clark del Perú. El experimento consistió en mezclar el lodo con estiércol vacuno en 5 diferentes proporciones (100%, 75%, 50%, 25% y 0%), como sustrato para lombrices del género *Eisenia foetida*, más conocida como lombriz roja californiana.

Se determinó que esta clase de lombrices crecen en mayor cantidad en el lodo puro, además los resultados de los análisis fisicoquímicos del humus producido indican que puede ser utilizado como enmienda orgánica según la Norma Española B.O.E. 146-1991 (Juárez, 2010).

3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

En la actualidad una gran cantidad de lodos residuales ricos en ligninase generan como resultado de la actividad de la industria papelera en el mundo entero, se calcula que esta cifra es mayor a 1,5 millones de toneladas por año. En Colombia se producen alrededor de 1000 toneladas diarias de lodos, su manejo es difícil y por su lenta degradación se convierten en un problema de alto impacto ambiental.

Generalmente, estos residuos formados por fibras cortas de pulpa de papel, aguas de desecho y minerales se almacenan indefinidamente en los vertederos, provocando crecimiento de fangos, donde durante su descomposición generan metano, un potente gas de efecto invernadero, impacto térmico, formación de espuma, problemas de color y pérdida de belleza en el ambiente (Pokhrel D. y Viraraghavan T., 2004).

Las empresas administradoras de los vertederos deben realizar costosas obras de ingeniería para evitar que los drenajes de estos lodos alcancen los cursos de agua cercanos. Por otro lado, a medida que van colmándose, se impone la necesidad de construir más basureros, una acción que despierta la contestación de los ciudadanos que no quieren tener cerca este tipo de instalaciones.

Los industriales de este sector invierten en promedio 2000 millones de pesos al año para deshacerse de ese desecho que repleta los rellenos sanitarios, pues sólo en Pereira implica el 17 por ciento de la basura que llega al basurero.

La utilización de hongos de pudrición blanca representa una de las opciones de mayor viabilidad en la solución de esta problemática ya que el costo de inversión es bajo y se da un adecuado manejo a dichos residuos.

En el presente trabajo se plantea un estudio de la capacidad de degradación de lignina del hongo de pudrición blanca *Ganoderma lucidum* al usarlo en los lodos de desecho del proceso de fabricación del papel que se produce en la empresa Colombiana Kimberly S.A. con el fin de encontrar una alternativa para el mejoramiento de la deposición de estos desechos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Analizar la actuación del *Ganoderma Lucidum* como organismo degradante de lignina en lodos de desecho provenientes de la industria productora de papel Colombiana Kimberly S.A.

4.2 Objetivos Específicos

Establecer las condiciones iniciales de lignina y características químicas de la misma en la muestra de lodo tomada de la industria Papelera Colombiana Kimberly S.A.

Determinar la concentración necesaria del inóculo para llevar a cabo el ensayo.

Identificar la capacidad de degradación del *Ganoderma Lucidum* en la lignina del lodo paplero durante 60 días de ensayo.

5. METODOLOGÍA

5.1 Toma y transporte de la muestra total de lodo.

Se tomaron 12 kg de muestra compuesta en la planta de Colombiana Kimberly Colpapel, ubicada en Cali, Colombia, en bolsa triple de polietileno oscura, siguiendo un método de composición de una sola muestra mediante un muestreo aleatorio llevado a cabo en el sitio de almacenamiento de los lodos. Por políticas de la empresa no fue posible tener registro fotográfico de la toma de la muestra en el lugar.

Al otro día de la recolección se llevó y se almacenó a temperatura ambiente en el laboratorio del semillero de suelos de la escuela de Química de la Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Risaralda, Colombia.



Figura 4. Lodo recolectado listo para pruebas en el laboratorio. (Ref.: Propia, 2013)

5.2 Caracterización de los lodos

5.2.1 pH del lodo

Para medir el pH de lodo se realizó el procedimiento de ensayo indicado en el Manual de Laboratorio de análisis químico de suelos y foliares de la Universidad Tecnológica de Pereira, estos análisis se realizaron por cuadruplicado. Se tomaron 5g de lodo aleatoriamente, se diluyeron en 20 ml con agitación continua durante 1 hora, y luego se midió el pH directamente en el pH-metro previamente calibrado.



Figura 5. Imagen de la toma de pH para una de las muestras de lodo. (Ref.: Propia, 2013)

5.2.2 Materia orgánica

Para la medición de materia orgánica se utilizó el método fotométrico de Walkley y Black, según el Manual de laboratorio de análisis químico de suelos y foliares de la Universidad Tecnológica de Pereira. Se midió la materia orgánica inicial y final del lodo.

5.2.2.1 Preparación de soluciones

Dicromato de potasio: se disolvió 0,5 g de $K_2Cr_2O_7$ y se llevó con agua destilada caliente hasta 50 ml.

Patrón principal de sacarosa: 10 g de Sacarosa en 200 ml de agua destilada; cada ml de esta solución contenía 50 mg de sacarosa.

Soluciones de trabajo: se tomaron alícuotas del patrón principal de 5, 10, 15, 20 y 25 ml, se llevaron hasta 100 ml. Luego de cada una de estas soluciones se tomaron 2 ml en Erlenmeyer de 250 ml y se calentaron a $105^\circ C$ de manera que cada uno contenía 5, 10, 15, 20 y 25 mg de sacarosa.

Muestras: se pensaron 0,15 g de lodo en un Erlenmeyer. Se le adicionó 5 ml de la solución de $K_2Cr_2O_7$ que se preparó y 5 ml de H_2SO_4 concentrado, se agregó 50 ml de agua destilada y se dejó reposar durante 2 horas. Se analizaron tres muestras aleatorias de lodo.

5.2.2.2 Lectura Fotómetro

Se realizó lectura de la curva de calibración, incluido un blanco, y de las muestras en el espectrofotómetro Shimadzu. Mod.UV-1201, perteneciente al laboratorio de análisis instrumental de la Universidad Tecnológica de Pereira, se utilizaron celdas de vidrio de 1 cm de espesor, a una longitud de onda de 585 nm. Para la determinación del % de materia orgánica, se tomó el dato de la absorbancia que dio el equipo y por medio de la siguiente ecuación se obtuvo el porcentaje:

$$\% M.O = -0,649 + (51,233 * Abs) - (16,307 * Abs^2) \quad [Ec. 1]$$

5.2.3 Porcentaje de humedad por gravimetría

Se siguió el protocolo encontrado en Fernández Linares y col (2006), se pesaron 5 g de muestra sobre un papel filtro, se colocó la muestra dentro de la estufa a 50 °C de 4 a 5 horas, experimentalmente se realizó un cambio de la temperatura y del tiempo reportados en el protocolo porque se quemaba las muestras. Una vez sacada la muestra de la estufa fue puesta en un desecador para que se enfriara. Finalmente se pesó la muestra con todo y papel. Los porcentajes de humedad en el lodo se calculan por la diferencia de pesos. Se tomó el porcentaje de humedad inicial y se hizo seguimiento de esta a lo largo del trabajo.

5.3 Medios de cultivo para el *Ganoderma lucidum*

Se utilizaron cultivos en medio sólido (placa) y en medio líquido. Para el cultivo en placa el medio escogido fue el agar papa-dextrosa (PDA), mientras que para el cultivo en medio líquido se utilizó un homogeneizado en agua peptona (AP) 0,1 (p/v) con granos de frijoles como sustrato. Se siguieron procedimientos del Manual de microbiología de la escuela de Tecnología de la Universidad Tecnológica de Pereira.

5.3.1 Medio Agar papa-dextrosa (PDA)

Se solubilizaron 7,1 g de PDA en 180 ml de agua destilada. Posteriormente se esterilizó a 121 °C y 15 psi durante 15 minutos. Se tomaron alícuotas de 20 ml y se depositaron en cada una de las 9 cajas de Petri, previamente esterilizadas. Este medio de cultivo fue escogido porque permite el adecuado desarrollo de hongos y levaduras, incluido el *G. lucidum*.

5.4 Preparación del pre-inóculo del hongo *Ganoderma lucidum*

La cepa se obtuvo en el laboratorio de microbiología de la Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, departamento de Risaralda, Colombia, entidad que a su vez obtuvo la cepa madre del Centro Nacional de Investigación de Café (Cenicafé), Chinchiná, departamento de Caldas, Colombia.

El trabajo tuvo un diseño básicamente experimental, la preparación del inóculo se realizó en granos de frijol lavados y remojados a temperatura ambiente durante 24 horas; posteriormente, se drenó el exceso de agua y se colocaron aproximadamente 200 g de frijol rojo (*Phaseolus vulgaris*) en un frasco tapa azul, ya esterilizados a 121 °C y a 15 psi durante 30 minutos, fueron inoculados con 100 ml de un homogenizado del hongo (la mitad de una caja de Petri invadida con micelio, en 100 ml volumen de AP), se usó algodón para tapar los frascos.

Se incubaron a temperatura ambiente, aproximadamente 23 °C, en un lugar donde no se recibió luz directa hasta que el micelio invadiera totalmente el grano, se realizó por duplicado. (Maldonado A. Yanik .Ixchel, 2007).

Con tres cantidades diferentes de *G. lucidum* (10 frijoles, 20 frijoles, 30 frijoles) se inocularon respectivamente tres muestras de lodos, que fue el sustrato del hongo durante los siguientes 2 meses, esta etapa es llamada colonización del micelio (corrida del spawn) (MushWorld, 2005).

5.5 Cuantificación del *Ganoderma lucidum* por UFC

Se realizaron diluciones a las diferentes concentraciones a las cuales se inocularon las muestras de lodo. Se depositaron 10, 20, 30 granos de frijoles, ya invadidos por el micelio, correspondientemente en tres frascos tapa azul con 90 ml de agua peptonada 0,1 (p/v) cada uno, luego se mantuvieron en el agitador tipo vórtex durante un minuto. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas de (1:100; 1:1000; 1:10000; 1:100000) en agua peptonada 0,1 (p/v). A partir de estas diluciones preparadas se realizó siembra por vertido en placa en agar papa-dextrosa (PDA) (Camacho et al, 2009).

Las cajas fueron incubadas a temperatura ambiente, aproximadamente 25 °C, por 7 días en un lugar oscuro. Pasado el tiempo de incubación, a cada caja de Petri se le realizó el conteo en un contador digital de colonias, con un rango de sensibilidad de 25 a 250 colonias, el reporte se hizo como UFC/ml.



Figura 6. Recuento UFC: siembra por vertido en placa en PDA para la disolución con 10 frijoles. (Ref.: Propia, 2013)



Figura 7. Recuento UFC: siembra por vertido en placa en PDA para la disolución con 20 frijoles. (Ref.: Propia, 2013)

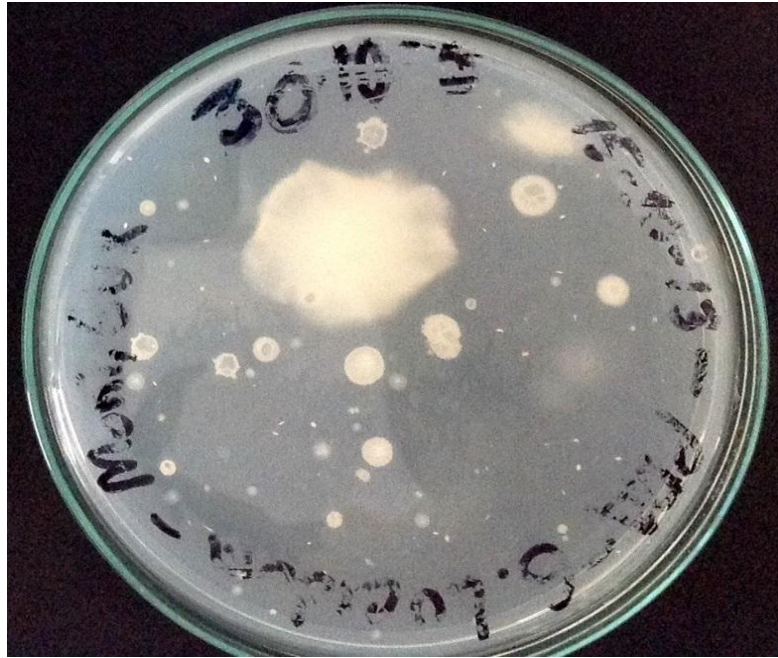


Figura 8. Recuento UFC: siembra por vertido en placa en PDA para la disolución con 30 frijoles. (Ref.: Propia, 2013)

5.6 Inoculación en el lodo

Los granos de frijol fueron mezclados con el sustrato (lodo) en frascos de vidrio de 3 kg de capacidad, con aproximadamente 1 kg de sustrato por frasco, en las muestras se depositaron aleatoriamente 10, 20, 30 frijoles. Los frascos fueron tapados con interlón, un material poroso que facilita el intercambio gaseoso, sin que se pierda humedad, este procedimiento se realiza por triplicado. A continuación fueron llevados a un área seca, relativamente oscura y cerrada (Pedro N. Martínez Y et al, 2008).

Los frascos se mantuvieron bajo temperatura ambiente, que en la etapa de colonización del micelio la temperatura óptima está entre (20-30) °C, con una humedad relativa del ambiente entre (60-70) % (MushWorld, 2005), y la ciudad de Pereira cumple con estas condiciones climáticas.

5.7 Cuantificación de lignina

Para cada uno de los ensayos descritos a continuación se utilizó material secado en un horno a 50 ° C durante 5 horas.

5.7.1 Digestión ácida

A aproximadamente 1 g de muestra se le adicionó gradualmente unos 10 ml de ácido sulfúrico concentrado frío, luego se agregó agua destilada hasta alcanzar dos tercios del volumen del balón, se sometió a reflujo durante 2 horas, se filtró y se lavó y secó a 50 °C. Este tratamiento fue aplicado en las tres diferentes concentraciones de lignina (10, 20,30 granos de frijol inoculado) realizando 3 réplicas por cada concentración. Se cuantificó lignina inicial, en la semana 3, semana 5, semana 7, y finalmente en la semana 8.

La determinación del contenido de lignina se realizó según la norma TAPPI T222 os-74 (Technical Association for Pulp and Paper Industries, 1978). El porcentaje de lignina se determina a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de Lignina: } \frac{W_{\text{Lignina}}}{W_{\text{anhidro de la muestra}}} \times 100[\text{Ec 2}]$$

5.8 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados en INFOSTAT versión estudiantil, y comparados por la prueba Shapiro-Wilk ($p < 0.05$), posteriormente como análisis no paramétrico la prueba de Kruskal-Wallis. Todas las medidas se realizaron por triplicado.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Caracterización de los lodos

El pH calculado de las muestras de lodo es de un 7,7 con una desviación estándar de 0,04. Concentración de iones hidrógeno en un medio podría afectar el crecimiento ya sea indirectamente por su efecto sobre la disponibilidad de nutrientes o directamente por la acción sobre las superficies celulares. Es probable que si se satisfacen las necesidades de nutrientes mayoría de los hongos crecen bien sobre un amplio rango de pH ácido en el lado de la neutralidad, por ejemplo, pH 4-7. Algunos hongos, tales como los que producen ácidos orgánicos, son capaces de tolerar considerablemente más condiciones ácidas (Carlile, Watkinson & Gooday, 2001; Rodríguez et al, 2006). El *G. lucidum* es un hongo con amplio rango de pH para desarrollarse, por lo que el pH obtenido del lodo se consideró adecuado para que este sea sustrato del micelio.

Inicialmente se obtuvo que el lodo puro tenía un porcentaje de materia orgánica promedio de 6,5 (Anexo A), mientras que al final del trabajo el porcentaje de materia orgánica aumentó a 6,8; 7,3; 8,5 (Tabla 1, Anexo B) respectivamente para las concentraciones de 10, 20,30. Debido a la colonización del hongo en el lodo.

La disponibilidad de nitrógeno asimilable, por ejemplo, a menudo limitará el crecimiento del micelio, mientras que los compuestos de carbono utilizables estén presentes en exceso para sus necesidades inmediatas.

El desperdicio de las enzimas extracelulares es probablemente minimizado por una cubierta o funda adhesiva que se desarrolla alrededor de la hifa durante la colonización del hongo sobre el sustrato, las moléculas de enzimas son retenidas en estas fundas para que no se dispersen muy lejos de la zona que será degradada donde la enzima se solubiliza para la degradación del material que el hongo requiere absorber. Esto es lo que permite que el hongo pueda digerir enzimáticamente el micelio viejo como fuente de nitrógeno orgánico y reutilizar su

misma biomasa para desarrollar nuevas hifas (Hudson, 1986; Gow, 1995; Carlile Watkinson & Gooday, 2001)

La humedad del sustrato promedio fue del 52,7% (Anexo C). Un contenido de humedad del sustrato entre 50-75 %, generalmente permite el crecimiento máximo del micelio (Rodríguez et al, 2006).

Tabla1. Porcentaje final de Materia Orgánica en lodos

| Inóculo | %M O | SD |
|---------|------|------|
| 10 | 6,8 | 0,15 |
| 20 | 7,3 | 0,12 |
| 30 | 8,5 | 0,06 |

6.2 Cuantificación del *Ganoderma lucidum* por UFC

Se obtuvo una concentración aproximada del hongo mediante el conteo de UFC/ml (tabla.2). Con un rango de sensibilidad de 25 a 250 colonias, se reportaron $22,1 \times 10^5$ UFC/ml, 44×10^5 UFC/ml, y 52×10^5 UFC/ml.

Se observó que el número de frijoles inoculados tiene relación directa y lineal con las cantidad de hongo *G. lucidum* que se pueda encontrar en el medio. La concentración más alta del micelio se encontró en el lodo inoculado con 30 frijoles, así mismo la concentración más baja de hongo fue la del lodo que se inoculó con 10 frijoles.

Tabla 2. Recuento de UFC (Unidades Formadoras de Colonias)

| # frijoles por homogenizado | Disoluciones | | | | Resultados UFC/ml |
|-----------------------------|------------------|------------------|-------------------------|------------------|----------------------|
| | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻⁵ | |
| 10 frijoles | >250 | >250 | 62 | 38 | 22,1*10 ⁵ |
| 20 frijoles | >250 | >250 | 38 Crecim. extend | 44 | 44*10 ⁵ |
| 30 frijoles | >250 | >250 | 42 Crecim. extend | 52 | 52*10 ⁵ |

6.3 Inoculación y etapa de crecimiento micelial

El cultivo en medio sólido es un método usual de preparación del preinóculo para estos tipos de hongos. El sistema de medio sólido en frijol rojo (*Phaseolus vulgaris*) fue óptimo para el crecimiento del *G.lucidum*. A temperatura ambiente, 24 °C aproximadamente, los primeros signos de crecimiento micelial se vieron a las 72 h de incubación y el medio fue completamente colonizado por el hongo dentro de los 10 días de incubación.

En la inoculación del lodo, el área de contacto del micelio con el sustrato fue adecuada para la asimilación de nutrientes, la invasión del sustrato por parte del *Ganoderma lucidum* se evidenció en las zonas de ataque formándose una masa compacta blanco-algodonosa en todas las muestras que contenían diferente cantidad de inóculo, que aparecieron a las dos semanas después de la incubación (Figura 9, figura 10, figura 11).

Los cultivos en estado sólido han sido considerados como un método eficiente para la producción de enzimas debido a sus beneficios potenciales de alta producción y bajo costo (Pandey et al. 1999). Se escogió como sustrato sólido el frijol rojo debido a su alto contenido de compuestos fenólicos, en especial en fermentación en estado sólido (Limón et al, 2015). Los compuestos fenólicos son inductores muy eficientes de lacasa (Souza et al, 2004).

Dentro de las enzimas extracelulares involucradas en la degradación de lignina, la lacasa parece ser la principal enzima producida por el *G. lucidum* en la mayoría de condiciones de cultivo, aunque la Mn peroxidasa incluso con baja actividad, ha sido también encontrada (Silva et al., 2005; Songulashvili et al., 2007; Coelho et al., 2010)

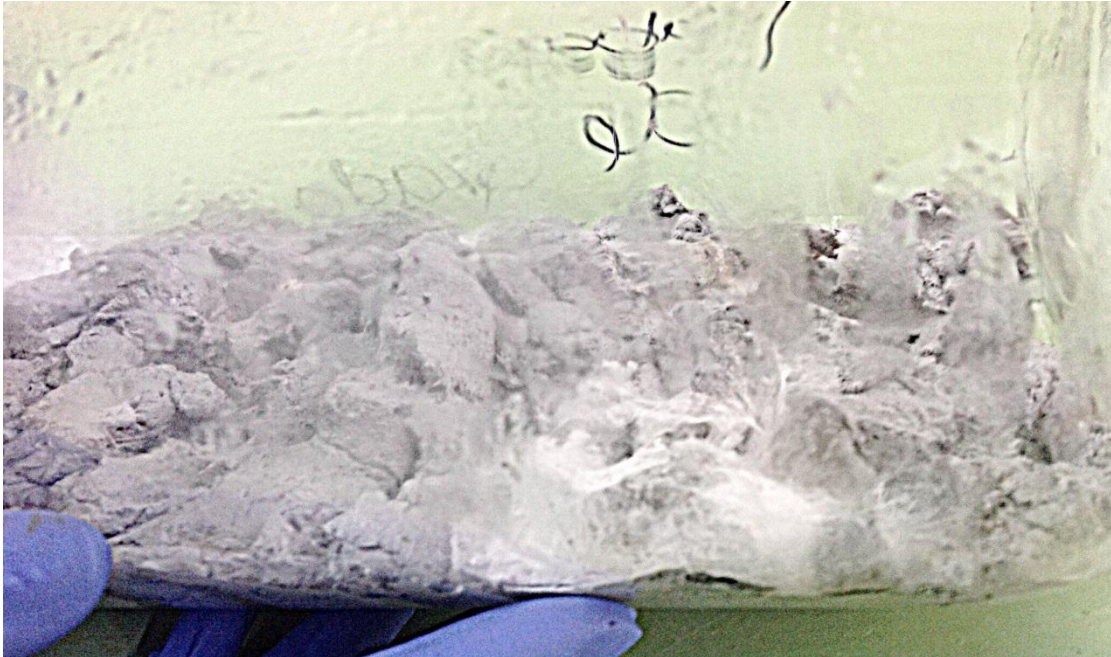


Figura 9. Lodo inoculado con 10 fríjoles con *G.lucidum* en la semana 3, por triplicado. Se puede observar el crecimiento del micelio (zonas blancas).(Ref.: Propia)



Figura 10. Lodo inoculado con 20 frijoles con *G.lucidum* en la semana 3, por triplicado. Obsérvese presencia del micelio (zonas blancas) en mayor cantidad que en la imagen anterior. (Ref.: Propia)



Figura 11. Lodo inoculado con 30 frijoles con *G.lucidum* en la semana 3, por triplicado. Se puede también observar se da la invasión del sustrato por parte del micelio. (Ref.: Propia)

6.4 Cuantificación de lignina.

A partir de la inoculación de los frijoles con *G. lucidum* en el lodo, se evidenciaron porcentajes de lignina cada vez más bajo conforme transcurrió el tiempo. La primera toma de muestra después de la cuantificación de lignina inicial, se llevó a cabo en la semana 3 de inoculación, la segunda cuantificación se realizó en la semana 5, sucesivamente en la semana 7 y en la semana 8 se hizo cuantificación de lignina, se obtuvieron promedios de porcentajes en peso de lignina de 57,34%; 55,64%; 47,52%; 38,17% respectivamente (Figura 12).

La naturaleza del ataque de estos hongos sobre el material es lenta al inicio de la colonización, debido probablemente al tiempo de adaptación necesario para la solubilización de las enzimas lignolíticas en el medio (Hundson, 1986; Carlile, Watkinson & Gooday, 2001).

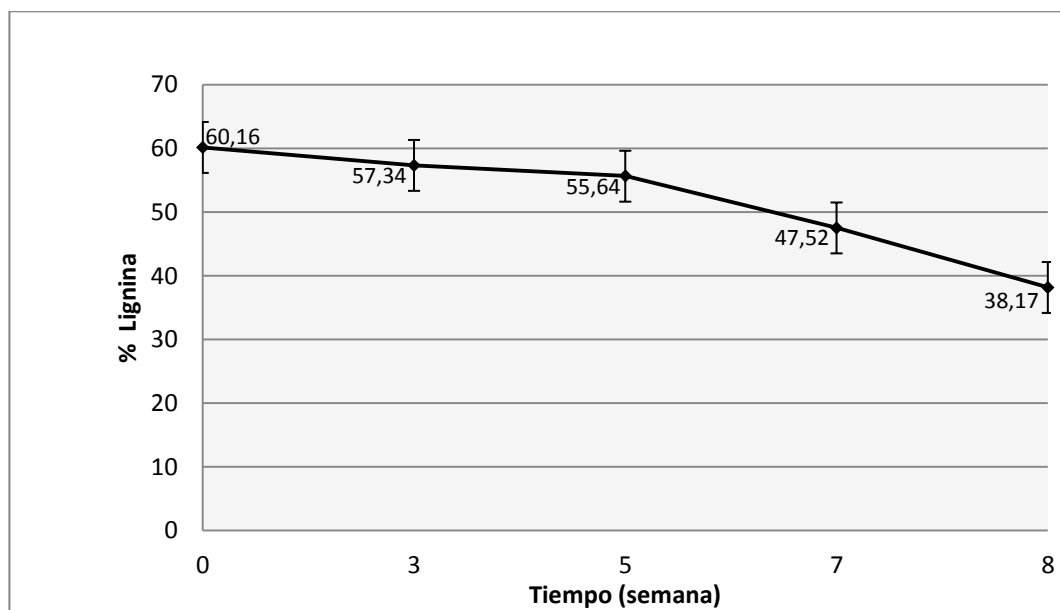


Figura 12. Porcentaje promedio de lignina en el lodo a lo largo de las 8 semanas.

Se realizó un análisis de varianza en INFOSTAT, donde al encontrar con la prueba de Shapiro-Wilks que no hay una distribución normal de los datos (Tabla 4), se procedió a realizar la prueba de Kruskal-Wallis para el parámetro tiempo (Tabla 5).

Tabla 3. Resultados del análisis de varianza (INFOSTAT).

| Variable | n | Media | D.E. | W* | p(Unilateral D) |
|-----------------|----------|--------------|-------------|-----------|------------------------|
| %lignina | 39 | 50,47 | 8,80 | 0,87 | <0,0001 |

El tiempo donde se tomaron las muestras para la cuantificación fueron ocho semanas que es exactamente la etapa de crecimiento micelial de *G.lucidum*, se observa que en este lapso hubo degradación de lignina progresiva en el tiempo, al descender los porcentajes de lignina conforme transcurren las semanas. El análisis no paramétrico adicionalmente se mostró que la semana 8 fue en la que hubo menores porcentajes de lignina (Tabla 5), el rango indicó que sólo hubo diferencias significativas en las semanas 7 y 8 con respecto al resto de semanas, pero que la semana 8 fue donde más disminuyó el porcentaje de lignina.

Tabla 4. Análisis no paramétrico para la variable tiempo (INFOSTAT)

| Variable | semana | N | Medias | D.E. | Medianas | H | p | Trat. | Ranks |
|-----------------|---------------|----------|---------------|-------------|-----------------|----------|----------|--------------|--------------|
| lignina | 0,00 | 3 | 60,16 | 0,85 | 60,16 | 32.12 | <0,0001 | 8,00 | 6,00 A |
| lignina | 3,00 | 9 | 57,34 | 5,39 | 57,87 | | | 7,00 | 13,22 A |
| lignina | 5,00 | 9 | 55,64 | 2,79 | 56,30 | | | 5,00 | 25,56 B |
| lignina | 7,00 | 9 | 47,52 | 2,94 | 47,60 | | | 3,00 | 29,33 B |
| lignina | 8,00 | 9 | 38,17 | 7,04 | 39,60 | | | 0,00 | 37,67 B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Otro parámetro de estudio fueron las diferentes concentración de inóculo, esta difería en el número de granos de frijol con *G.lucidum* que se implantaron en las muestras de lodo. A lo largo del experimento se pasó de tener un porcentaje inicial de lignina sin inóculo de 60,16%, a porcentajes promedio de 52,95%, 48,20%, 47,85% para las concentraciones de 10, 20 ,30 de frijoles inoculados respectivamente (Figura 13).

Gráficamente vemos que la línea tiene una pendiente negativa que a su vez es muy pequeña (Figura 13), con lo que se mostró que hay degradación de lignina en todas las muestras con diferente concentración de hongo, pero no se encuentra mayor diferencia entre cada grupo con diferente cantidad de inóculo, respecto al promedio de los datos de porcentaje medidos en las muestras durante el todo experimento.

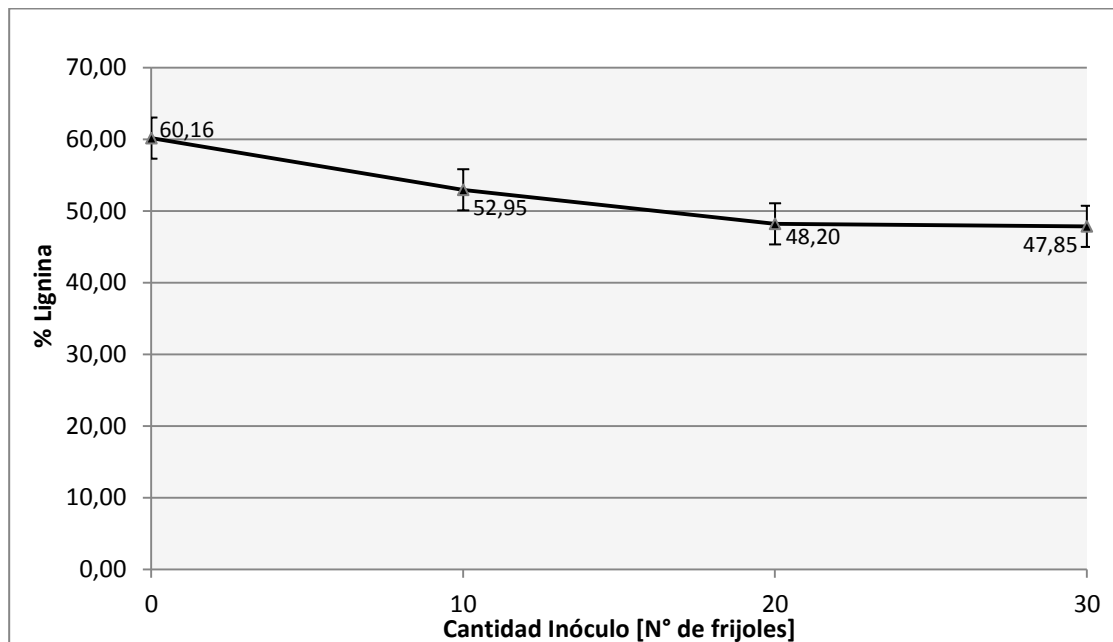


Figura 13. Promedio de los porcentajes de lignina durante las ocho semanas según la cantidad de *G. lucidum*, 0, 10, 20, 30 frijoles inoculados en el lodo respectivamente.

A continuación en la tabla 6 podemos observar como con la prueba de Kruskal-Wallis para el parámetro concentración en el INFOSTAT, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamiento con diferente inóculo, sólo se aceptó diferencia significativa de estas concentraciones al compararlas con la concentración 0 de inóculo. Lo que demuestra que todas las concentraciones de inóculo degradaron lignina.

Tabla 5. Análisis no paramétrico para la variable concentración (INFOSTAT)

| Variable | inoculo | N | Medias | D.E. | Medianas | H | p | Trat. | Ranks |
|----------|---------|----|--------|-------|----------|-------|--------|-------|---------|
| lignina | 0,00 | 3 | 60,16 | 0,85 | 60,16 | 10,52 | 0,0147 | 20,00 | 14,67 A |
| lignina | 10,00 | 12 | 52,95 | 5,39 | 53,85 | | | 30,00 | 18,58 A |
| lignina | 20,00 | 12 | 48,20 | 6,99 | 49,73 | | | 10,00 | 22,33 A |
| lignina | 30,00 | 12 | 47,85 | 12,00 | 51,35 | | | 0,00 | 37,67 B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Si se analiza el porcentaje de lignina degradado de cada concentración de inóculo por separado, se visualiza mejor el comportamiento del micelio en el lodo. En las primeras tres semanas de experimento hubo un descenso leve en el porcentaje de lignina (Anexo D), que fueron de 1,74%; 4,62%; 2,10%; respectivamente para 10, 20, 30 frijoles inoculados (Figura 14). Inicialmente no hubo diferencia significativa en el porcentaje de lignina del lodo con la menor y la mayor cantidad de inóculo. Mientras que en el lodo con una cantidad intermedia de inóculo, 20 frijoles, se había degradado hasta ese momento más del doble de la lignina que se degradó con las otras concentraciones de inóculo, 10 y 30 frijoles. Para la semana 5 el porcentaje de lignina siguió declinando, los reportes fueron de 3,06 %; 7,53 %; 2,97%, en orden ascendente de cantidad de inóculo (Figura 14). En la semana 7 se mostraron porcentajes de 9,66%, 13,73%, 14,54%, para 10, 20, 30 frijoles inoculados en las muestras. Solamente en la semana 8 se logró degradar mayor

porcentaje de lignina en las muestras que contenían 30 frijoles (Figura 14).

En el caso de los WRF, este tipo de hongos no pueden utilizar la lignina como su fuente de carbono y energía, por ello dependen de carbohidratos más digeribles como los monómeros precursores de fenilpropano. La función primaria de la ligninólisis es exponer estos monómeros al ataque del hongo con ayuda de sus diferentes tipos de enzimas. En la mayoría de hongos WRF se ha visto que la ligninólisis ocurre durante el metabolismo secundario, es decir bajo limitación de nutrientes, lo que permite que hongo sólo sintetice y secrete ligninolíticos que comiencen a fragmentar el polímero (Kirk and Farrell, 1987).

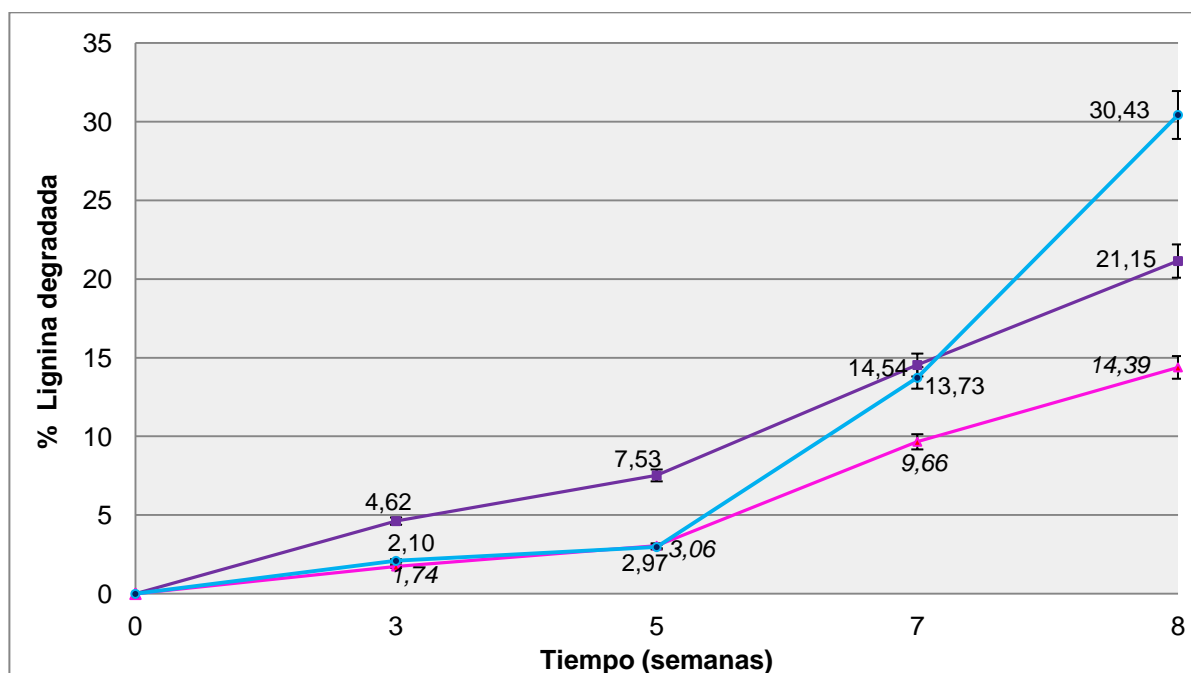


Figura 14. Porcentaje de lignina degradada por *G.lucidum* en los lodos que contienen diferentes cantidades de inóculo. Símbolos: ★ 10 frijoles inoculados, ■ 20 frijoles inoculados, ● 30 frijoles inoculado

La degradación de lignina por parte de los WRF es más rápida que con cualquier otro microorganismo. Sin embargo, en el sustrato de crecimiento no solo hay lignina, también se encuentra como fuente de alimento los frijoles. El hongo en

primera instancia agota parcialmente la reserva de fríjol que tiene, luego crece en el lodo y comienza a degradar la lignina.

Esto explica porque en las muestras con 20 fríjoles, hasta la semana 7 hubo mayor porcentaje de lignina degradada que en las muestras con 30 fríjoles, siendo en algunos casos de más del doble la diferencia entre ellos. Y también el porqué en la semana 8, las muestras que contenían 30 fríjoles una vez carecieron de los nutrientes del fríjol, y ya al haber mayor cantidad de micelio, se obtuvo mayor porcentaje de lignina degradada que en las muestras con 20 fríjoles.

Cuando se analizó el porcentaje total de degradación de lignina en la semana 8, se obtuvo que el inóculo de 30 fríjoles realizó una degradación de 50,58% de la lignina total presente en la muestra de lodo; seguido por el inóculo de 20 fríjoles que tuvo una degradación del 35,16% de la lignina total de la muestra; 23,92%, por último se encuentra la muestra con 10 fríjoles inoculados que presentó una degradación del 23,92% de la lignina encontrada en la muestra (Tabla 7).

Tabla 6. Porcentaje total de degradación de lignina respecto a cada inóculo

| Inóculo | %Lignina inicial | %Lignina final | |
|---------|------------------|----------------|-----------------------|
| | | degradada | %Total de Degradación |
| 10 | 60,16 | 14,39 | 23,92 |
| 20 | 60,16 | 21,15 | 35,16 |
| 30 | 60,16 | 30,43 | 50,58 |

Como se puede observar el desempeño del inóculo de 20 fríjoles fue excelente durante todo el trabajo, puesto que respondió mucho más rápido a la degradación desde el inicio, incluso con una rata de degradación relativamente constante (Fig. 14). Sin embargo en la última semana el inóculo de 30 fríjoles degradó aproximadamente un 15% más de lignina que el de 20 fríjoles. A pesar de la eficacia de los 20 fríjoles inoculados, para el tiempo del trabajo los 30 fríjoles fue una cantidad de inóculo más eficiente.

7. CONCLUSIONES

- El hongo de pudrición blanca (WRF) *Ganoderma lucidum* fue capaz de degradar lignina de los lodos residuales del proceso del papel, bajo las condiciones de temperatura, humedad y pH del experimento.
- La degradación de la lignina aumentó gradualmente con el tiempo. En consecuencia, en la semana 8 fue donde se presentó el porcentaje más bajo de lignina en los lodos.
- En todas las cantidades de hongo que se inocularon en las muestras de lodo se obtuvo degradación de lignina.
- Para el periodo de ocho semanas, la inoculación con 30 fríjoles fue la que mostró mayor eficiencia para muestras de 1 kg de lodo, al degradar un 50,58% de toda lignina presente.

8. RECOMENDACIONES

- Se aconseja más tiempo de ensayo, pues el comportamiento del hongo mostró que la degradación puede continuar y obtenerse porcentajes menores de lignina en el lodo.
- En ocasiones es recomendable ajuste de pH para incrementar la producción enzimática.
- Diseñar un biorreactor a escala semi-industrial o industrial para aplicar las propiedades fúngicas encontradas para la degradación de lignina.

9. REFERENCIAS

1. **ABAD, M.** *Características y propiedades*. En: Cultivos sin suelo curso superior de especialización. Editor F. Canovas Martínez & J. Díaz Álvarez. FIAPA. Almería, pp. 47-62.1993
2. **AGGELIS G., ETLALISTIS C., NERUD F.,STOYCHER I., LYBERATUS G., ZERVAKIS G. I.** Evaluation of white-rot fungus for degradation and decolorization of effluents from the green olive debittering process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002. 59
3. **AL-GABR HAMID MOH., ZHENG TIANLING., YU XIN.** Occurrence and quantification of fungi and detection of mycotoxygenic fungi in drinking water in Xiamen City, China. *Science of the Total Environment* (2014); 466:1103-1111.
4. **ALLEMAN, JAMES E., Y BERMAN, NEIL A.** 1992. Constructive sludge management: Biobrick. *Journal of Environmental Engineering*, vol 110, N° 2, March/April. P. 301-311. p.302
5. **ASPAPEL (Asociación Española de Fabricantes de Pasta, Papel y Cartón).** Guía de gestión de residuos (Fábricas de pasta, papel y cartón). 2008.
6. **CAMACHO, A., M.GILES, A.ORTEGÓN, M.PALAO, B.SERRANO Y O.VELÁZQUEZ.** 2009. Técnicas para elAnálisis Microbiológico de Alimentos. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México.
7. **CAÑO-DELGADO, A., PENFIELD, S., SMITH, C., CATLEY, M., BEVAN, M.** Reduced cellulose synthesis invokes lignification and defense responses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 2003; 34:351–362

8. **CARDONA MARIANA, OSORIO JULIANA, QUINTERO JUAN,** degradación de colorantes industriales con hongos lignolíticos, Fac. Ing. Univ. Antioquia, vol 48 pag 27-37 junio de 2009.
9. **CARDOSO, L. y TOMASINI, C. 2002.** Características y efectos de residuos peligrosos. Serie autodidáctica de medición de la calidad del agua, segunda parte. México. www.conagua.gob.mx/CONAGUA/Noticias/residuos_peligrosos.pdf. 38 p.
10. **CARLILE M.; WATKINSON S. & GOODAY G., 2001.**-The fungi. Segunda ed. London: Academic Press. 558p.
11. **CARRILLO LEONOR. 2003.** Microbiología Agrícola, Capítulo 3, pp. 11-12
12. **CASTILLO RODRÍGUEZ FERNANDO. 2005.** Biotecnología Ambiental, pp 407
13. **CEGARRA, J., HERNÁNDEZ, T. Y COSTA, F., 1983.** Adición de residuos vegetales a suelos calizos. V. Influencia sobre el desarrollo vegetal. *Anales de Edafología y Agrobiología* 42 (3-4), 545-552.
14. **CHEN H.S., TSAI Y.F., LIN S., LIN C.C., KHOO K.H., LIN C.H., WONG C.H.** Studies on the immuno-modulating and anti-tumor activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) polysaccharides. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 12 (2004), pp. 5595–5601
15. **COELHO, J.S., SOUZA, C.G.M., OLIVEIRA, A.L., BRACHT, A., COSTA, M.A.F., PERALTA, R.M., 2010.** Comparative removal of bentazon by *Ganoderma lucidum* in liquid and solid state cultures. *Current Microbiology* 60, 350e355
16. **CÓRDOBA, K. (2009).** "Resistencia Natural de *Guadua angustifolia* Kunth. Al ataque de hongos ligninolíticos como alternativa hacia nuevas posibilidades de uso". Proyecto previo a la obtención del título de Maestría en Ciencias Biológicas Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. Pp 41-43. [Versión Electrónica]

17. **CLIMENT, M. D., ARAGÓN, P., ABAD, M. Y ROSELLÓ, M. V., 1990.** Utilización del compost de residuos sólidos urbanos como enmienda orgánica en agricultura. *Actas 1er. Congreso Internacional de Química de la ANQUE 1*, 171-180. Tenerife.
18. **DÁVILA, G. & VÁSQUEZ, R. (2006).** “Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales”. *Mensaje Bioquímico* 30. Pp 29-55. [Versión Electrónica]
19. **DECRETO NÚMERO 1505, 2003.** Publicacdo en el diario oficial 45.210 del 6 de junio de 2003. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, República de Colombia.
20. **ERIKSON, K-E.L, R.A BLANCHETTE AND P. ANDER. 1990.** *Microbiol. And enzymatic degradation of wood and wood components.* Springer-Verlag. Berlin, New York. 407 p
21. **ERNESTO SHIMIZU, JORGE O. VELEZ RUEDA, PEDRO D. ZAPATA, LAURA L. VILLADA. 2009.** Degradación de licornegropor *Ganoderma applanatum* y *Pycnoporus sanguineus*.
22. **FAO (La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura),** Capacidades de pasta y papel. Encuesta 2012-2017, 2012
23. **FASSBENDER, H. 1982.** *Química de Suelos con énfasis en suelos de América Latina.* 3ra reimpression. IICA San José, Costa Rica. 422 p.
24. **FERNANDEZ LINARES LUIS CARLOS, ROJAS AVELIZAPA NORMA GABRIELA, ROLDÁN CARRILLO TERESA GUADALUPE, RAMÍREZ ISLAS MARTHA ELENA, ZEGARRA MARTINEZ HECTOR GUSTAVO, URIBE HERNÁNDEZ RAÚL, REYES ÁVILA ROMEO JESÚS, FLORES HERNÁNDEZ DAVID, ARCE ORTEGA JUAN MANUEL. 2006.** Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. Instituto Mexicano del Petróleo. México DF, México. 22p.

25. **GAITAN B. DIANA MARIA., PÉREZ P. LILIANA I.** Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Tesis de Pregrado. Carrera de Microbiología industrial, Pontificia universidad javeriana, Bogotá, 2007
26. **GILBERTSON, R & L. RYVARDEN. 1986.** North American Polypores. Fungiflora A/S. Oslo. 885 págs.
27. **GRAETZ, H. A., 1997.** *Suelos y Fertilización*. Traducido por: F. Luna Orozco. Trillas. México. 80 p
28. **GOW N. A. R., 1995.** –The Growing Fungus. London: N.A.R Gow & G. M. Gadd. 402p.
29. **GROS, A. Y DOMÍNGUEZ, A., 1992.** *Abonos guía práctica de la fertilización*. 8va. edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 450 p
30. **HONORATO SALAZAR, J AMADOR.** Determinación de componentes químicos de la madera de 5 especies de encino del estado de Puebla, Puebla, México, madera y bosque 4(2) 1998 pag 79-93
31. **HOYOS HURTADO, María Teresa, LÓPEZ SÁNCHEZ, Yanine Liliana, MEJÍA LARREA, Claudia Andrea Y ROJAS GAVIRIA, Juliet, 2000.** Aprovechamiento de los lodos primarios de las fábricas de papel. Medellín. UPB. p. 7
32. **HUDSON H., 1986.** - Fungal Biology. Maryland USA: Edward Arnolds Eds. 298p.
33. **JEAN-CLAUDE SIGOILLOT, JEAN-GUY BERRIN, MATHIEU BEY, LAURENCE LASAGE-MEESSEN, ANTHONY LEVASEUR, ANNE LOMASCOLO, ERIC RECORD, EVA UZAN-BOUKHRIS,** Fungal strategies for lignin degradation, Advances in botanical research, Vol 61, 2012.

- 34. JONG SC, BIRMINGHAM JM.** Medical benefits of the mushroom *Ganoderma*. *AdvApplMicrobiol* 1992; 37:101-34.
- 35. JUÁREZ URIBE, RAQUEL ANGÉLICA.** Reciclaje de lodos residuales de la industria del papel mediante lombricultura utilizando la especie “Lombriz roja californiana” *Eisenia foétida*. Lima, 2010, 105 h. Tesis (Magister Scientiae), Universidad Nacional Agraria La Molina. Escuela de Post-grado. Maestría en Ciencias Ambientales.
- 36. JULCA-OTINIANO ALBERTO; MENESES-FLORIÁN LILIANA; BLAS-SEVILLANORAÚL; BELLO-AMEZ SEGUNDO;** LA MATERIA ORGÁNICA, IMPORTANCIA Y EXPERIENCIA DE SU USO EN LA AGRICULTURA, Universidad Nacional Agraria La Molina, Depto. Fitotecnia. Apto. 456. La Molina. Lima
http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S071834292006000100009&script=sci_arttext IDESIA (Chile) Vol. 24 N° 1; 49-61, 15 de diciembre de 2012; 2006
- 37. JUSTUS VON LIEBIG. 1843.** En: Navarro Pedreño, J., Moral Herrero, Gómez Lucas y Mataix Beneyto., 1995. *Residuos orgánicos y agricultura*. Universidad de Alicante. Servicio de Publicaciones. 108 p
- 38. KIRK, T.K., FARRELL, R.L., 1987.** Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin. *Ann. Rev. Microbiol.* 41, 465-505.
- 39. KOCH ALMA, NARANJO BLANCA, PAEZ MARITZA,** Determinación de la actividad enzimática de lacasas y lignina peroxidasas de hongos degradadores de colorantes seleccionados para el tratamiento de aguas residuales de la industria textil, Laboratorio de microbiología, Escuela politécnica del ejército, México, 2010.
- 40. LARA M. A., RODRIGUEZ MALAVAR A. J., HOLMQUIST O., GONZALEZ A. M., BULLÓN J., PEÑALOZA N., ARAUJO E.** Black liquor lignin biodegradation by *Trametes elegans* Intl. *Biodet. Biodeg.* 2003, 52

41. **LIN Z.B.** Cellular and molecular mechanisms of immuno-modulation by *Ganoderma lucidum*. Journal of Pharmacological Sciences, 99 (2005), pp. 144–153
42. **MAGANHOTTO CM, SOARES SM, OLIVEIRA PR.** Ligninolytic enzyme production by *Ganoderma* spp. Enzyme Microbial Technol. 2005; 37:324-9. La descomposición de materia orgánica en humedales: la importancia del componente microbiano. [http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/7916/1/ECO_14\(2\)_04.pdf](http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/7916/1/ECO_14(2)_04.pdf)<http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?id=118>, 11 de diciembre de 2012 Ecosistemas 14 (2): 17-29. Mayo 2005
43. **MALDONADO ASTUDILLO YANYK IXCHEL.** Obtención de cepas híbridas de *pleurotus* spp por apareamiento de neohaplonpes compatibles, Instituto politécnico nacional, Mexico D.F, Agosto de 2007.
44. **MANUAL DE LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO DE SUELOS Y FOLIARES.** Universidad Tecnológica de Pereira. Segunda Versión, 2008. Pp 1-68
45. **MARCO-URREA, E., PÉREZ-TRUJILLO, M., VICENT, T., CAMINAL, G., 2009.** Ability of White-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. Chemosphere 74, 765-772.
46. **MARTINEZ Y. PEDRO N., GARZON C. JOHN E., HENAO E. WILDER., GUARNIZO F. ANDERSON.** Evaluación de la producción del hongo *Pleurotus ostreatus* cultivado sobre los residuos derivados de la producción comercial del culmo de la guadua *angustifolia Kunth*. Programa de Química, Universidad del Quindío. 2008
47. **MEIKLEJON, 1957. En: Wild, A. 1992.** Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas según Russell. Versión Española de P. Urbano Terrón y C. Rojo Fernández. Mundi-Prensa. Madrid. España, 1045 p

- 48. MIT TECHNOLOGY REVIEW.** Innovadores Menores de 35 Colombia [En Línea]. <<http://www.technologyreview.es/tr35colombia/profile.aspx?trid=1441>>. 2013
- 49. MOSQUERA OSCAR MARINO, RIOS ANYELA MARCELA, CORTES YENY JULIANA, NIÑO JAIME;** Contenido de azúcares y lignina en culmos de guadua y su estado de madurez, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira Risaralda.
- 50. MUSHWORLD,** Mushroom Growers' Handbook 1: Oyster Mushroom Cultivation, ISSN 1739-1377, Edited by MushWorld (non-profit organization), Published by MushWorld – Heineart Inc., Seoul, Korea. 298 pp. 2005.
- 51. NOVAES E.** Caracterização morfológica de Ganoderma asociado a espécies arbóreas do campus Luiz de Queiroz. 2004.
- 52. LIMÓN, R.I., PEÑAS, E., TORINO, M.I., MARTINEZ-VILLALUENGA, C., DUEÑAS, M., FRÍAS, J.** Fermentation enhances the content of bioactive compounds in kidney bean extract. Food Chemistry 172 (2015) 343-352.
- 53. ORTIZ MARTHA,** Macromicetos en zona rural de Villavicencio, Universidad de los llanos, Orinoquia 14(2) pag 125-132, 2010
- 54. PANDEY, A., SELVAKUMAR, P., SOCCOL, C.R., NIGAM, P., 1999.** Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. Current Science 77, 149e162.
- 55. PEÑA DE LA PARRA ANDREA,** Determinación de la capacidad de dos cepas de hongos basidiomycota para degradar celulosa, Facultad de ciencias Universidad Austral de Chile, Valdivia Chile, 2010.
- 56. POINTING S.B.** Feasibility of bioremediation by White-rot-fungis. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001; 57:20-33.

- 57.QUINCHÍA, ADRIANA MARÍA, VALENCIA, MARCO, GIRALDO, JORGEMARIO.** Uso de lodos provenientes de la industria papelera en la elaboración de paneles prefabricados para la construcción. Revista EIA, ISSN 1794-1237 (8): 9-19, Dic 2007.
- 58.RAMÍREZ ARISTIZÁBAL, LUZ STELLA (2005).** Manual de Microbiología. Universidad Tecnológica de Pereira.
- 59.RASTOGI. S., DWIVEDI. U.N.** Lignin genetic engineering for improvement of wood quality: Application in paper and textile industries, fodder and bioenergy production. *South African journal of Botany* 2014; 91:107-125.
- 60.RASTOGI. S., DWIVEDI. U.N.** Manipulation of lignin in plants with special reference to o-methyltransferase. *Plant Science* 2008; 174:264-277.
- 61.RODRÍGUEZ VALENCIA NELSON, ARAQUE FONSECA MARTHA LILIANA, PERDOMO PERDOMO FRANCENID.** Producción de los hongos comestibles Orellanas y Shiitake. Sección de Divulgación y Transferencia, Cenicafé, FNC. 2006.
- 62.SELVAM, K. SWAMINATHEN, F. & KEON-SANG C. (2003).** Decolourization of azo dyes and a dye industry effluent by white rot fungus *Thelephora* sp. Bioresource Technology, 88, 115-119. [Versión Electrónica]
- 63.SHIAO M.S.** Natural products of the medicinal fungus *Ganoderma lucidum*: Occurrence, biological activities, and pharmacological functions. The Chemical Record, 3 (2003), pp. 172–180
- 64.SILVA CMMS, SOARES DE MELO ITAMAR, DE OLIVEIRA PABLO ROBERTO.** Ligninolytic enzyme production by *Ganoderma* spp. Enzyme Microb Technol2005; 37:314-329.
- 65.SILVA CMMS, FAY EF, MELO IS.**Degradação do fungicida carbendazim por *Phanerochaete chrysosporium*. *Fitop Bras* 1996; 4:496-8.

- 66. SITARZ, ANNA K., MIKKELSEN, JØRN D., HØJRUP, PETER., MEYER, ANNE S.** Identification of a laccase from *Ganoderma lucidum* CBS 229.93 having potential for enhancing cellulose catalyzed lignocellulose degradation. EnzymeMicrobTechnol2013; 53:378-385.
- 67. SONGULASHVILI, G., ELISASHVILLI, V., WASSER, S.P., NEVO, E., HADAR, Y., 2007.** Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. *Enzyme and Microbial Technology* 41, 57e61.
- 68. SOUZA, C.G.M., TYCHANOWICZ, G.K., SOUZA, D.F., PERALTA, R.M., 2004.** Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds. *Journal of Basic Microbiology* 2, 129e136.
- 69. TECHNICAL ASSOCIATION FOR THE PULP AND PAPER INDUSTRIES.** Acid-insoluble in wood and pulp. TAPPI Test Method T 222 os-74. TAPPI Press. Atlanta. 1978.
- 70. THECNICAL ASSOCIATION FOR THE PULP AND PAPER INDUSTRIES, 1978,** Acid-insoluble in wood and pulp, TAPPI Test method T 222 os-74, TAPPI Press, Atlanta.
- 71. THOMPSON G., SWAIN J., FOSTER C. F. 2001.** The treatment of pulp and paper mill effluent: a review. 22
- 72. WANGS.Y., HSU M.L., HSU H.C., TZENG C.H., LEE S.S., SHIAO M.S., HO C.K.** The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. *International Journal of Cancer*, 70 (1997), pp. 699–705
- 73. WESENBERG D., KYRIAKIDES I., AGATHOS S. N.** White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotech. Adv.* 2003, 22

- 74. WORLDWATCH INSTITUTE**, 2004. La situación del mundo 2004. Icaria Editorial y Fuhem.
- 75. USNAYO, P.** “Optimización de Medios de Cultivo, para la producción de enzimas ligninolíticas, por cepas fúngicas aisladas del altiplano Boliviano”. La Paz, 2007. Trabajo de grado (Lic. en Bioquímica). Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. Disponible en el catálogo en línea de la Biblioteca de la Universidad Mayor de San Andrés: <<http://bibliotecadigital.umsa.bo>>
- 76. YAOVAPA, T., TORU. J., YOSHIMASA, M., SHIGEHARU, M., SAVITR, T., NAVAVARN, N., MORIYA, O & TOSHIKI, K (2005).** “Symbiotico Fungi Produce Laccases Potentially Involved in Phenol Degradation in Fungus Combs of Fungus Growing Termites in Thailand”. Environmental Molecular Biology Laboratory RIKEN. Saintana.Japan [VersiónElectrónica].
- 77. ZIMMERMANN, W.** Degradation of lignin by bacteria. Journal of Biotechnology 1990; pp119-130.
- 78. ZHEN Z, OBBARD JP.** Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by the white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. EnzymeMicrobTechnol 2002; 6038:1-7.

10. ANEXOS

ANEXO A. Curva de calibración de sacarosa para la determinación de Materia Orgánica inicial.

| Concentración | Absorbancia |
|---------------|-------------|
| blanco | 0,0000 |
| 5 | 0,1002 |
| 10 | 0,1221 |
| 15 | 0,1613 |
| 20 | 0,1715 |
| 25 | 0,2261 |
| M1 | 0,1451 |
| M2 | 0,1511 |
| M3 | 0,1462 |

| | %M O | SD |
|----------------------|------|------|
| Muestra de lodo puro | 6,5 | 0,15 |

Cálculos:

$$\% \text{ M.O} = -0,649 + (51,233 * \text{Abs}) - (16,307 * \text{Abs}^2)$$

$$\% \text{ M.O}_{M1} = 6,4$$

$\%M.O_{M2}=6,7$

$\%M.O_{M3}=6,5$

ANEXO B. Determinación de Materia Orgánica final, semana 8

| Inoculo | Réplica | A (semana 8) | %M O | %M.O promedio por concentración | Desviación estándar (SD) |
|---------|---------|--------------|------|---------------------------------|--------------------------|
| 10 | 1 | 0,1506 | 6,7 | | |
| 10 | 2 | 0,1565 | 7,0 | | |
| 10 | 3 | 0,1536 | 6,8 | 6,8 | 0,15 |
| 20 | 1 | 0,1650 | 7,4 | | |
| 20 | 2 | 0,1615 | 7,2 | | |
| 20 | 3 | 0,1650 | 7,4 | 7,3 | 0,12 |
| 30 | 1 | 0,1906 | 8,5 | | |
| 30 | 2 | 0,1883 | 8,4 | | |
| 30 | 3 | 0,1895 | 8,5 | 8,5 | 0,06 |

ANEXO C. Registro de los datos tomados cada semana (HUMEDAD)

| Inóculo | Semana | %Humedad | Desviación estándar |
|---------|--------|----------|---------------------|
| 0 | 0 | 53,0 | 0,93 |
| 10 | 3 | 53,6 | 0,28 |
| 20 | 3 | 52,6 | 0,49 |
| 30 | 3 | 53,2 | 0,67 |
| 10 | 5 | 52,7 | 0,59 |
| 20 | 5 | 52,6 | 0,40 |
| 30 | 5 | 53,1 | 0,55 |
| 10 | 7 | 52,3 | 0,71 |
| 20 | 7 | 52,3 | 0,21 |

| | | | |
|----|---|-------------|------|
| 30 | 7 | 52,0 | 0,24 |
| 10 | 8 | 52,3 | 0,26 |
| 20 | 8 | 53,0 | 0,38 |
| 30 | 8 | 53,0 | 0,50 |
| | | 52,7 | |

| inoculo | replicas | semana | %lignina | %Lignina prom. | Desviación estándar |
|---------|----------|--------|----------|----------------|---------------------|
| 0 | 1 | 0 | 61,01 | | |
| 0 | 2 | 0 | 59,31 | | |
| 0 | 3 | 0 | 60,16 | 60,2 | 0,85 |
| 10 | 1 | 3 | 57,87 | | |
| 10 | 2 | 3 | 59,20 | | |
| 10 | 3 | 3 | 58,20 | 58,4 | 0,69 |
| 20 | 1 | 3 | 54,07 | | |
| 20 | 2 | 3 | 55,80 | | |
| 20 | 3 | 3 | 56,74 | 55,5 | 1,35 |
| 30 | 1 | 3 | 59,70 | | |
| 30 | 2 | 3 | 56,15 | | |
| 30 | 3 | 3 | 58,34 | 58,1 | 1,79 |
| 10 | 1 | 5 | 57,00 | | |
| 10 | 2 | 5 | 58,00 | | |
| 10 | 3 | 5 | 56,30 | 57,1 | 0,85 |
| 20 | 1 | 5 | 50,00 | | |
| 20 | 2 | 5 | 53,00 | | |
| 20 | 3 | 5 | 54,90 | 52,6 | 2,47 |
| 30 | 1 | 5 | 59,00 | | |
| 30 | 2 | 5 | 55,10 | | |
| 30 | 3 | 5 | 57,46 | 57,2 | 1,96 |
| 10 | 1 | 7 | 50,48 | | |
| 10 | 2 | 7 | 49,61 | | |
| 10 | 3 | 7 | 51,40 | 50,5 | 0,90 |
| 20 | 1 | 7 | 42,80 | | |
| 20 | 2 | 7 | 49,46 | | |
| 20 | 3 | 7 | 44,60 | 45,6 | 3,45 |
| 30 | 1 | 7 | 45,20 | | |
| 30 | 2 | 7 | 47,60 | | |

| | | | | | |
|----|---|---|-------|------|------|
| 30 | 3 | 7 | 46,50 | 46,4 | 1,20 |
| 10 | 1 | 8 | 45,05 | | |
| 10 | 2 | 8 | 45,74 | | |
| 10 | 3 | 8 | 46,52 | 45,8 | 0,74 |
| 20 | 1 | 8 | 37,34 | | |
| 20 | 2 | 8 | 39,60 | | |
| 20 | 3 | 8 | 40,10 | 39,0 | 1,47 |
| 30 | 1 | 8 | 28,50 | | |
| 30 | 2 | 8 | 30,80 | | |
| 30 | 3 | 8 | 29,90 | 29,7 | 1,16 |

ANEXO D. Tablas de Análisis del porcentaje de lignina degradada por cada inóculo en las 8 semanas.

| Inóculo | semana | %lignina inicial | %lignina | Desviación estándar | %lignina degradado |
|---------|--------|------------------|----------|---------------------|--------------------|
| 0 | 0 | 60,16 | 60,16 | 0,85 | 0 |
| 10 | 3 | 60,16 | 58,42 | 0,69 | 1,74 |
| 10 | 5 | 60,16 | 57,10 | 0,85 | 3,06 |
| 10 | 7 | 60,16 | 50,50 | 0,90 | 9,66 |
| 10 | 8 | 60,16 | 45,77 | 0,74 | 14,39 |

| Inóculo | semana | %lignina inicial | %lignina | Desviación estándar | %lignina degradado |
|---------|--------|------------------|----------|---------------------|--------------------|
| 0 | 0 | 60,16 | 60,16 | 0,85 | 0 |
| 20 | 3 | 60,16 | 55,54 | 1,35 | 4,62 |
| 20 | 5 | 60,16 | 52,63 | 2,47 | 7,53 |
| 20 | 7 | 60,16 | 45,62 | 3,45 | 14,54 |
| 20 | 8 | 60,16 | 39,01 | 1,47 | 21,15 |

| Inóculo | semana | %lignina inicial | %lignina | Desviación estándar | %lignina degradado |
|---------|--------|------------------|----------|---------------------|--------------------|
| 0 | 0 | 60,16 | 60,16 | 0,85 | 0 |
| 30 | 3 | 60,16 | 58,06 | 1,79 | 2,10 |
| 30 | 5 | 60,16 | 57,19 | 1,96 | 2,97 |
| 30 | 7 | 60,16 | 46,43 | 1,20 | 13,73 |
| 30 | 8 | 60,16 | 29,73 | 1,16 | 30,43 |