

**Determinación de parámetros cinéticos y pruebas preliminares de tratabilidad
para colorantes y metales empleando una cepa de *Ganoderma lucidum***



**VIVIANA GONZÁLEZ RUEDA
CAROLINA HERRERA RODRÍGUEZ**

**TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial para optar al título de
MICROBIOLOGA INDUSTRIAL**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA
Bogotá D.C.
Mayo 31 de 2011.**

**Determinación de parámetros cinéticos y pruebas preliminares de tratabilidad
para colorantes y metales empleando una cepa de *Ganoderma lucidum***



**VIVIANA GONZÁLEZ RUEDA
CAROLINA HERRERA RODRÍGUEZ**

APROBADO

**INGRID SCHULLER Ph. D.
BIÓLOGA
DECANA ACADEMICA**

**JANETH ARIAS PALACIOS M.Sc M.Ed
BACTERIÓLOGA
DIRECTORA CARRERA**

**Determinación de parámetros cinéticos y pruebas preliminares de tratabilidad
para colorantes y metales empleando una cepa de *Ganoderma lucidum***



**VIVIANA GONZÁLEZ RUEDA
CAROLINA HERRERA RODRÍGUEZ**

APROBADO

**AURA M. PEDROZA PhD
BACTERIÓLOGA
DIRECTORA**

**MARÍA XIMENA RODRÍGUEZ PhD
MICROBIÓLOGA
CODIRECTORA**

**IVONNE GUTIÉRREZ M. Sc
BACTERIÓLOGA
JURADO**

NOTA DE ADVERTENCIA

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus tesis. Solo velara porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque la tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ella el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de Julio de 1946

AGRADECIMIENTOS

- A Dios, por la fortaleza y sabiduría que nos brindó durante el desarrollo de este trabajo.
- A nuestros padres y hermanos, por su apoyo, amor incondicional y por motivarnos para continuar con nuestras metas a pesar de los momentos difíciles.
- A Aura M. Pedroza, por su excelente dirección, apoyo, conocimiento, compromiso y confianza, que nos brindó en todo momento.
- A María Ximena Rodríguez por su compromiso, conocimiento y apoyo.
- A Balkys Quevedo por su apoyo y conocimiento.
- A nuestros compañeros de laboratorio por su amistad, apoyo, y alegría durante este tiempo.
- A Todas aquellas personas que ocupan un lugar en nuestro corazón pues fueron de vital importancia en este proceso. Gracias por su paciencia, amor, amistad, y compañía.
- A los laboratorios de Microbiología Ambiental y Suelos, Biotecnología Aplicada, y UNIDIA, por permitirnos desarrollar nuestra tesis.
- A la Pontificia Universidad Javeriana por proporcionarnos las condiciones necesarias para desarrollar nuestras metas.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	
1. INTRODUCCION	8
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION	8
2.1 Planteamiento del problema	8
2.2 Justificación	8
3. MARCO TEORICO	9
3.1. Hongos de podredumbre blanca	9
3.2. <i>Ganoderma lucidum</i>	9
3.3. Contaminantes de efluentes industriales	10
3.3.1 Colorantes	10
3.3.2 Metales pesados	11
3.4 Mecanismos biológicos de degradación de contaminantes	11
3.4.1 Acción enzimática de <i>Ganoderma lucidum</i>	11
3.4.2 Bioadsorción	12
4. OBJETIVOS	13
4.1 Objetivo General	13
4.2 Objetivos Específicos	13
5. MATERIALES Y MÉTODOS	13
5.1 Pruebas preliminares de crecimiento y decoloración en medios sólidos bajo condiciones ligninolíticas y no ligninolíticas	13
5.1.1 Crecimiento de <i>Ganoderma lucidum</i> bajo dos condiciones nutricionales	13
5.1.2 Crecimiento y decoloración en dos diferentes condiciones nutricionales suplementadas con colorantes y metales pesados	14
5.2 Determinación de parámetros cinéticos de crecimiento de <i>Ganoderma lucidum</i> bajo condiciones ligninolíticas en fermentación discontinua a escala erlenmeyer	14
5.2.1 Inoculación de erlenmeyers	14
5.2.2. Cuantificación de biomasa	14
5.2.3 Concentración de azúcares reductores	14
5.2.4 Concentración de glucosa	14
5.2.5 Actividad enzimática	15
5.2.5.1 Cuantificación de lacasa	15
5.2.5.2 Cuantificación de lignina peroxidasa	15
5.2.5.2 Cuantificación de manganeso peroxidasa	15
5.3 Curvas de remoción de dos colorantes (trifenilmetanos) y un metal pesado (iones de cromo) con biomasa viable e inactiva	15
6. RESULTADOS Y DISCUSION	16
6.1 Pruebas de crecimiento y decoloración en medios sólidos	16
6.2 Determinación de parámetros cinéticos de crecimiento de <i>Ganoderma lucidum</i> bajo condiciones ligninolíticas en fermentación discontinua a escala Erlenmeyer	19
6.3 Curvas de remoción de dos colorantes (trifenilmetanos) y un metal (dicromato de potasio) con biomasa viable e inactiva	21
7. CONCLUSIONES	28
8. RECOMENDACIONES	28
9. BIBLIOGRAFIA	29
10. ANEXOS	34

RESUMEN

Los hongos de podredumbre blanca son conocidos por degradar la lignina y ciertos compuestos tóxicos presentes en aguas residuales, debido a que producen enzimas hidrolíticas y oxidativas con baja especificidad por el sustrato.

Ganoderma lucidum, es un basidiomiceto perteneciente a la familia *Ganodermataceae*, ampliamente estudiado por sus propiedades antitumorales, antioxidantes etc., además de su importancia en biorremediación por las enzimas ligninolíticas que produce. Debido a esto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de remoción de colorantes y metales pesados empleando *G. lucidum*, bajo dos condiciones nutricionales obtenidas a partir de dos medios de cultivo, extracto salvado de trigo y Radha, obteniendo un crecimiento miceliar de $71,75 \pm 2,95$ mm y $26,2 \pm 3,4$ mm respectivamente, a los 8 días de incubación, a 27°C . Tomando como base estos resultados, la cepa se inoculó en caldo extracto de salvado, para evaluar parámetros de crecimiento (g L^{-1} de biomasa, pH, consumo de glucosa, consumo de azúcares reductores totales, enzimas como Lacasa, LiP y MnP) durante 15 días, obteniendo en el día 13; $5,53 \text{g L}^{-1}$ de biomasa, disminución en el pH (4,40), consumo de glucosa y azúcares reductores. Con respecto a la producción de enzimas ligninolíticas, no se cuantificó manganoso peroxidasa ni lignina peroxidasa; pero se observó alta producción de lacasa ($770,4 \text{U L}^{-1}$) en el día 13.

Finalmente se evaluó el crecimiento y decoloración en medios sólidos suplementados con los respectivos colorantes y metales pesados, a 50mg L^{-1} ; encontrando crecimiento en todos los tratamientos que tenían como base el extracto de salvado, excepto en el de cloruro de mercurio, además se observaron halos de decoloración de $35,6 \pm 3,33$ mm (verde malaquita) y $22,2 \pm 1,35$ mm (cristal violeta) después de 8 días de incubación. Por lo contrario no se evidenció crecimiento y decoloración en agar Radha. Teniendo en cuenta lo anterior, se inoculó la cepa en caldo extracto salvado de trigo suplementado con cristal violeta, verde malaquita (50mg L^{-1}) y dicromato de potasio (100mg L^{-1}), para evaluar de igual forma los parámetros de crecimiento, durante 24 días, para la biomasa viable y se realizó un estudio complementario para biomasa inactiva, ambos con un pH inicial de 6,5.

Con biomasa viable el incremento de la biomasa no fue cuantificable con las técnica utilizada, sin embargo se observó una disminución en la concentración de cristal violeta (48%) y verde malaquita (69%) lo que tiene relación con la producción de lacasa ($4,30 \text{U L}^{-1}$ y $2,52 \text{U L}^{-1}$, respectivamente), con un pH final, de aproximadamente 6,30 para los dos colorantes. En el medio suplementado con dicromato de potasio la biomasa final fue de $17,9 \text{g L}^{-1}$, con un pH (pH= 4,0) y un aumento de concentración del metal de 280 a 940mg L^{-1} , asociado posible con un fenómeno de desorción de Cr (III) por la disminución del pH.

Con biomasa inactiva se obtuvo un pH de 6,33 y 6,11 en ambos colorantes y una disminución de concentración de cristal violeta (55, 6%), verde malaquita (65,5%) y dicromato de potasio (29,1%). De acuerdo con estos resultados *G. lucidum* crece en todos los contaminantes evaluados (50mg L^{-1}), exceptuando cloruro de mercurio. Por otro lado, es capaz de remover cristal violeta, verde malaquita y dicromato de potasio con porcentajes de decoloración superiores al 45% asociado a alta producción de lacasa y procesos de adsorción a la pared fúngica.

Palabras clave: *Ganoderma lucidum*, enzimas ligninolíticas, colorantes azóicos, colorantes trifenilmetános, metales pesados.

1. INTRODUCCIÓN

En el proceso de elaboración de productos industriales (textiles, cueros etc.) se generan sustancias tóxicas que son vertidas en cuerpos de agua, produciendo efectos adversos sobre el medio ambiente y la salud humana, pues además de las enfermedades que causan en los seres vivos, modifican el aspecto del agua y la disolución del oxígeno, entre otros **(1)**.

Existen diversos mecanismos utilizados en tratamiento de aguas residuales, donde se incluyen procesos físicos, químicos y/o biológicos. Los tratamientos biológicos han sido reconocidos por ser métodos eficientes para la degradación y remoción de colorantes, plaguicidas y metales pesados, donde se emplean hongos de podredumbre blanca ya que sintetizan enzimas extracelulares, como la lacasa, lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa.

El mecanismo de estas enzimas está basado en la producción de radicales libres, que son catalíticamente activos sobre una gran diversidad de sustratos orgánicos; la lignina peroxidasa es relativamente inespecífica en sus sustratos reductores, ya que puede oxidar compuestos aromáticos de alto potencial redox tales como el alcohol veratrílico, metoxibencenos y modelos diméricos no fenólicos de lignina. Por el contrario la MnP es específica en sus sustratos reductores y solamente el Mn^{2+} puede completar eficientemente su ciclo catalítico **(2)**. La enzima lacasa contiene un centro activo compuesto por cuatro átomos de cobre, que utiliza el oxígeno molecular para oxidar diversos compuestos aromáticos y no aromáticos, no requiere peróxido de oxígeno para la oxidación de los sustratos **(3)**.

Este trabajo hace parte del proyecto "Caracterización de parámetros cinéticos y enzimáticos de *Ganoderma lucidum* bajo condiciones ligninolíticas y no ligninolíticas", dirigido por el grupo de investigación del Laboratorio de Microbiología ambiental.

El objetivo es evaluar los parámetros cinéticos y enzimáticos de una cepa de *Ganoderma lucidum* bajo condiciones dadas por un medio químicamente definido y uno complejo.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

2.1 Planteamiento del problema

¿La cepa evaluada de *Ganoderma lucidum* es capaz de crecer y producir enzimas ligninolíticas bajo dos condiciones nutricionales, y esta biomasa activa y/o inactiva podrá ser utilizada con fines de biorremediación?

2.2 Justificación

El incremento en el número de industrias (textiles, farmacéuticas, alimentarias, curtiembres, cosméticas) ha causado gran impacto a nivel ambiental, pues a partir de los procesos productivos que llevan a cabo las empresas se generan residuos químicos que en altas concentraciones, afectan cuerpos de agua, suelo y aire, causando efectos adversos en los ecosistemas y en humanos.

La necesidad de implementar sistemas capaces de reducir dicho impacto ha sido una de las mayores preocupaciones en el ámbito científico, pues los sistemas químicos y físicos han sido muy utilizados, sin embargo los altos costos **(4)** y los sub-productos generados, ha promovido el uso de microorganismos capaces de degradar y adsorber gran parte de estos compuestos contaminantes, a un menor costo y ambientalmente sostenible. La capacidad de algunos hongos de podredumbre blanca para degradar colorantes, compuestos orgánicos recalcitrantes, herbicidas, entre otros, se debe principalmente a la producción de enzimas ligninolíticas extracelulares no específicas, entre las que se encuentran lacasa, LiP y MnP, que pueden oxidar varios compuestos estructuralmente similares a la lignina **(5)**.

Dentro de los organismos capaces degradar dichos compuestos se encuentran los hongos de podredumbre blanca como *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete*

chryso sporium, *Trametes versicolor*, *Ganoderma lucidum* entre otros. Por esta razón el objetivo de este estudio fue evaluar parámetros cinéticos, enzimáticos y la posible aplicación a nivel ambiental para degradación y/o, adsorción de colorantes y metales pesados a partir de una cepa de *Ganoderma lucidum* proveniente del cepario de la Pontificia Universidad Javeriana.

3 MARCO TEÓRICO

3.1 Hongos de podredumbre blanca

Los hongos de podredumbre blanca son los degradadores más efectivos de polímeros complejos presentes en la naturaleza, como la lignina (7). La degradación de este polímero se da durante el metabolismo secundario con el fin de tener acceso a los polisacáridos de la madera, proporcionando así una fuente de energía a otros organismos que no tienen dicho acceso. Los estudios con *P. chryso sporium* demostraron lo anterior, y además indican que esto sucede por el agotamiento de nutrientes como nitrógeno, carbono o azufre (8).

Estos basidiomicetos han desarrollado gran interés en biorremediación, debido a la capacidad que tienen de degradar una amplia gama de sustancias persistentes y tóxicas encontradas en el medio ambiente; además de caracterizarse por ser ubicuos y crecer en sustratos baratos (7,9).

3.2 *Ganoderma lucidum*

Es un basidiomiceto perteneciente a la familia *Ganodermataceae*, utilizado como medicina tradicional en el oriente durante más de 2000 años (10). El basidiocarpo de *G. lucidum* puede ser estipitado o sésil y varía de un color rojo a negro, se utiliza para tratar enfermedades como úlcera gástrica, hepatitis crónica, nefritis, hipertensión, hiperlipemia, artritis, insomnio, bronquitis, asma, arteriosclerosis, leucopenia, diabetes, anorexia y cáncer. Debido a que *G. lucidum* produce fracciones de polisacáridos que contienen glucanos -d-(1 → 3), a veces ramificados en la posición C-6, que muestran alta actividad anti-tumoral y pueden ser los responsables de actividades biológicas mencionadas anteriormente (10, 11).

La mayoría de estudios con *G. lucidum* se relacionan con sus propiedades medicinales y farmacológicas. Sin embargo, algunas investigaciones han explorado el uso de este hongo y sus enzimas en la degradación de xenobióticos, incluidos los colorantes y compuestos orgánicos. Entre las principales enzimas extracelulares que participan en la degradación de la lignina, la lacasa parece ser la principal enzima producida por este microorganismo, aunque manganeso peroxidasa también se ha encontrado con baja actividad. Además se ha evaluado en otros estudios la capacidad de la lacasa para remover colorantes azo y antraquinónicos, así como los efectos del pH y la temperatura sobre la eficiencia de dicha decoloración (12).

Estas enzimas se caracterizan por ser relativamente inespecíficas y extracelulares, como por ejemplo la lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y la lacasa. Las ligninas peroxidasa son de especial interés, ya que estas enzimas, a diferencia de otras peroxidases, tienen un potencial de oxidación-reducción muy alto y, pueden oxidar xenobióticos que no son atacados por otras peroxidases (8).

La capacidad de los hongos de podredumbre blanca para degradar la lignina les confiere cierta ventaja en procesos de biorremediación, frente a las bacterias, por la similitud de este polímero a algunos compuestos contaminantes (13).

El ciclo de vida de *G. lucidum* presenta una fase vegetativa en la cual hay desarrollo de micelio primario, secundario, y terciario. El micelio primario (n), es monocariótico y se forma a partir de la germinación de las basidiosporas. Los micelios secundarios (n + n) son dicarióticos y se forman por la fusión de las hifas monocarióticas

compatibles; para mantener la condición dicariónica, se forman estructuras en forma de grapa (fíbulas) donde migran los núcleos de un septo a otro. El micelio terciario se genera cuando las hifas crecen, se diferencian y forman las estructuras reproductivas (basidios), que luego aumentan de tamaño para después liberar las basidiosporas, y volver a comenzar el ciclo **(14)**. En general los basidiomicetos tienen dos fases reproductivas: sexual o asexual, sin embargo cuando se encuentra en medios sólidos el hongo presenta reproducción asexual **(15,16)**.

3.3 Contaminantes de efluentes industriales

3.3.1 Colorantes

Los colorantes son sustancias que al ser aplicadas a un sustrato le imparten color. Estos son retenidos en el sustrato por absorción, retención mecánica, o por un enlace iónico o covalente; los colorantes son usados comúnmente en textiles y papel **(17)**.

La propiedad química del colorante está condicionada por la presencia de grupos llamados cromóforos en la molécula (cromo= color, foro= portador) unidos a grupos bencénicos, los principales grupos cromóforos son el azo, carbonilo, nitro, tiocarbonilo, entre otros. Estos grupos funcionales que se encuentran en las moléculas, y sus diferentes posiciones son los que determinan el color, dando un tono u otro. De igual forma los colorantes están compuestos por auxocromos, que aunque por sí solos no le producen color a una molécula, en conjugación con un cromóforo, aumentan la intensidad del color **(17)**.

Los colorantes se pueden clasificar según su composición química, en base a su grupo cromóforo principal, en azo, antraquinónicos, triarilmetanos, nitroso, nitro, santeño, quinoleína, metino, acridina, azufre, tiazol, tiamina, indamina, azina, oxacina, estilbenos, diarilmetano, lactona, indigoide o ftalocianina **(18)**.

Teniendo en cuenta los colorantes utilizados en esta investigación se discutirá de los colorantes triarilmetanos y azóicos.

Los colorantes triarilmetanos se clasifican a su vez en trifenilmetanos, difenilnaftilmetanos, y varios derivados trifenilmetanos. Los trifenilmetanos constituyen una de las más antiguas clases de colorantes sintéticos. Son de color brillante, de alta resistencia, relativamente baratos, y se pueden aplicar a una amplia gama de materias primas, como algodón, lana entre otras. Sin embargo, son muy deficientes en ciertos materiales sólidos, sobre todo en contacto con la luz y lavado. Algunos colorantes pertenecientes a los trifenilmetanos son el verde malaquita, cristal violeta, fuscina etc. El número, la naturaleza, y la posición de los sustituyentes determinan tanto el tono o el color del tinte y la clase de aplicación a la que pertenece el medio de contraste **(19)**.

El verde malaquita es un colorante trifenilmetano, que al estar compuesto por aminas primarias y tener un grupo cromóforo de estructura quinoide presenta un efecto batocrómico fuerte, lo que incrementa su longitud de onda; teniendo un máximo de absorción de 619nm **(20,21) ANEXO 1A**. Este colorante se utiliza ampliamente en la industria textil y en la piscicultura como biocida; además se ha demostrado que es tóxico para los seres vivos, ya que en los bioensayos realizados por Monroy y colaboradores en 2005, se encontró que en concentraciones desde 0,0728 hasta 7,430 mg/L puede causar un efecto letal (CL₅₀) en peces **(22)**. Aunque, es utilizado para el control de infecciones por hongos y ectoparásitos en la industria acuicultura está prohibido su uso en EEUU por ser cancerígeno **(21)**.

El cristal violeta es un colorante sintético, básico, catiónico, e imparte coloración violeta a una solución acuosa y absorbe en una longitud de onda de 586nm **(23) ANEXO 1B**. Los colorantes catiónicos son más tóxicos que los colorantes aniónicos, ya que estos pueden interactuar negativamente con las membranas celulares, y entrar

en las células acumulándose en el citoplasma. Este trifenilmetano es ampliamente utilizado en las industrias textiles, como agente biológico en manchas dermatológicas, medicamentos veterinarios, aditivos para alimentación de las aves de corral, y para inhibir la propagación de bacterias dañinas. Este colorante es citotóxico, mutagénico y cancerígeno en las células de mamíferos, ya que induce apoptosis o necrosis celular **(23,24)**. Respecto a la estructura del colorante, la sustitución de los átomos de hidrógeno orto por grupos metilo, del átomo de carbono central en cristal violeta, presenta igual que el verde malaquita un grupo cromóforo de estructura quinoide, dando lugar a un efecto batocrómico uniforme (en unos 8nm por grupo metilo) **(19)**

Por último se encuentran los colorantes azóicos (NR5), que se caracterizan por la presencia de uno o más enlaces azo ($N-N=N$), y son formados por un acoplamiento diazotizado de aminas aromáticas con una amina del compuesto fenólicos o aromáticos **ANEXO 1C**. Fuera de 2000 colorantes sintetizados hasta la fecha, más de 500 se basan en aminas cancerígenas. Estos colorantes son utilizados en productos textiles y de cueros, entre otros. Estos son más utilizados en industrias textiles por su rapidez en la aplicación en las telas, gran estabilidad a la luz y resistencia al ataque microbiano. Sin embargo, tiene un problema, ya que presentan bajos niveles de unión con la tela, por lo tanto se pierde entre el 10- 20% del colorante en el proceso de tintura junto con otros químicos **(25)**.

3.3.2 Metales pesados

Los metales pesados son elementos que tienen pesos atómicos entre 63,5 y 200,6, y un peso específico superior a 5,0. Son provenientes de industrias, tales como las de instalaciones de metal cromado, las operaciones mineras, industrias de fertilizantes, curtiembres, producción de baterías, industrias de papel, pesticidas, etc. A diferencia de los contaminantes orgánicos, los metales pesados no son biodegradables y tienden a acumularse en los organismos vivos y muchos de los iones son conocidos por ser tóxicos o cancerígenos. Al ser los metales pesados tóxicos surge una gran preocupación en el tratamiento de aguas residuales provenientes de estas industrias de metales. Los metales pesados más encontrados en dichos vertimientos son el zinc, cobre, níquel, mercurio, cadmio, plomo y cromo. Siendo el mercurio una neurotoxina que puede causar daños al sistema nervioso central. Altas concentraciones de mercurio en humanos, causa insuficiencia pulmonar y renal, dolor en el pecho y disnea. El plomo puede causar daño en el sistema nervioso central, en el riñón, el hígado el sistema reproductivo, y funciones del cerebro. Los síntomas tóxicos son la anemia, insomnio, dolor de cabeza, mareos, irritabilidad, debilidad de los músculos, alucinaciones y daños renales. Con respecto al cromo, tiene principalmente salida al medio acuático en dos estados: Cr (III) y Cr (VI). En general, Cr (VI) es más tóxico que el Cr (III), ya que afecta la fisiología humana, se acumula en la cadena alimentaria y causa graves problemas de salud que van desde la simple irritación de la piel a carcinomas en el pulmón **(26)**.

3.4 Mecanismos biológicos de degradación de contaminantes

3.4.1 Acción enzimática de *Ganoderma lucidum*

-La lacasa (benzenediol: oxígeno oxidoreductasa) es una enzima secretada por Basidiomycetes, Ascomycetes y Deuteromycetes; que puede ser inducida por anilinas, ácidos metoxifenólicos, preparaciones de lignina o choques térmicos en ciertas cepas de hongos (20). Esta enzima no sólo oxida ácidos fenólicos y metoxifenólicos, sino que también reacciona con polifenoles y otros compuestos aromáticos derivados de la lignina.

La lacasa contiene un grupo de cuatro átomos de cobre en el sitio activo, en estado de oxidación +2. El ciclo catalítico inicia con la oxidación del sitio activo por el oxígeno o compuestos aromáticos, generando un intermediario deficiente de electrones, el cual lo oxida nuevamente el O₂ o sustratos fenólicos. El ciclo es completado después de cuatro oxidaciones, permitiendo que la enzima vuelva a su estado relajado **(28)**

ANEXO 2A.

Existen diferentes enzimas que cooperan con la lacasa para la degradación de la lignina y estructuras fenólicas similares entre estas se encuentran la Glioxal oxidasa, Alcohol aryl oxidasa, Glucosa oxidasa etc. **(27)**. Con respecto al pH óptimo de estas enzimas, puede variar de 3 a 7 con un intermedio de 4,5, y es completamente estable a una temperatura de 37 °C **(29)**.

- La manganeso peroxidasa se descubrió en cultivos de *Phanerochaete chrysosporium*, es extracelular, glicosilada y contiene un grupo hemo como sitio activo. Esta enzima tiene pesos moleculares de 40-48 kDa y PIs entre 2,9 y 7.0.

El ciclo catalítico de la manganeso peroxidasa inicia cuando el centro activo es oxidado por el peróxido de hidrogeno, generando un intermediario deficiente de un par de electrones (componente I). En esta primera reacción el Mn⁺² es también oxidado a Mn⁺³, donde los iones de Mn⁺³ se estabilizan con un alto potencial redox, a través de la formación de los ácidos orgánicos quelantes como el oxalato, malonato, malato, tartrato, o lactato. El Mn⁺³ quelado, a su vez actúa como mediador redox y oxida lignina y compuestos aromáticos, permitiendo nuevamente la reducción de Mn⁺³ a Mn⁺², pues este ión o los sustratos fenólicos, reducen el componente I, formando el componente II. El ciclo se completa cuando el componente II gana electrones. **(27,28)**

Por otra parte, esta enzima es la única que tiene la capacidad para degradar sustancias aromáticas, incluyendo la lignina, directamente a dióxido de carbono (CO₂). Además se ha demostrado que genera H₂O₂ en la oxidación de ciertos tioles e incluso es capaz de actuar eficazmente en la ausencia de H₂O₂ por oxidación externa de ácidos orgánicos (por ejemplo, oxalato, malonato, malato) en reacciones autocatalíticas **(27) ANEXO 2B.**

-La lignina peroxidasa fue descubierta también en cultivos de *Phanerochaete chrysosporium*. Su masa molecular varía entre 38 y 47 kDa y requiere necesariamente peróxido de hidrógeno (H₂O₂) para ser activada, el cual es generado por otras enzimas. La enzima presenta un grupo hemo en el sitio activo, catalizando la oxidación de varios compuestos relacionados con la lignina, como el alcohol veratrílico y sustancias con aldehídos o cetonas como grupo funcional. Esta enzima tiene el mismo ciclo catalítico que el de la manganeso peroxidasa, exceptuando los sustratos reductores involucrados y que no es dependiente de Mn⁺² **(2)**.

La actividad de la lignina peroxidasa es óptima cuando se encuentra en pH entre 2.5 y 3.0; con un PI de 3-5 **(27)**.

Dado que la lignina degradada por la lignina peroxidasa, proporciona un sustrato para la lacasa, ambas enzimas pueden ser considerados como "socias" en algunas rutas de biotransformación de la lignina **(27) ANEXO 2C.**

3.4.2 Bioadsorción

Es el proceso en donde una sustancia química es adsorbida por la biomasa microbiana (viva o muerta). El uso de la biomasa inactiva tiene ciertas ventajas, especialmente si el agua a tratar tiene alto contenido de contaminantes tóxicos. En este proceso interviene una fase adsorbente y un adsorbato (compuesto que se adhiere). De acuerdo a la afinidad del sorbente por el sorbato, este es atraído hacia el sólido y entrelazado por diferentes mecanismos **(30)**.

El proceso de bioadsorción llevado a cabo con biomasa fúngica se da principalmente por los componentes de la pared celular, pues contiene gran cantidad de polisacáridos

como la quitina y proteínas que favorecen este proceso. Estos componentes secuestran los iones metálicos y además pueden cambiar durante el crecimiento del micelio, variando la capacidad de adsorción con la edad de la célula.

Adicionalmente, la pared celular de los hongos tiene ligandos como los carboxilatos y/o fosfatos, los cuales participan activamente junto con los grupos funcionales hidroxilo y amida, para formar enlaces débiles con iones metálicos. Por esta razón el intercambio de iones puede ser el principal mecanismo para el secuestro de metales durante la adsorción **(29)**.

El metabolismo del hongo influye de igual manera en la remoción de metales pesados, la liberación de metabolitos que se unen a los iones metálicos, pueden llevar a una menor adsorción, siempre y cuando el pH se mantenga constante **(29)**.

Existen tres tipos de adsorción según la atracción entre el soluto y el adsorbente: de tipo electrónico, de Van der Waals o de naturaleza química. El tipo electrónico es un proceso mediante el cual los iones de una sustancia se concentran en una superficie como resultado de la atracción electrostática. La adsorción asociada a fuerzas de Van der Waals es una adsorción física, donde la molécula adsorbida no está fija en un lugar específico de la superficie, sino que es libre de trasladarse dentro de la interfase. Esta adsorción, en general, predomina a temperaturas bajas. Finalmente, cuando el adsorbato sufre una interacción química con el adsorbente, el fenómeno se llama adsorción química, adsorción activa o quimisorción. Esta adsorción suele estar favorecida a una temperatura elevada **(30)**.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Determinar los parámetros de crecimiento y perfil enzimático de *Ganoderma lucidum* bajo dos condiciones nutricionales establecidas por un medio químicamente definido y uno complejo; a fin de evaluar su aplicabilidad a nivel ambiental.

4.2 Objetivos Específicos

- Evaluar el crecimiento micelial y la decoloración de *Ganoderma lucidum* en un medio complejo y uno químicamente definido.
- Caracterizar el perfil de producción enzimática de la cepa de *Ganoderma lucidum* bajo un medio complejo.
- Realizar estudios preliminares de tratabilidad con biomasa viable e inactiva de compuestos contaminantes, entre ellos: metales pesados y colorantes.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Pruebas preliminares de crecimiento y decoloración en medios sólidos bajo dos condiciones nutricionales establecidas por un medio químicamente definido y uno complejo

5.1.1 Crecimiento de *Ganoderma lucidum* bajo dos condiciones nutricionales

Ganoderma lucidum se obtuvo de la Unidad de Investigaciones Agropecuarias de la Pontificia Universidad Javeriana. La cepa se mantuvo en medio YGC y extracto de salvado a 4° C. Fue reactivada en medio extracto de salvado, Radha y YGC por triplicado, y se incubó a 27°C por 8 días, midiendo el crecimiento radial cada 24 horas

ANEXO 3.

5.1.2 Crecimiento y decoloración en dos diferentes condiciones nutricionales suplementadas con colorantes y metales pesados.

Se evaluaron dos tipos de colorantes, uno de tipo azóico (negro reactivo 5) y dos de tipo trifenilmetano (verde malaquita y cristal violeta); además se evaluaron cuatro metales pesados (dicromato de potasio, sulfato de cromo, acetato de plomo y cloruro de mercurio), a una concentración de 50mg L⁻¹ cada uno. Estos compuestos se obtuvieron del laboratorio de Microbiología Ambiental y Suelos de la PUJ. Para esto se colocó un disco de agar con micelio de *G. lucidum* en el centro de los medios Radha y Extracto de salvado, suplementados (**ANEXO 3**), dichos medios iniciaron con pH de 6,5. Se llevó a 27°C y se determinó el crecimiento radial (mm) y la decoloración durante 8 días, cada 24 horas. Para obtener los porcentajes de decoloración se aplicó la fórmula

$$\%D = \frac{h_D * 100}{90} \quad (1)$$

El 100% corresponde a la decoloración total de la placa (90mm) y h_D al halo de decoloración producido por el hongo en el medio sólido. Para determinar si se presentaron diferencias significativas entre tratamientos, se realizó una comparación de medias entre tratamientos, por medio de una prueba de tukey empleando el programa SAS para Windows.

5.2 Determinación de parámetros de crecimiento de *G. lucidum* bajo condiciones ligninolíticas en fermentación discontinua a escala Erlenmeyer

5.2.1 Inoculación de erlenmeyers

Se inocularon 3 discos de agar colonizados con la cepa en Erlenmeyer de 100mL con 50mL de caldo extracto salvado de trigo. Se incubaron en agitación de 120rpm, durante 15 días a 30°C, periodo durante el cual se evaluó pH, crecimiento de biomasa, actividad enzimática, disminución de glucosa y/o azúcares reductores cada 24 horas, por triplicado (**31-33**).

5.2.2. Cuantificación de biomasa

La cantidad de biomasa fue medida por la técnica de peso seco. Para esto se filtró la biomasa de cada erlenmeyer, retirando los discos inoculados, y lavando varias veces con agua destilada. Una vez eliminados los posibles interferentes como el disco de agar, se pesó el papel aluminio (100x50mm) vacío y luego se colocó la biomasa húmeda para llevarla a una temperatura de 80 °C hasta tener un peso constante. Para obtener el peso de la biomasa seca se aplicó la fórmula:

$$B_s = B_s - B$$

Donde B_s es biomasa seca y B es el peso del papel aluminio vacío

(2)

5.2.3 Concentración de azúcares reductores

La concentración de azúcares reductores en el medio extracto de salvado se evaluó mediante la técnica del ácido 3,5- di-nitrosalicílico (**31**). Anterior a esto se realizó una curva patrón con glucosa a concentraciones de 0,5 a 2g L⁻¹ **ANEXO 4**.

5.2.4 Concentración de glucosa

Se centrifugó la muestra a 5000rpm durante un ciclo de 10 minutos obteniendo 1000µL del sobrenadante, el cual se mezcló con el reactivo Glucosa sera-pak Plus, y se llevó a una temperatura de 30°C por 10 minutos. Esto se leyó a una longitud de onda de 500nm, contra un blanco de reactivo sin muestra. Anterior a esto se realizó una curva patrón con glucosa, a concentraciones de 0,1 a 2g L⁻¹ **ANEXO 5**.

5.2.5 Actividad enzimática

5.2.5.1 Cuantificación de lacasa

La determinación de lacasa, se llevó a cabo por la oxidación del ABTS (Acido 2,2' azino- bis- (3 etil benzotiazoline sulfato)), con un volumen total de reacción de 1000µL adicionando 100µL de ABTS 0,5 mM, 100µL de buffer de acetato de sodio 100mM pH 4,5 y 800µL de muestra. La absorbancia fue leída a 436nm tomando una medición inicial y una final (3 minutos de reacción). El blanco fue de 900µL de muestra con 100µL de buffer de acetato de sodio 100mM pH 4,5. Para esta determinación se centrifugaron las muestras a 5000rpm durante un ciclo de 10 minutos. Una unidad de lacasa se definió como 1µmol de ABTS oxidado por minuto **(33)**.

5.2.5.2 Cuantificación de lignina peroxidasa

La cuantificación de lignina peroxidasa se determinó por la oxidación del alcohol veratrílico, con un volumen total de reacción de 1000µL, adicionando 200µL de Buffer tartrato de sodio, 710µL de muestra, 40µL de alcohol veratrílico y 50µL de peróxido de hidrógeno. La absorbancia fue leída a 310nm. Se utilizó como blanco 200µL de Buffer tartrato de sodio, 760µL de muestra y 40µL de alcohol veratrílico **(32)**. Para esta determinación se centrifugaron las muestras a 5000 rpm durante un ciclo de 10 minutos. Una unidad de LiP se definió como una µmol de alcohol veratrílico oxidado por minuto **(11)**.

5.2.5.3 Cuantificación de manganeso peroxidasa

La actividad de manganeso peroxidasa fue medida por la oxidación de 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMP); la reacción para la cuantificación de lacasa contenía 450µL de la muestra y 500µL de 2, 6- DMP 10mM en buffer acetato (pH 5.0). Para la cuantificación de manganeso peroxidasa, la reacción tuvo los mismos reactivos junto con 50µL de MnSO₄ y 30µL de peróxido de hidrogeno (24, 2µL de H₂O₂ 30% (v/v), las reacciones fueron leídas a 460nm después de 3 minutos. El blanco utilizado fue 500µL de buffer acetato y 450µL de la muestra para ambas reacciones. La actividad MnP fue estimada de la diferencia entre las dos actividades enzimáticas. Una unidad de actividad enzimática se definió como 1µmol de 2, 6 dimetoxifenol oxidado por minuto **(34)**. Anterior a esto se validó la técnica, utilizando extractos crudos de cuatro hongos de podredumbre blanca (*P. ostreatus*, *P. chrysosporium*, *T. versicolor* y *G. lucidum*).

5.3 Curvas de remoción de dos colorantes (trifenilmetanos) y un metal pesado (Dicromato de potasio) con biomasa viable e inactiva.

Se inocularon 3 discos de agar colonizado con *G. lucidum* en caldo extracto de salvado, suplementado con cristal violeta, verde malaquita, dicromato de potasio, a una concentración de 50mg L⁻¹ y 100mg L⁻¹, respectivamente; para determinar la concentración de azúcares reductores, concentración de glucosa, producción de enzimas (lacasa, LiP y MnP), pH, peso seco, porcentaje de decoloración y barridos UV-VIS, a partir de muestreos tomados cada 72 horas por triplicado. Las determinaciones de concentración de azúcares reductores, glucosa, barridos y producción de enzimas se realizaron únicamente en las cinéticas con biomasa viable.

La concentración de los colorantes y del metal presente en la solución se calculó midiendo la absorbancia de cada muestra a la longitud de onda máxima de cada compuesto, verde malaquita (618nm), cristal violeta (595nm) y dicromato de potasio (400nm), utilizando como blanco agua destilada. Como curva de calibración se utilizaron diferentes concentraciones de cada colorante y metal **ANEXO 6**.

Finalmente se realizó un barrido UV- VIS en el espectrofotómetro al día 0, 12 y 24 con el fin de observar el comportamiento de cada compuesto al biodegradarse y/o adsorberse. Esto se hizo en un rango de 200–800nm, determinando el incremento o disminución de absorbancias.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Pruebas de crecimiento y decoloración en medios sólidos

De acuerdo con los resultados del análisis estadístico se presentaron diferencias altamente significativas entre tratamientos ($p < 0.0001$) que demostraron que *G. lucidum* creció mejor en agar extracto de salvado de trigo obteniendo valores de $71,75 \pm 2,95$ mm a los 8 días de tratamiento, siendo un valor 2.8 veces superior que el obtenido en agar Radha $26,2 \pm 3,4$ mm. **ANEXO 7.** Esta diferencia radicó principalmente en la composición nutricional de los medios empleados, ya que el extracto salvado de trigo proporciona al hongo condiciones nutricionales aptas para su crecimiento, pues contiene celulosa, hemicelulosa, y alcoholes hidroxicinámicos, entre ellos el alcohol cumarílico, coniferílico y sinapílico, que favorecen la expresión de enzimas ligninolíticas (4), además su contenido de carbohidratos y nitrógeno (relación C/N aprox. 48.8–59.6) favorece el crecimiento de hongos de podredumbre blanca como *G. lucidum* (28,35). A pesar que la cantidad de nitrógeno es menor respecto al carbono, no hay efecto negativo en la producción de enzimas, pues la madera que es el sustrato en el que se encuentra este tipo de microorganismos naturalmente, tiene bajos niveles de nitrógeno, por lo cual la expresión de enzimas ligninolíticas se ve favorecida bajo estas condiciones (8). Asimismo, cuando los nutrientes de fácil asimilación (glucosa) presentes en el medio se agotan, por el aumento de biomasa, puede favorecerse la expresión de enzimas ligninolíticas que le permiten al hongo continuar degradando el sustrato (37,38).

Por el contrario, el agar Radha contiene sales, y como única fuente de carbono: glucosa, además la relación C/N es baja a comparación del extracto salvado de trigo, lo cual no favorece el crecimiento ni la expresión de enzimas en *G. lucidum*, sin embargo este medio ha sido empleado en estudios con *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor* los cuales han demostrado ser capaces de crecer y decolorar NR5 en este sustrato (36).

De igual forma la fuente de nitrógeno influye de manera directa en el crecimiento del hongo, pues se reporta que las fuentes orgánicas (extracto de levadura y peptona) son mejores que las inorgánicas (amonio y urea), lo cual confirma el lento crecimiento de *Ganoderma lucidum* en el medio Radha (5).

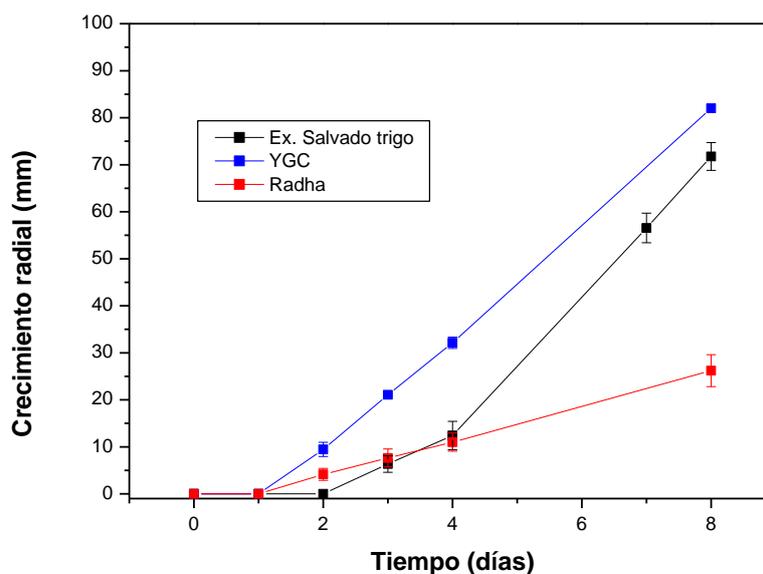


Figura 1. Crecimiento de *G. lucidum* en medios sólidos. Condiciones de incubación: 27°C, 8 días.

Con respecto al crecimiento del hongo en salvado de trigo suplementado con colorantes se observaron diferencias significativas entre colorantes ($p=0,0043$) siendo el negro reactivo en el que se obtuvo el mayor crecimiento $74,65\pm 3,5\text{mm}$, seguido por el verde de malaquita y cristal violeta ($32,8\pm 2,12\text{mm}$, $13,2\pm 3,6\text{mm}$). Por otro lado, el comportamiento de la decoloración fue diferente ya que para esta variable el porcentaje más elevado se obtuvo con verde de malaquita $35,6\pm 3,33\text{mm}$ y cristal violeta ($22,2\pm 1,35\text{mm}$) a los 8 días (**Figura 2**) **ANEXO 8**.

La decoloración observada en los medios suplementados con colorantes trifenilmetánicos se podría relacionar con la producción de enzimas ligninolíticas (LnP, lacasa y MnP) y/o mecanismos de adsorción a la pared fúngica **(39)**, que generan cambios en el espectro de absorción, haciendo que el pico de máxima absorción disminuya y debido a ello se observan cambios de color en el medio de cultivo **(39, 40)**. Según Kaushik y Malik, 2009, la remoción de color por parte de la biomasa fúngica en medio líquido se ve favorecida principalmente por la transferencia de oxígeno y la disponibilidad de nutrientes; sin embargo han reportado que la cantidad de enzimas producidas por hongos, durante este tipo de fermentación puede ser menor a las encontradas en medios sólidos ya que en estos se favorece el crecimiento y colonización del sustrato por parte del microorganismo **(41)**.

Por el contrario en el medio suplementado con NR5 no se evidenció halo de decoloración, posiblemente porque la producción enzimática se vio afectada por la limitación o exceso de nutrientes como el carbono, nitrógeno y algunos elementos como Cu, Fe y Mn **(39)**. Además de ello la expresión de isoenzimas en hongos de podredumbre blanca puede afectar la degradación de colorantes, ya que la actividad enzimática puede variar entre cepas de la misma especie. En los estudios realizados por Murugesan y colaboradores, se encontró que una cepa de *G. lucidum* creció pero no decoloró el medio base suplementado con 50mg L^{-1} de NR5, debido principalmente a que la acción de la enzima lacasa es afectada por la conformación estérica del colorante, que reduce la accesibilidad de la enzima a los grupos funcionales ($-\text{NH}_2$ y $-\text{OH}$) susceptibles al ataque enzimático; por lo cual para potenciar la actividad de la lacasa sobre este tipo de contaminantes es necesario contar con mediadores redox como por ejemplo el HBT u otros **(4)**.

Teniendo en cuenta que el pH del medio en este estudio inició en 6,5 la adsorción del NR5 pudo ser afectada de manera negativa, pues la decoloración de este reactivo es favorecida por pH ácidos, debido a las características aniónicas que presenta el colorante, y a que los grupos funcionales en la pared celular son protonados y adquieren carga positiva cuando el pH del medio es inferior a 6,0; con lo cual la interacción colorante-biomasa es favorecida; sin embargo en este caso ya que el pH inicial se encontraba en 6,5 la degradación del colorante pudo ser inhibida por la cantidad de iones H^+ presentes en el medio que compiten con los iones del colorante por los sitios de unión a la pared fúngica **(43)**. De igual forma el pH influye en la producción enzimática y su actividad específica, pues algunos reportes indican que la actividad enzimática de la lacasa cuando se encuentra en pH superior a 6 es baja, a comparación de cuando se encuentra en medios con pH entre 3 y 5 **(44)**.

De otro lado el crecimiento de *G. lucidum* en los medios con verde malaquita y cristal violeta presentó menor velocidad de crecimiento respecto al medio control, además el diámetro de los halos de decoloración son inferiores a 40mm; esto se debe principalmente a que la producción de enzimas se relaciona con la cantidad de biomasa producida, y al haber lento crecimiento, entonces las enzimas también son expresadas en bajas cantidades, disminuyendo la capacidad de decoloración del medio de cultivo por parte del microorganismo **(38)**.

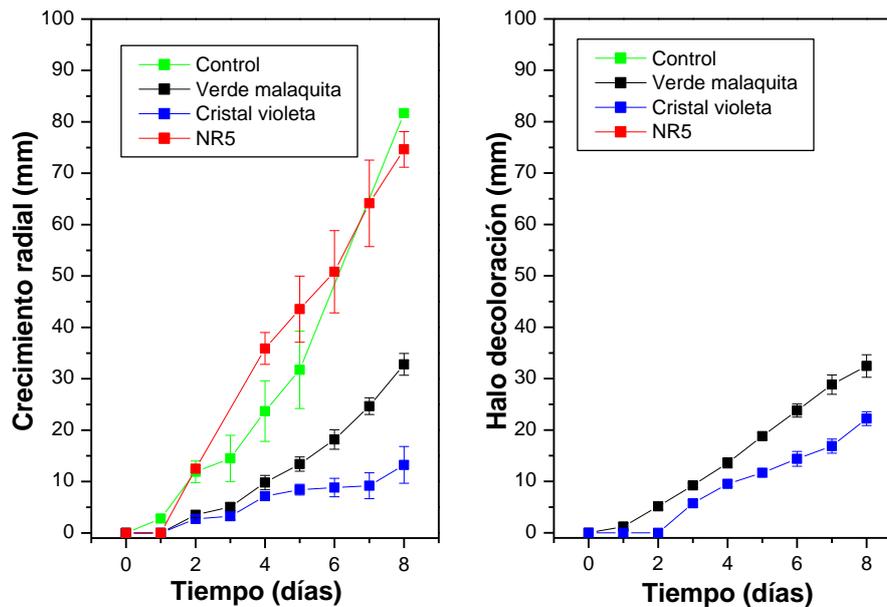


Figura 2. Crecimiento y decoloración de *Ganoderma lucidum* en medios sólidos suplementados con colorantes a concentración de 50mg L⁻¹ (27°C, 8 días).

En los medios suplementados con metales pesados (acetato de plomo, sulfato de cromo, dicromato de potasio, cloruro de mercurio) en concentraciones de 50mg L⁻¹, no se obtuvo crecimiento en agar Radha siendo significativamente diferente que el agar extracto salvado de trigo ($p < 0.0001$); bajo condiciones ligninolíticas se observó crecimiento en los medios suplementados con los tres metales evaluados: $82,0 \pm 0,0$ mm; $81,6 \pm 0,4$ mm y $65,8 \pm 0,6$ mm respectivamente a los 8 días; en estos medios no se observaron halos de decoloración (**Figura 3**) **ANEXO 9**.

Según Gómez-Bertel y colaboradores, el crecimiento de la cepa en estos medios puede deberse a diferentes interacciones relacionada posiblemente con adsorción entre el microorganismo y el compuesto contaminante, las cuales se basan en mecanismos como por ejemplo: secreción de enzimas u otras sustancias intra o extracelulares, incorporación y bioacumulación del metal o por procesos de adsorción en el cual hay unión del metal a la biomasa fúngica (polisacáridos, quitina, quitosan) (**45,46**).

A pesar de ello no hubo crecimiento de *G. lucidum* en el medio suplementado con cloruro de mercurio, según el estudio realizado por Xuan y colaboradores la toxicidad de ciertos metales pesados hacia una cepa de *Ganoderma lucidum*, indica que el mercurio (Hg) inhibe el crecimiento micelial del microorganismo, contrario al plomo (Pb) que no afecta el crecimiento del mismo, esto confirma los resultados obtenidos en el presente estudio (**47**). Algunos de los efectos del mercurio en hongos de podredumbre blanca, incluyen la disminución en la tasa de crecimiento, lisis o disminución en la cantidad de proteínas del micelio y pérdida de la actividad enzimática, específicamente en la actividad de la lacasa (**58**).

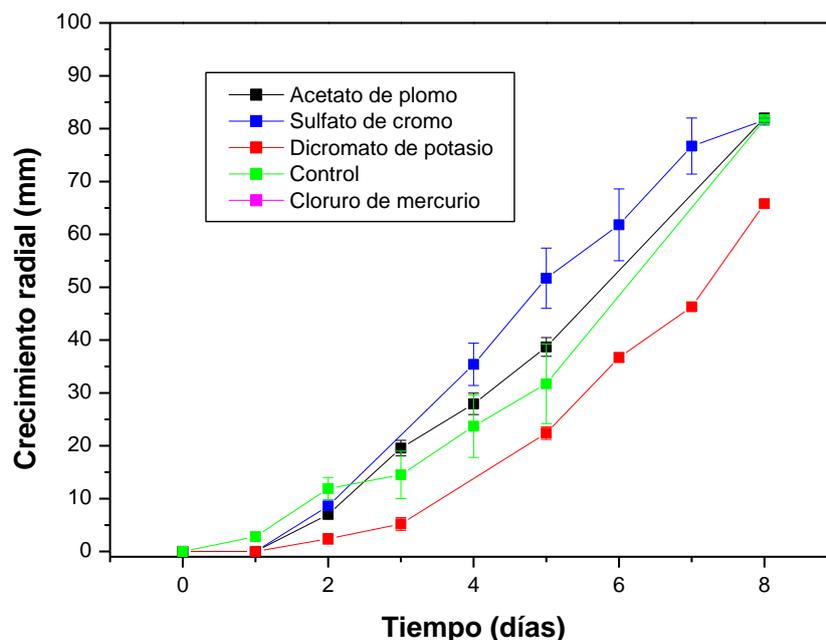


Figura 3. Curva de crecimiento de *G. lucidum* en medios sólidos suplementados con metales pesados a concentración de 50mg L⁻¹ (27°C, 8 días).

6.2 Determinación de parámetros cinéticos de crecimiento de *G. lucidum* bajo condiciones ligninolíticas en fermentación discontinua a escala Erlenmeyer

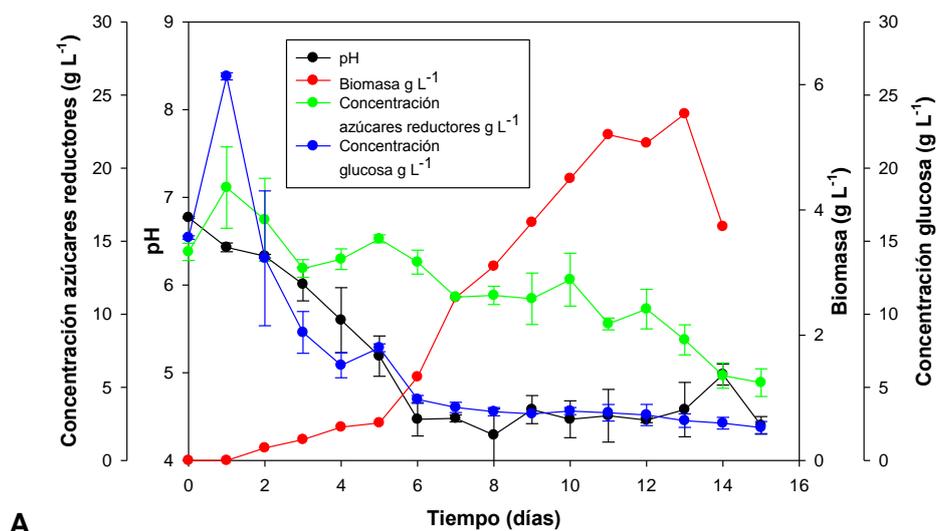
Posterior al crecimiento en medios sólidos, se llevó a cabo una curva de crecimiento en medio salvado de trigo líquido. Durante este experimento la mayor producción de biomasa (5,53g L⁻¹) fue cuantificada al día 13, además se observó que el crecimiento fúngico se generó en forma de pellets; según Kim y Song en el 2009, la formación de pellets en medio líquido es uno de los factores más influyentes en la expresión de enzimas, pues la transferencia de oxígeno y la cantidad de enzima expresada depende del tamaño y la morfología del pellet; ya que según estos autores, la producción de lacasa por parte de *P. ostreatus* es mayor cuando los pellets no son demasiado compactos y tienen un diámetro entre 3 y 4mm de diámetro, pues al aumentar de tamaño, la transferencia de oxígeno es menor y se limita la producción enzimática (59). En cultivos agitados se da la formación de este tipo de pellets, y por ende hay mayor producción de lacasa, permitiendo un aumento en la remoción del colorante, pues la transferencia de oxígeno entre la célula y el medio es cada vez mayor (5).

Durante esta cinética la máxima cantidad de lacasa producida fue de 770,407U L⁻¹ en el día 13; esta producción incrementó junto con la producción de biomasa, es decir durante la fase exponencial (desde día 5 al 13), lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Maganhotto de Souza Silva y colaboradores en el 2005, quienes hallaron que la producción de lacasa, en un medio suplementado con salvado de trigo, se dio durante la fase exponencial, sin embargo la máxima producción de lacasa obtenida por estos autores con la cepa *Ganoderma* GAS13.4 fue de 26,65±0.65U L⁻¹ en el día 13, lo cual es treinta veces menor a lo producido por la cepa evaluada durante este estudio (6).

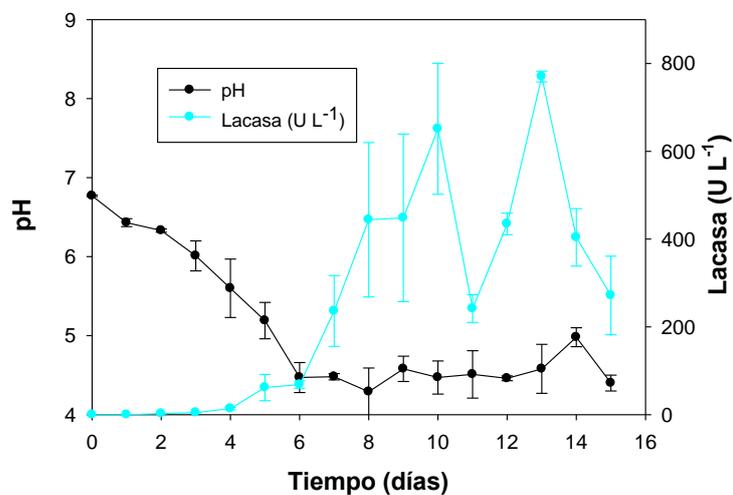
Según estudios realizados por Elisashvili, y Kachlishvili en 2009, la producción de enzimas ligninolíticas por parte de microorganismos pertenecientes a un mismo género varía de acuerdo a la especie y cepa evaluada, así mismo como al tipo de sustrato empleado; además afirma que en especies de *Ganoderma lucidum* es imprescindible la presencia de lignocelulosa para promover la expresión de estas enzimas (68).

El crecimiento de la cepa y la producción de enzimas ligninolíticas en el medio extracto salvado de trigo, generalmente es favorecido por la presencia de los precursores (alcoholes hidroxicinámicos) presentes en el medio, sin embargo en este estudio no fue posible cuantificar la producción de MnP y LiP, esto puede deberse a las condiciones de cultivo utilizadas, entre las que se encuentran la disponibilidad de fuentes de carbono, nitrógeno, Mn^{+2} y otros compuestos inductores (40, 42, 48). Según estudios realizados por Silva Coelho y colaboradores, la producción de MnP es mayor en fermentación sólida que en líquida, lo cual puede explicar por qué no fue posible cuantificar la cantidad de MnP producida en el presente estudio (52).

Con el fin de verificar que *G. lucidum* no produce MnP; se llevó a cabo la técnica de oxidación de 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMP), utilizando *P.chrysosporium*, *T. versicolor* y *P. ostreatus*, bajo las mismas condiciones utilizadas con la cepa evaluada. En este experimento se encontraron puntos máximos de producción para *P.chrysosporium* y *T. versicolor* al día 12 y 9, con valores de $0,954\pm 0,0$ U L⁻¹ y $0,392\pm 0,076$ U L⁻¹ respectivamente, mientras que para *P. ostreatus* el máximo de producción se evidenció al día 15 con valores de $0,931\pm 0,36$ U L⁻¹, con lo cual se confirma que la técnica empleada es útil para la cuantificación de MnP ANEXO 11.



A



B

Figura 4. Curva de crecimiento en agar extracto de salvado de trigo. (A): Biomasa, concentración de azúcares reductores totales y glucosa, concentración del colorante. (B) pH y producción de enzimas (15 días, 120 rpm, 27°C).

6.3 Curvas de remoción de dos colorantes (trifenilmetánicos) y un metal (dicromato de potasio) con biomasa viable e inactiva.

En el medio suplementado con verde malaquita (biomasa viable), el pH se mantuvo estable a través del tiempo y hubo disminución en la concentración del colorante ($10,6 \pm 0,36 \text{ mg L}^{-1}$ a $3,3 \pm 0,94 \text{ mg L}^{-1}$) equivalente a un 69%, posiblemente asociado a procesos de adsorción y degradación enzimática por parte de las enzimas lacasa y LiP (**Figura 5**) ANEXO 12.

Según el estudio de Casas y colaboradores la degradación del verde malaquita por medio de enzimas como la lacasa, se debe a la descarboxilación y oxidación de carbonos metilo del colorante, que conllevan a la formación de productos intermedios estables (**60**) además según otros estudios si la lacasa actúa con la LiP, esta última podría atacar los grupos metilo y el doble enlace carbono que une los tres anillos aromáticos que componen a este colorante, permitiendo la acción de la MnP y lacasa sobre los anillos aromáticos una vez han liberados (**61**).

La baja producción de lacasa obtenida ($2,52 \text{ U L}^{-1}$) respecto a la del medio extracto salvado de trigo sin colorantes, puede deberse a que el rango de pH en el cual la lacasa es más estable y tiene mejor actividad es entre 4 y 5, sin embargo el pH del medio se mantuvo alrededor de 6,31 (**62**). A pesar de esto, los rangos de pH en los cuales actúa de forma eficiente la enzima dependen específicamente del sustrato (ABTS, DMP, guayacol) empleado y el mecanismo de oxidación de cada enzima. Cuando las enzimas se encuentran fuera de este rango, hay pérdida de actividad, ya que puede haber desnaturalización de la proteína, y/o cambios estructurales en la enzima y el sustrato (K_m), cambios en la afinidad entre estas y en la eficiencia de la enzima para actuar sobre el sustrato (K_{cat}) (**66**).

En las figuras 4 y 5, se evidencia el efecto del sustrato en el desarrollo del microorganismo, pues no hubo consumo de azúcares de fácil asimilación (glucosa) y no fue posible cuantificar la producción de biomasa ni de enzimas ligninolíticas, esto se debe a que el desarrollo y actividad metabólica depende directamente de las condiciones y el medio de cultivo empleado; en este caso los colorantes empleados posiblemente inhibieron el crecimiento y desarrollo de la cepa, evitando una óptima producción de enzimas (**6**).

En la curva con biomasa muerta el pH no disminuyó radicalmente, pues inició en 6,3 y al final estuvo alrededor de 6,1, sin embargo la concentración del colorante disminuyó de $21,4 \pm 0,0 \text{ mg L}^{-1}$ a $7,4 \pm 1,2 \text{ mg L}^{-1}$. La disminución en la concentración del colorante puede deberse a procesos de biosorción tanto a la biomasa fúngica como a remanentes del salvado de trigo; en este mecanismo el pH influye de manera directa ya que a pH ácido la biosorción del verde malaquita disminuye por la competencia entre los iones de H^+ libres y los cationes del colorante por los sitios activos de la pared fúngica (**54**). En este caso el pH no fue menor a 6,0; lo cual favoreció el proceso de biosorción del colorante.

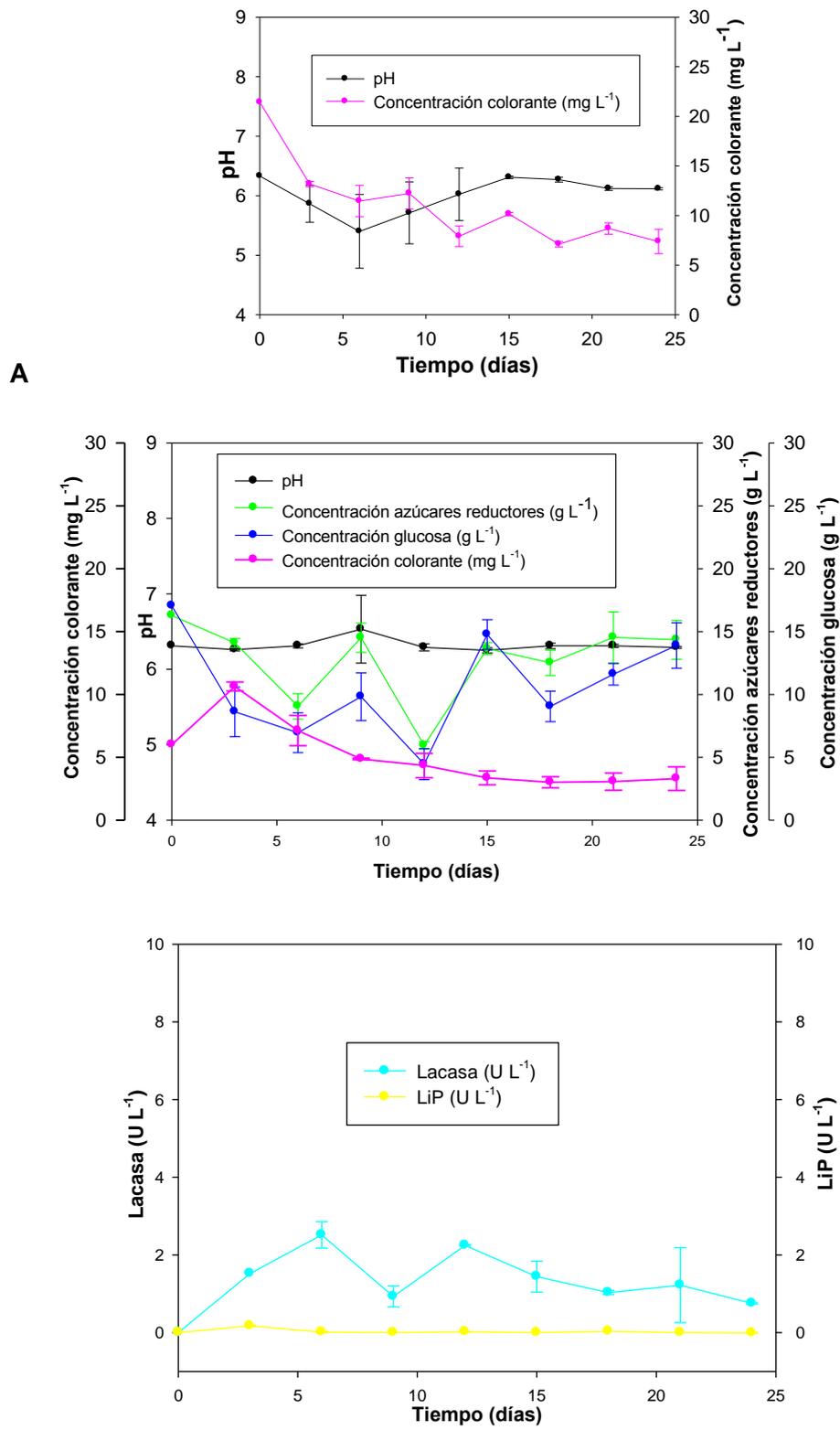


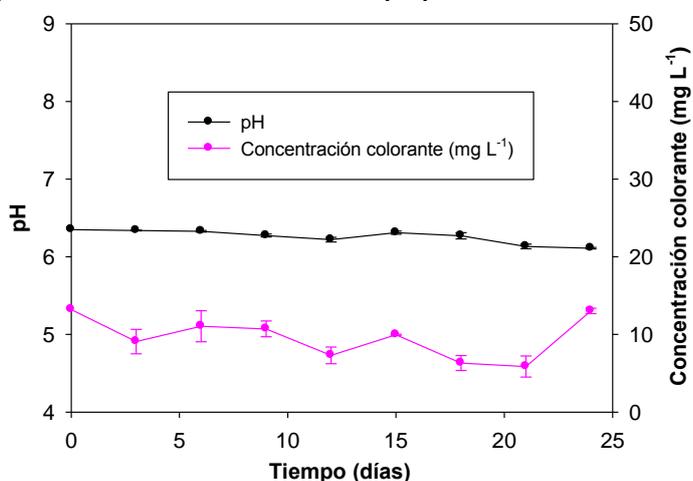
Figura 5. Curvas en medio extracto de salvado de trigo líquido suplementado con verde malaquita A: biomasa inactiva. B y C: biomasa viable. (24 días, 120 rpm, 27°C).

En la curva de *G. lucidum* en medio líquido suplementado con cristal violeta con biomasa inactiva (**Figura 6**), el pH no disminuyó y la concentración de color de redujo del día 0 al 21 ($13,2\pm 0,0\text{mg L}^{-1}$ y $5,8\pm 1,4\text{mg L}^{-1}$ respectivamente), lo cual confirma que

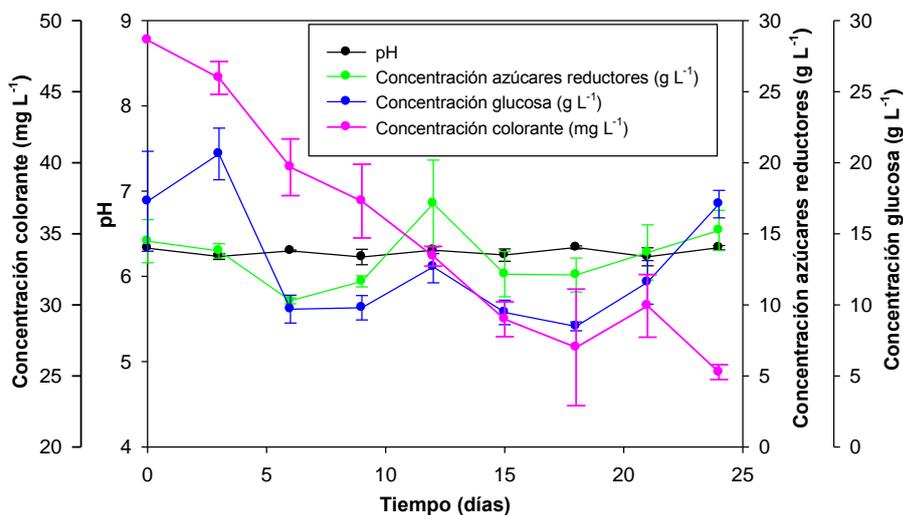
cuando el pH es superior a 6,0 la adsorción del colorante es favorecida ya que no hay competencia entre H^+ libres y los sitios activos de la biomasa (41).

En cuanto a la curva con biomasa viable, el pH también se mantuvo estable y la concentración de color disminuyó de $48,6 \pm 0,0 \text{ mg L}^{-1}$ a $25,3 \pm 0,53 \text{ mg L}^{-1}$ del día 0 al 24. Sin embargo al igual que en la cinética con verde malaquita, la concentración de azúcares reductores y glucosa no tuvo una constante disminución. Finalmente fue posible cuantificar lacasa con un pico de producción de $4,3 \pm 0,65 \text{ U L}^{-1}$ al tercer día de la fermentación.

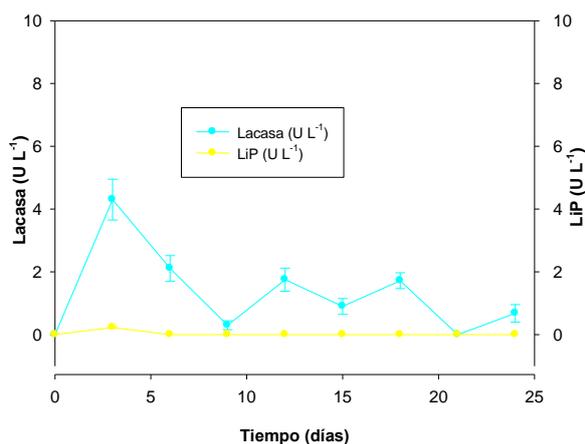
La decoloración de cristal violeta en presencia de biomasa viable, puede deberse a procesos enzimáticos, en los cuales la demetilación del colorante genera productos intermedios como la pentametilpararosanilina, tetrametilpararosanilina o trimetilpararosanilina que tienen longitudes de onda más bajas que el cristal violeta (55). Sin embargo Wang y Ng, reportan que la lacasa extraída de un cultivo de *G. lucidum* tiene poca actividad cuando se encuentra en pH entre 6,0 y 7,0 lo cual puede demostrar la causa de la poca decoloración del medio (44) ANEXO 13.



A



B



C

Figura 6. Curva de *G. lucidum* en medio extracto de salvado de trigo líquido suplementado con cristal violeta (24 días, 120 rpm, 27°C). A: biomasa inactiva B y C: biomasa viable.

En el medio extracto salvado de trigo suplementado con dicromato de potasio tanto con biomasa viable como inactiva (**Figura 7**), se observó que el pH se mantuvo constante, utilizando biomasa inactiva, sin embargo hubo disminución en la concentración del metal, esto puede deberse a la adsorción del metal a la biomasa fúngica, la cual contiene sitios aniónicos, entre ellos grupos carboxilo, hidroxilo y fosfatos y algunos polisacáridos y glicoproteínas como glicanos, quitosan, quitina, mananos, fosfomananos (**56,57**). La adsorción de metales a la pared fúngica puede estar favorecida por la agitación, pues hay mayor contacto entre el adsorbente y el adsorbato, además la cantidad de metal presente en la solución también influye en la adsorción del mismo, ya que a menor cantidad es más fácil la adsorción a los sitios activos, por el contrario cuando hay grandes cantidades de metal, puede haber saturación de los sitios de unión y por ende disminuye la cantidad de metal adsorbido (**56**).

Respecto a la curva con biomasa viable hubo disminución en la concentración de azúcares reductores y glucosa, que conllevó a la acidificación del medio de $6,3 \pm 0,0$ a $4,0 \pm 0,06$ por producción de ácidos orgánicos (oxálico, fórmico, pirúvico, entre otros). Además fue posible cuantificar la producción de lacasa con un pico de $1,7 \pm 2,3$ U L⁻¹ al día 24, aunque esta producción fue considerablemente menor a la del medio control, se ha reportado que las enzimas producidas de manera constitutiva se producen en bajas cantidades y para promover su expresión, es necesario agregar inductores al medio entre los que se encuentran: 2,5- xilidina, 2,6 dimetoxifenol, ácido ferúlico, vainillina, además de algunos metales que favorecen específicamente la producción de lacasa ya que tienen efecto directo en los genes *lcc* (**46, 48**) **ANEXO 14**.

Como se muestra en la figura 7 (b) la concentración del metal aumentó, asociado posiblemente a una desorción, pues según Gómez- Bertel y colaboradores uno de los mecanismos implicados en remoción del metal, se basa en la liberación de Cr(III) a la solución acuosa por repulsión de cargas entre los grupos cargados positivamente presentes en la pared fúngica y el cromo trivalente (**46**).

Sin embargo esta desorción se da mejor cuando el medio tiene pH neutro o alcalino, pues la capacidad adsorbente de la biomasa incrementa cuando el pH es ácido, ya que hay desnaturalización de proteínas y protonación de grupos amino presentes en la pared fúngica, con lo que se incrementan los sitios activos de unión ($-NH_2$) y la posibilidad de adsorber mayor cantidad de metal a pH ácido (**46**).

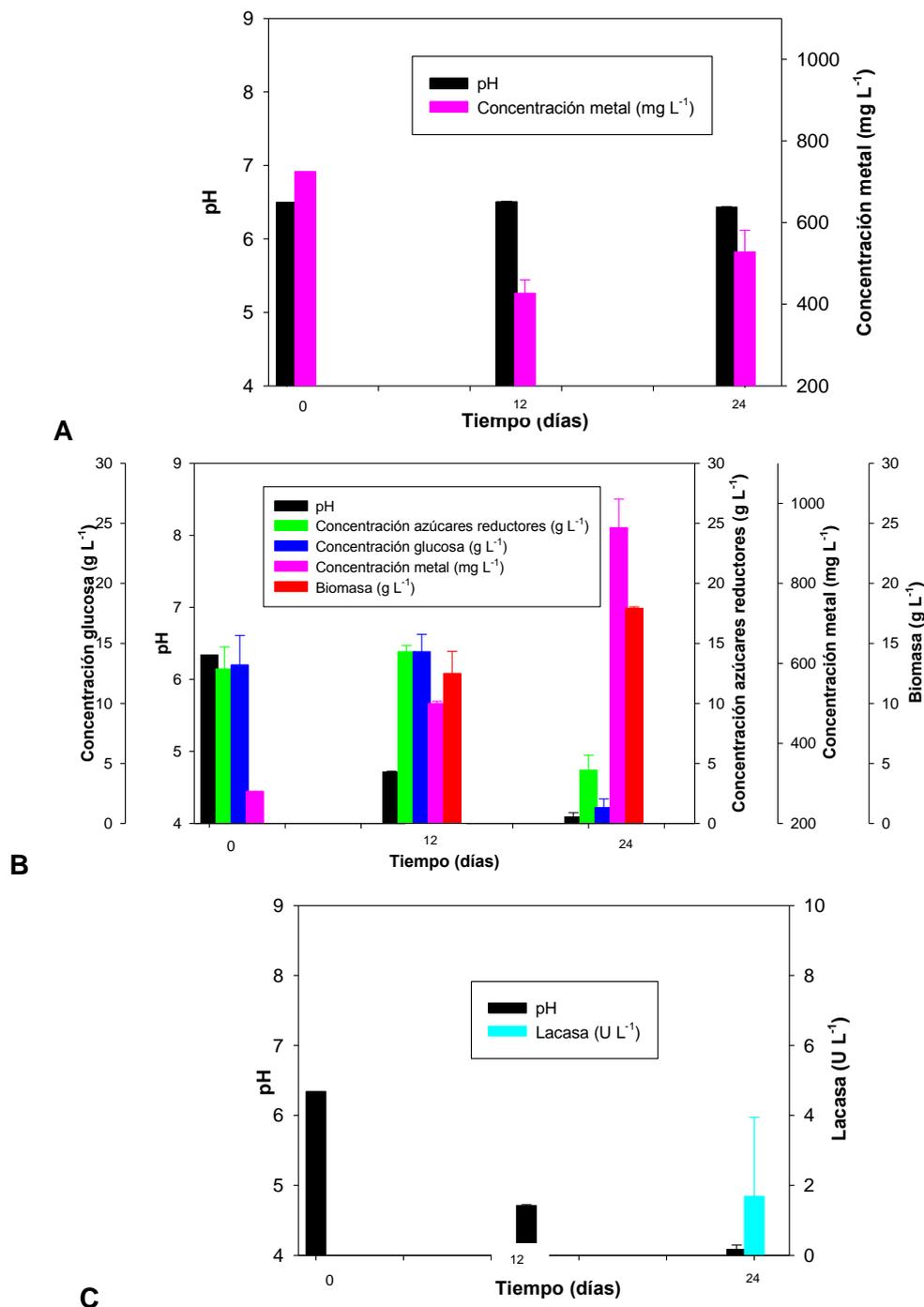


Figura 7. Curva de crecimiento de *Ganoderma lucidum* en medio extracto de salvado de trigo líquido suplementado con dicromato de potasio durante 24 días (120 rpm, 27°C). A: biomasa inactiva B y C: biomasa viable.

Finalmente dada la formación de metabolitos intermediarios producto de la degradación de los contaminantes, se evidencian cambios en las longitudes de onda en el barrido UV- VIS, pues cuando los grupos funcionales varían de posición, aumentan o disminuyen los anillos, la resonancia del compuesto cambia, dando lugar a una intensidad mayor o menor de absorción y un cambio batocrómico fuerte a longitudes de onda mayores, o efecto hipsocrómico a longitudes de ondas menores. (19) (Figura 8).

La aparición de nuevos picos de absorción en el espectro UV, puede deberse a la formación de compuestos aromáticos nuevos o ruptura de enlaces que libera anillos aromáticos presentes en la estructura básica del colorante, de igual forma la disminución en los picos del espectro visible se relaciona con cambios estructurales en el cromóforo debido a la acción enzimática, es por ello que el pico máximo de absorción del colorante disminuye a través del tiempo **(36,39)**. Estos cambios fueron observados a través del tiempo.

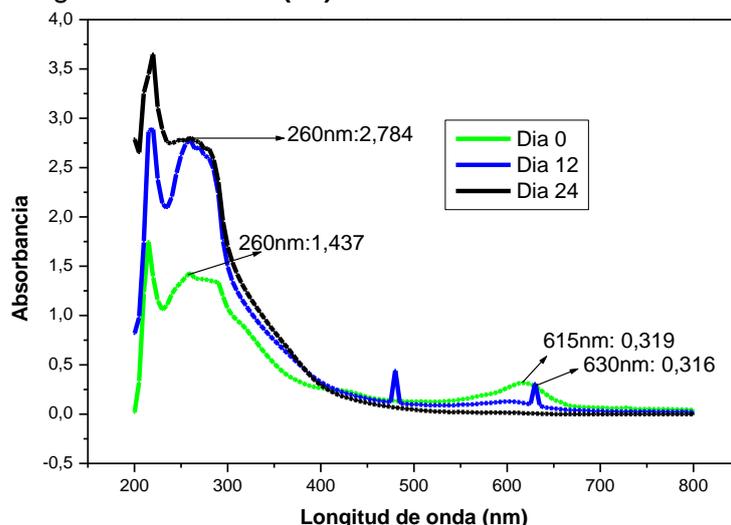
En el caso de los colorantes trifenilmetanos se pueden generar moléculas que corresponden a anillos bencénicos, cetonas y/o aldehídos, los cuales absorben en longitudes de onda entre 255 y 300nm (espectro UV) **(64)**.

Es el caso que se presenta en el día 12 del proceso, donde se observa un efecto hipsocrómico generado posiblemente por cambios de posición de los grupos funcionales del colorante, y un efecto batocrómico en donde el pico de absorción se ubica a 480 nm, una longitud de onda menor a la del colorante base, ya que el color complementario que se produce (amarillo) tiene un máximo de absorción a dicha longitud **(63)**.

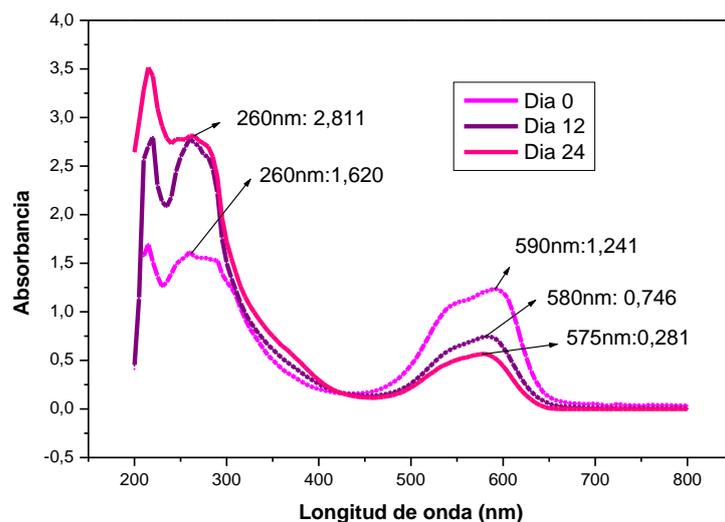
La degradación del cristal violeta genera productos demetilados como la pentametilpararosanilina, tetrametilpararosanilina los cuales tienen un máximo de absorción entre los 580 y 572nm respectivamente, lo cual concuerda con los resultados obtenidos, en los cuales se encuentran picos de absorción a los 580nm (día 12) y 575nm (día24) **(55)**.

Por otro lado en la investigación de Yu chen y colaboradores, se encontraron compuestos intermedios producidos en la degradación del verde malaquita, entre ellos el verde leucomalaquita (LMG), metabolito producido a partir de la reducción del colorante y que el desmetil-MG se forma a partir de una N-demetilación del mismo colorante **(21)**.

Además de ello, la degradación de colorantes trifenilmetánicos puede generar moléculas que corresponden a anillos bencénicos, cetonas y/o aldehídos, los cuales absorben en longitudes de onda entre 255 y 300nm (espectro UV). Cuando un anillo bencénico tiene sustitución de CH₃ puede absorber a 261nm. De igual manera la presencia de grupos carbonilo, nitro, azo, tiocarbonilo, dan lugar a picos de absorción usualmente en la región UV-cercana **(64)**



A



B

Figura 8. Barridos UV-VIS realizados al día 0, día 12 y día 24 de las cinéticas con biomasa viable. A: Verde malaquita B: Cristal violeta

7. CONCLUSIONES

- Al evaluar el crecimiento micelial de *Ganoderma lucidum* en un medio complejo y uno químicamente definido, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.0001$) debido a que *G. lucidum* creció mejor en agar extracto de salvado de trigo ($71,75 \pm 2,95$ mm) respecto al agar Radha ($26,2 \pm 3,4$ mm).
- En el agar extracto salvado de trigo suplementado con colorantes se observaron diferencias significativas ($p = 0,0043$) ya que hubo mayor crecimiento en el medio con colorante NR5 ($74,65 \pm 3,5$ mm), seguido por verde de malaquita y cristal violeta ($32,8 \pm 2,12$ mm, $13,2 \pm 3,6$ mm); sin embargo el porcentaje de decoloración más alto se obtuvo con verde de malaquita $35,6 \pm 3,33$ mm.
- En los medios suplementados con metales pesados, no se obtuvo crecimiento en agar Radha siendo significativamente diferente que el agar extracto salvado de trigo ($p < 0.0001$); bajo condiciones ligninolíticas se observó crecimiento en los medios suplementados con acetato de plomo, sulfato de cromo y dicromato de potasio ($82,0 \pm 0,0$ mm; $81,6 \pm 0,4$ mm y $65,8 \pm 0,6$ mm respectivamente).
- Durante la caracterización de parámetros cinéticos de *G. lucidum* bajo condiciones ligninolíticas, se cuantificó la producción de biomasa ($5,53 \text{ g L}^{-1}$ al día 13) y disminución del pH del medio (desde 6,7 hasta 4,4) a través del tiempo. Además fue posible determinar la disminución en la concentración de azúcares reductores y glucosa y la alta producción de lacasa ($770,407 \text{ U L}^{-1}$ al día 13), sin embargo no hubo producción de MnP y LiP.
- Al realizar estudios preliminares de tratabilidad de dos colorantes en medio líquido, con biomasa viable, no se obtuvo producción de biomasa cuantificable, sin embargo hubo disminución en la concentración de cristal violeta (48%) y verde malaquita (69%), que tiene relación con la producción de lacasa ($4,30 \text{ U L}^{-1}$ y $2,52 \text{ U L}^{-1}$, respectivamente). Con biomasa inactiva se obtuvo disminución en la concentración del cristal violeta (55,6%) y verde malaquita (65,5%).

- En el medio extracto salvado de trigo líquido suplementado con dicromato de potasio se produjeron 17,9 g L⁻¹ de biomasa, hubo disminución de pH y un aumento de concentración del metal de 280 a 940 mg L⁻¹, asociado a una posible desorción de Cr (III). Finalmente con biomasa inactiva se obtuvo disminución en la concentración del metal (29,1%), sin embargo no hubo acidificación del medio.

8. RECOMENDACIONES

- Optimizar fuentes de carbono y de nitrógeno en el medio de cultivo, que permitan mejorar la remoción de colorantes.
- Evaluar el efecto de las condiciones de cultivo como pH, temperatura, rpm entre otros, en la remoción de estos colorantes y metales pesados, para potenciar el rendimiento de *G. lucidum*.
- Determinar la tolerancia de *G. lucidum* frente a estos compuestos tóxicos, evaluando diferentes concentraciones.
- Evaluar la remoción de los colorantes y metales pesados utilizados en este estudio utilizando *G. lucidum* a escala piloto.
- Determinar productos intermediarios generados de la degradación de estos colorantes y metales pesados.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Bant I, Nigam P, Singh D. y Marchant R. Microbial decolorization of textile- dye-containing effluents: a review. *Bioresource Technology* 1996; 1:1-10.
2. Dávila. G, Vázquez-Duhalt, R. Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. *Mensaje bioquímico* 2006; 30: 29-55.
3. Claus, H. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron* 2004; 35 93–96.
4. Murugesan K, Nam I, Kim Y, Chang Y. Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid state culture. *Enzyme and Microbial Technology* 2007; 40: 1662–1672.
5. Revankar M y Lele S.S. Synthetic dye decolorization by white rot fungus, *Ganoderma* sp. WR-1. *Bioresource Technology* 2007; 98: 775–780.
6. Maganhotto de Souza Silva CM, Soares de Melo I y De Oliveira PR. Ligninolytic enzyme production by *Ganoderma* spp. *Enzyme and Microbial Technology* 2005; 37: 324–329.
7. Reddy C.A. The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. *Current Opinion in Biotechnology* 1995; 6:320-328
8. Ten Have R. y Teunissen P. Oxidative Mechanisms Involved in Lignin Degradation by White-Rot Fungi. *Chemical Reviews* 2001; 101: 3397-3413.
9. Barr D.P y Aust S.D. Review. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environmental Science & Technology* 1994; 28 (2).

10. Wagner R., Mitchella D.A., Lanzi Sassakia G. y Lopes de Almeida Amazonas M.A. Links between morphology and physiology of *Ganoderma lucidum* in submerged culture for the production of exopolysaccharide. *Journal of Biotechnology* 2004; 114: 153–164.
11. Moncalvo JM, Wang HF y Rvey-Shyang H. Gene phylogeny of the *Ganoderma lucidum* complex based on ribosomal DNA sequences. Comparison with traditional taxonomic characters. *Mycological Research* 1995; 99 (12): 1489-1499 *Printed in Great Britain*.
12. Zilly A, Da Silva Coelho-Moreira J, Bracht A, Giatti Marques de Souza C, Carvajal AE, Koehnlein EA y Peralta R. Influence of NaCl and Na₂SO₄ on the kinetics and dye decolorization ability of crude laccase from *Ganoderma lucidum*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2011; 65: 340- 344.
13. Pointing S.B. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. Mini-review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2001; 57:20–33.
14. Curtis H, Barnes S y Schnek A. Biología. Ed. Médica Panamericana. 7 edición. 2007.
15. Mayer, L. Métodos de la industria química en esquemas de flujo de colores 2. Editorial Reverté, S.A. 1987.
16. Dhouib A, Hamza M, Zouari H, Mechichi T, H'midi R, Labat M, Martínez y Sayadi. Autochthonous fungal strains with high ligninolytic activities from Tunisian biotopes. *African Journal of Biotechnology* 2005; 4 (5): 431-436.
17. Mondragón Natarén V.Y. Molienda de pigmentos hasta tamaño de partícula submicron con medición de potencial Z. Universidad de las Américas Puebla. 2006.
18. Color Index. Vol. 1 y Vol. 2. The society of dyers and colourist, 3° edición.
19. Thetford D. Triphenylmethane and Related Dyes. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* 2000.
20. Purves, Sodava, Heller, Orians y Hillis. Vida: la ciencia de la biología. Octava edición. Editorial Panamericana. 2009.
21. Yu-Chen C, Tar-Kuo J, Yu-Cheng C, Tang-Huang Y, Hsin-Ho I. y Chien-Chung Y. Biological decolorization of dye solution containing malachite green by *Pandoraea pulmonicola* YC32 using a batch and continuous system. *Journal of Hazardous Materials* 2009; 172: 1439–1445.
22. Srivastava S, Sinha R, Roy D. Review Toxicological effects of malachite Green. *Aquatic Toxicology* 2004; 66: 319–329.
23. Singh KP, Gupta S, Singh AK y Sinha S. Optimizing adsorption of crystal violet dye from water by magnetic nanocomposite using response surface modeling approach. *Journal of Hazardous Materials* 2011; 186: 1462–1473.
24. Monroy CM, Cortés AC, Sicard DM, Groot H. Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas in vitro a glifosato. *Biomédica* 2005; 22: 335-345.

25. Enayatzamir K, Alikhani HA y Rodríguez S. Simultaneous production of laccase and decolouration of the diazo dye Reactive Black 5 in a fixed-bed biorreactor. *Journal of Hazardous Materials* 2009; 164: 296–300.
26. Fu F y Wang O. Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *Journal of Environmental Management* 2011; 92: 407-418.
27. Leonowicz A, Nam-seok C, Luterek J, Wilkolazka A, Wojtas-wasilewska M, Matuszewska A, Hofrichter M, Wesenberg D y Rogalski J. Fungal laccase: properties and activity on lignin. Review. *Journal of Basic Microbiol* 2001; 41: 185–227.
28. Vanholme R, Morreel K, Ralph J y Boerjan W. Lignin engineering. *Current Opinion in Plant Biology* 2008; 11: 278–285.
29. Kapoor A y Viraraghavan T. Fungal biosorption – an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review. *Bioresource Technology* 1995; 53: 195-206.
30. Instituto Universitario de Plaguicidas y Aguas IUPA. Lección 17. Procesos de adsorción. 2000.
31. Miller G. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 1959; 31: 246-428.
32. Tien, M. and Kirk, T. 1983. Lignin degradation enzyme from the hymenomycete. *Phanerochaete chrysosporium* burds. In. *Science*. 221: 661-663.
33. Tinoco R, Pickard MA, y Vazquez- Duhalt R. Kinetic differences of purified laccase from six *P. ostreatus* strains. *Letters in Applied Microbiology* 2001; 32: 331-335.
34. Santoyo F, González AE, Terron MC, Ramirez L y Pisabarro A. Quantitative linkage mapping of lignin-degrading enzymatic activities in *Pleurotus ostreatus*. *Enzyme and Microbial Technology* 2008; 43: 137–143
35. Philippoussis AN. Chapter 9: Production of Mushrooms Using Agro-Industrial Residues as Substrates. *Biotechnology for Agro-Industrial Residues 2009*. Pandey (eds.)
36. Fernández JA, Henao LM, Pedroza-Rodríguez AM, Quevedo-Hidalgo B. Inmovilización de hongos ligninolíticos para la remoción del colorante negro reactivo 5. *Revista Colombiana de Biotecnología* 2009; 10 (1): 59-72.
37. Avtonomova AV, Krasnopol'skaya LM y Maksimov VN. Optimization of Nutrient Medium for Submerged Cultivation of *Ganoderma lucidum*. *Microbiology*, 2006; 75 (2): 148–153.
38. Arboleda-Echavarría C. y Mejía-Gallón AI. Inducción de la actividad de lacasa en *Ganoderma* sp. y actividad antioxidante de su biomasa. *Revista Cubana de Farmacia* 2010; 44 (4): 519-532
39. Mazmanci M, Ünyayar A. Decolourisation of Reactive Black 5 by *Funalia trogii* immobilised on *Luffa cylindrica* sponge. *Process Biochemistry* 2005; 40: 337–342.
40. Xu F. Laccase. *Novo Nordisk Biotech* 1999: 1545-1551.

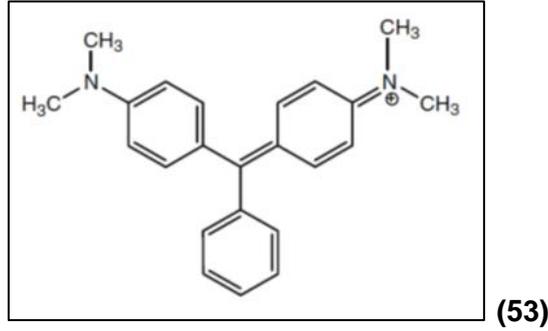
41. Kaushik P, Malik A. Review article: Fungal dye decolourization: Recent advances and future potential. *Environment International* 2009; 35: 127–141.
42. K.N. Niladevi. Chapter 22: Ligninolytic Enzymes. India. 2009: 397- 414.
43. Iscen C, Kiran I, Ilhan S. Biosorption of Reactive Black 5 dye by *Penicillium restrictum*: The kinetic study. *Journal of Hazardous Materials* 2007; 143: 335–340.
44. Wang HX y Ng TB. A laccase from the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006; 72: 508–513.
45. Gutiérrez Corona JF, Espino Saldaña A, Coreño A, Acevedo Aguilar FJ, Reyna López GE, Fernández FJ, Tomasini A, Wrobel K y Wrobel K. Revisión crítica: Mecanismos de interacción con cromo y aplicaciones biotecnológicas en hongos. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal* 2010; 1:47-63.
46. Gómez-Bertel S, Amaya-Bulla D, Maldonado-Saavedra C, Martínez-Salgado M.M, Quevedo-Hidalgo B, Soto-Guzmán A.B, Pedroza-Rodríguez A.M. Evaluación de tres hongos lignolíticos y de *Aspergillus niger* como alternativa para el tratamiento de aguas residuales del curtido de pieles. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 2008; 24 (3) 93-106.
47. Xuan L, Matsushashi S y Kume T. Responses of *Ganoderma lucidum* to heavy metals. *Mycoscience* 1999; 40: 209-213.
48. Silva Coelho J, Oliveira AL, Marques de Souza CG, Bracht A, Peralta R. Effect of the herbicides bentazon and diuron on the production of ligninolytic enzymes by *Ganoderma lucidum*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2010; 64: 156-161.
49. Wang P, Hu X, Cook S, Begonia M, Lee K, Hwang H.M. Effect of culture conditions on the production of ligninolytic enzymes by white rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* (ATCC 20696) and separation of its lignin peroxidase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2008; 24:2205–2212.
50. Asgher M, Sharif Y. y Bhatti H.N. Enzymes by *Ganoderma lucidum* IBL-06 Using Lignocellulosic Agricultural Wastes. *International Journal of Chemical reactor engineering* 2010; 8: 1-17. aca falta algo????
51. Simonić J, Vukojević J, Stajić M y Glamočlija J. Intraspecific Diversity within *Ganoderma lucidum* in the Production of Laccase and Mn-Oxidizing Peroxidases During Plant Residues Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2010; 162: 408–415.
52. Silva Coelho J, Marques de Souza CG, Oliveira AL, Bracht A, Ferreira Costa MA y Peralta RM. Comparative Removal of Bentazon by *Ganoderma lucidum* in Liquid and Solid State Cultures. *Current Microbiology* 2010; 60:350–355.
53. Murugesan K, Yang IH, Kim YM, Jeon JR y Chang YS. Enhanced transformation of malachite green by laccase of *Ganoderma lucidum* in the presence of natural phenolic compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2009; 82: 341–350.

54. Sun XF, Wang SG, Liu XW, Gong WX, Bao N, Gao BY, Zhang HY. Biosorption of Malachite Green from aqueous solutions onto aerobic granules: Kinetic and equilibrium studies. *Bioresource Technology* 2008; 99: 3475–3483.
55. Bumpus JA y Brock BJ. Biodegradation of Crystal Violet by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 1988: 1143-1150.
56. Trivedi BD y Patel KC. Biosorption of hexavalent chromium from aqueous solution by a tropical basidiomycete BDT-14 (DSM 15396). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2007, 23: 683–689.
57. Karnika Alluri H, Reddy Ronda S, Saradhi Settalluri V, Singh J, Suryanarayana V y Venkateshwar P. Review. Biosorption: An eco-friendly alternative for heavy metal Removal. *African Journal of Biotechnology* 2007; 6 (25): 2924-2931.
58. Baldrian P. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology* 2003; 32: 78–91.
59. Kim YM. y Song HG. Effect of fungal pellet morphology on enzyme activities involved in Phtalate degradation. *Journal of Microbiology* 2009; 47(4): 420-424.
60. Casas, N; Parella, T; Vicent, T; Caminal, G and Sarrà, M. 2009. Metabolites from the biodegradation of triphenylmethane dyes by *Trametes versicolor* or laccase. *Chemosphere* 75 1344–1349.
61. Keharia H y Madamwar D. Transformation of textile dyes by White rot fungus *T. versicolor*. *Applied biochemistry and biotechnology* 2002; 102-103: 99-108.
62. Grassi E, Scodeller P, Filiel N, Carballo R y Levin L. Potential of *Trametes trogii* culture fluids and its purified laccase for the decolorization of different types of recalcitrant dyes without the addition of redox mediators. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2011; 65: 635-643.
63. Skoog, D.A.; Leary J.J; Holler F. James; Principios de análisis instrumental, 5° ed.; Ed. Mcgraw-Hill (1998), págs. 353-367.
64. Fernández J, Henao L. Utilización de hongos de podredumbre blanca y fotocatalisis homogénea nanoestructurada como alternativa biotecnológica para la degradación del Negro reactivo 5 [Tesis pregrado]. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia 2007.
65. Nuñez-Valdez C. Espectroscopia Ultravioleta-Visible. Universidad de la Habana. Facultad de Química. 2010.
66. Huang, W.T; Tai, R; Hseu, R.S y Huang, C.T. Overexpression and characterization of a thermostable, pH-stable and organic solvent-tolerant *Ganoderma fornicatum* laccase in *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry* 46 2011; 1469–1474.
67. Elisashvili V y Kachlishvili E. Review: Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot Basidiomycetes. *Journal of Biotechnology* 2009; 144: 37–4

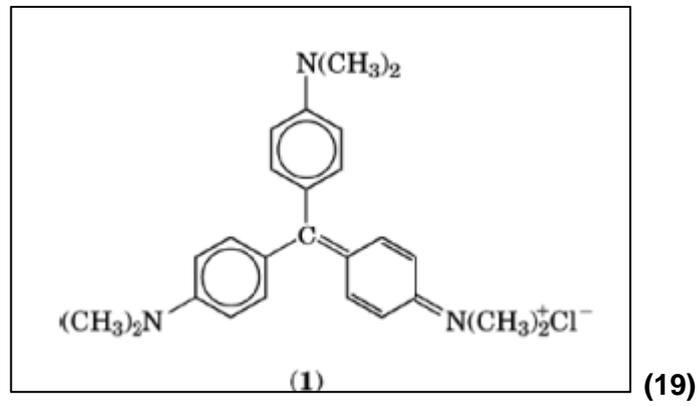
10. ANEXOS

ANEXO 1.

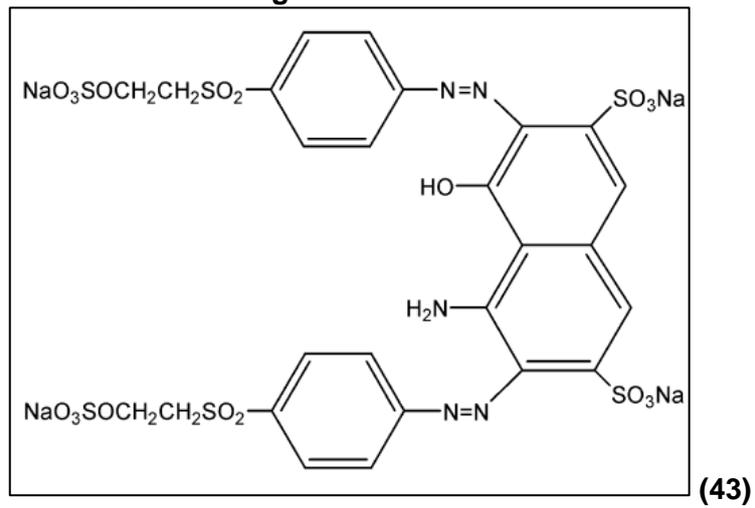
ANEXO 1A. Figura de la estructura del verde malaquita



ANEXO 1B. Figura de la estructura del cristal violeta

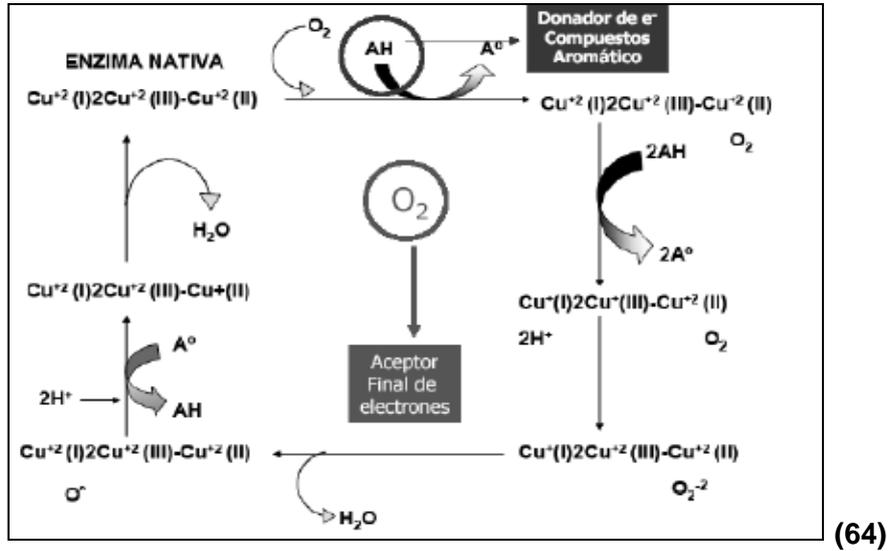


ANEXO 1C. Figura de la estructura del NR5

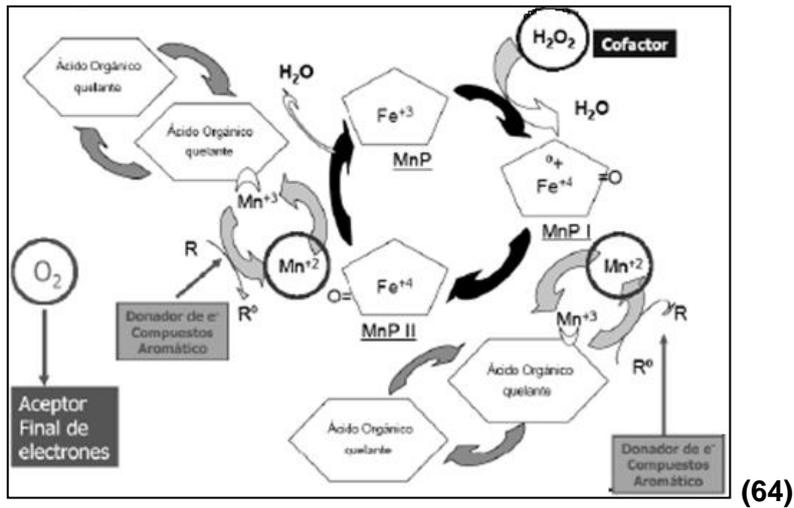


ANEXO 2

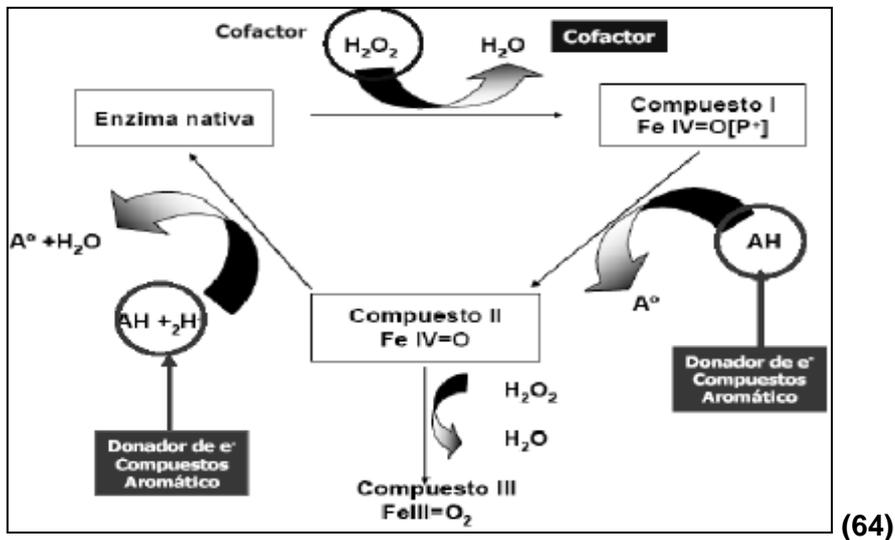
ANEXO 2A. Ciclo catalítico de lacasa



ANEXO 2B. Ciclo catalítico de MnP



ANEXO 2C. Ciclo catalítico de LiP



ANEXO 3. Composición medios de cultivo

ANEXO 3A. Composición medio extracto salvado de trigo

Glucosa	10 g L ⁻¹
Peptona	5 g L ⁻¹
Extracto levadura	2 g L ⁻¹
Salvado de trigo	175 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,1 g L ⁻¹
MgSO ₄ * H ₂ O	0,05 g L ⁻¹
MnSO ₄ * 7H ₂ O	0,076 g L ⁻¹
Cloranfenicol	0,1 g L ⁻¹
Agar	15 g L ⁻¹

(64)

ANEXO 3B. Composición medio Radha

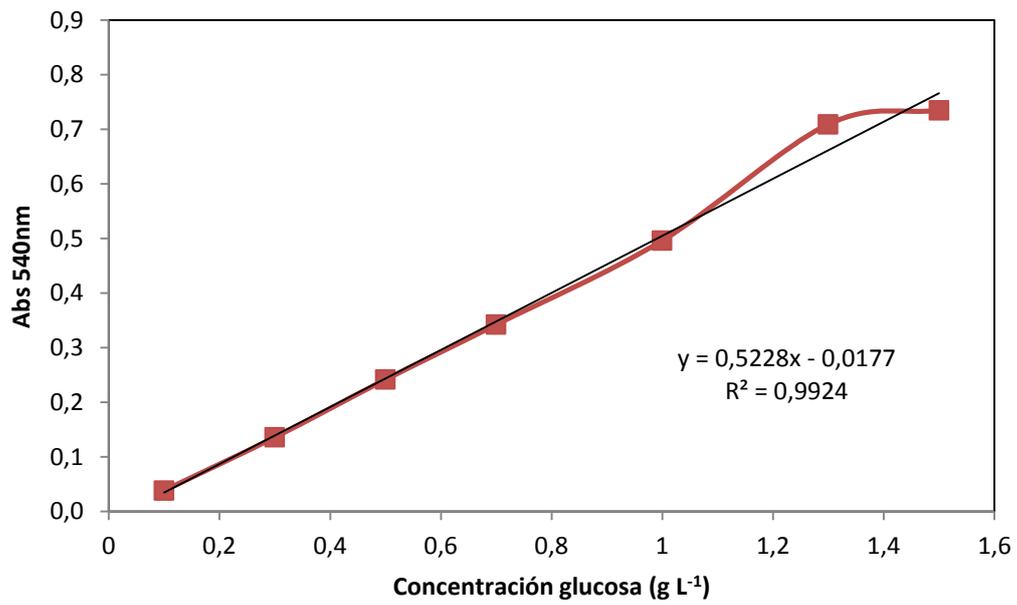
Glucosa	2 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	2 g L ⁻¹
NH ₄ CL	0,050 g L ⁻¹
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0,5 g L ⁻¹
CaCl * 2H ₂ O	0,1 g L ⁻¹
Tiamina	100 µg
Solución elementos traza	10 ml L ⁻¹
Agar	15 g L ⁻¹

Solución de elementos traza

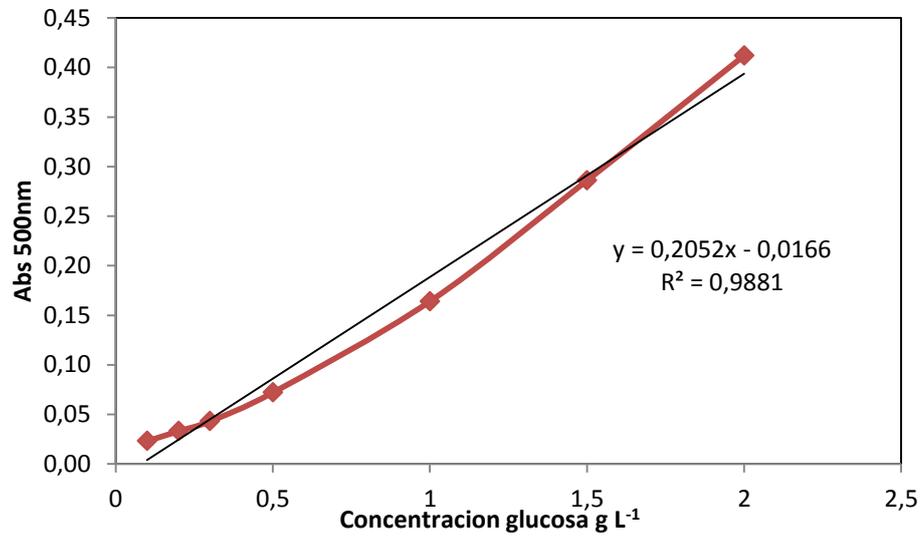
MnSO ₄	0,5 g L ⁻¹
FeSO ₄ * 7H ₂ O	0,1 g L ⁻¹
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	0,1 g L ⁻¹

(64)

ANEXO 4. Curva calibración azúcares reductores



ANEXO 5. Curva calibración glucosa oxidasa



ANEXO 6.

ANEXO 6A. Ecuación curva calibración verde malaquita

$$Y = 0,177x - 0,0524$$

$$R^2 = 0,99$$

(3)

Anexo 6B. Ecuación curva calibración cristal violeta

$$y = 0,101 + 0,013$$

$$R^2 = 0,99$$

(4)

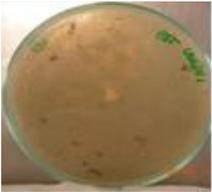
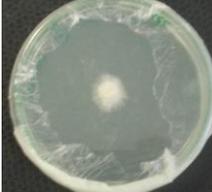
ANEXO 6C. Ecuación curva calibración Dicromato de potasio

$$y = 0,003 + 0,005$$

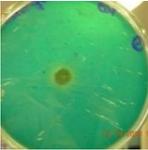
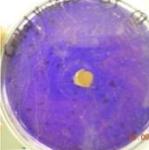
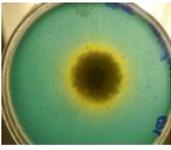
$$R^2 = 0,994$$

(5)

ANEXO 7. Crecimiento de *Ganoderma lucidum* bajo dos condiciones nutricionales en medios sólidos

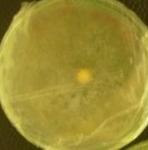
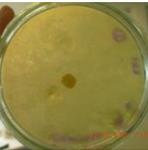
MEDIO	Extracto salvado de trigo	Radha	YGC
Inicial (Día 0)			
Final (Día 8)			

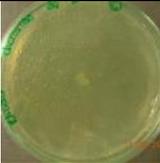
ANEXO 8. Crecimiento y halos de decoloración de *Ganoderma lucidum* en medios sólidos suplementados con colorantes (50 mg L⁻¹)

MEDIO	Extracto salvado de trigo		
	Verde malaquita	Cristal violeta	NR5
Inicial (Día 0)			
Final (Día 8)			

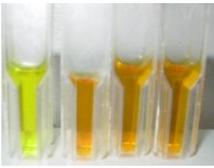
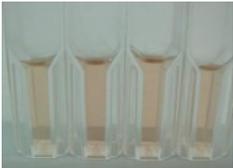
MEDIO	Radha		
	Verde malaquita	Cristal violeta	NR5
Inicial (Día 0)			
Final (Día 8)			

ANEXO 9. Crecimiento de *Ganoderma lucidum* en medios sólidos suplementados con metales pesados (50 mg L⁻¹)

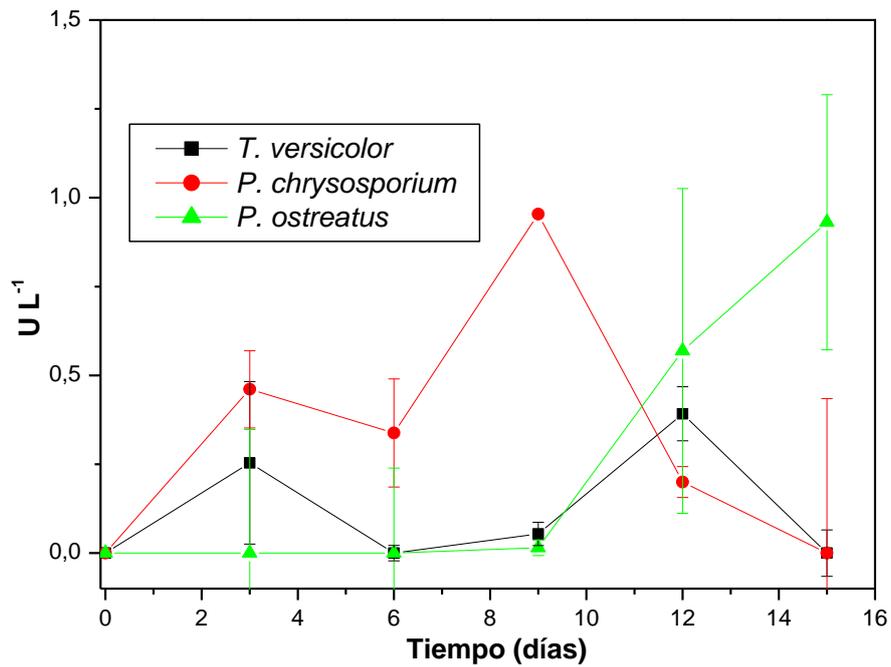
MEDIO	Extracto salvado de trigo			
	Acetato de plomo	Sulfato de cromo	Dicromato de potasio	Cloruro de mercurio
Inicial (Día 0)				
Final (Día 8)				

MEDIO	Radha			
	Acetato de plomo	Sulfato de cromo	Dicromato de potasio	Cloruro de mercurio
Inicial (Día 0)				
Final (Día 8)				

ANEXO 10. Crecimiento de *Ganoderma lucidum* en medio extracto salvado de trigo líquido

	Crecimiento	Concentración azúcares reductores (DNS)	Concentración glucosa (Glucosa oxidasa)	Lacasa (ABTS)
Inicial (Día 0)				
Final (Día 15)				

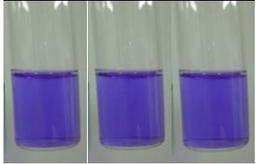
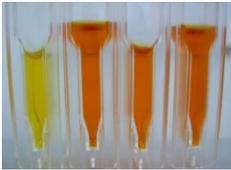
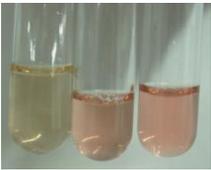
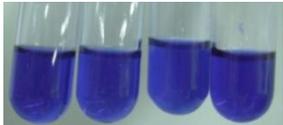
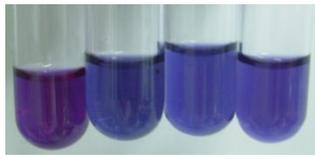
ANEXO 11. Cuantificación Manganese Peroxidasa (técnica oxidación de 2,6-dimetoxifenol) para *P. chrysosporium*, *T. versicolor* y *P. ostreatus*



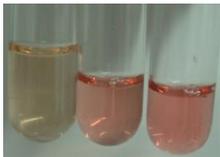
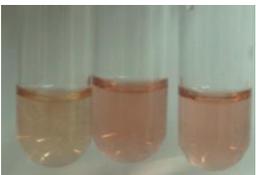
ANEXO 12. Curva de crecimiento de *Ganoderma lucidum* en medio extracto salvado de trigo líquido suplementado con verde malaquita

	Concentración colorante	Concentración azúcares reductores (DNS)	Concentración glucosa (Glucosa oxidasa)	Lacasa (ABTS)
Inicial (Día 0)				
Final (Día 24)				

ANEXO 13. Curva de crecimiento de *Ganoderma lucidum* en medio extracto salvado de trigo líquido suplementado con cristal violeta

	Concentración colorante	Concentración azúcares reductores (DNS)	Concentración glucosa (Glucosa oxidasa)	Lacasa (ABTS)
Inicial (Día 0)				
Final (Día 24)				

ANEXO 14. Curva de crecimiento de *Ganoderma lucidum* en medio extracto salvado de trigo líquido suplementado con Dicromato de potasio

	Crecimiento	Concentración azúcares reductores (DNS)	Concentración glucosa (Glucosa oxidasa)	Lacasa (ABTS)
Inicial (Día 0)				
Final (Día 24)				

ANEXO 15. Participación en eventos

ANEXO 15A. Participación en “*International Symposium on Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies*”

Preliminary treatability tests of toxic compounds (metals and dyes) with *Ganoderma lucidum*

Viviana González (viviana.gonzalez@javeriana.edu.co), Carolina Herrera (herrera-carolina@javeriana.edu.co), María Ximena Rodríguez (mxrodriguez@javeriana.edu.co) and **Aura Marina Pedroza** (apedroza@javeriana.edu.co) (Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia)

Background/Objectives

One of the main problems of textile and food industries and tanneries, around the world including Colombia, is the wastewater from the process of developing their respective products. This wastewater contains high concentrations of toxic chemicals, which produce adverse effects on the environment and human health. The need to implement systems capable of reducing this impact has been a major concern in the scientific field. In order to solve this problem, chemical and physical systems have been used, however the high cost and by-products generated have promoted the use of microorganisms that are able to degrade, adsorb or remove much of those pollutants, due to its efficiency and low cost.

One of these microorganisms capable of degrading pollutants is *Ganoderma lucidum*, a white rot fungi widely studied for its medicinal properties, but not for its enzyme profile and recalcitrant compounds removal potential, which can be used in bioremediation of effluents containing persistent compounds. Owing to this matter, the aim of this study was to evaluate the adsorption capacity and/or removal of pollutants by *G. lucidum*, including azo, anthraquinone and triphenylmethane dyes, and some heavy metals under ligninolytic and non-ligninolytic growth conditions.

Approach/Activities

One strain of *Ganoderma lucidum* from the collection of Pontificia Universidad Javeriana was used for the study. This strain was plated on wheat bran extract agar and Rhada agar, in order to evaluate its radial growth in mm for 8 and 15 days, respectively. Then, *G. lucidum* was plated on the two mentioned media, each one supplemented with dyes or heavy metals in concentrations of 50 ppm. The evaluated dyes were crystal violet (anthraquinone), malachite green (triphenylmethane) and reactive black 5 (azo). The heavy metals tested included potassium dichromate, chromium sulfate, lead acetate and mercuric chloride. In each medium the radial growth (mm) and/or discoloration halos (mm) was evaluated for 8-10 days. The results were recorded and plotted using SigmaPlot program.

Results/Lessons Learned.

G. lucidum on ligninolytic medium (wheat bran extract) grew rapidly compared to non-ligninolytic medium (Rhada), as radial growth was $86,95 \pm 3,12$ mm at 9 days and $39 \pm 2,9$ at 14 days, respectively. After the media were supplemented with dyes (crystal violet, malachite green and black R5) and heavy metals (potassium dichromate, chromium sulfate, lead acetate, mercuric chloride) at a concentration of 50 ppm, *G. lucidum* strain did not grow on Rhada agar, except on the media amended with black reactive 5, crystal violet and chromium sulfate. Under ligninolytic conditions, it was obtained a tolerance of 50 ppm result for lead acetate, potassium dichromate, chromium sulfate, black reactive 5, and removal of malachite green and crystal violet with halos of $35,6 \pm 3,33$ mm and $22,2 \pm 1,35$ mm, respectively.

