

**UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

TÍTULO: Selección de cepas de *Pleurotus sp* para el tratamiento de compuestos tóxicos y colorados presentes en residuales líquidos

TESIS EN OPCIÓN AL TÍTULO DE MASTER EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTOR: Lic. Rosa Emilia Castillo Caballero

**TUTORES: Dra. C. Camelia Jutziz Coca
M.Sc. Pedro Gross Cobas**

Consultante: M. Sc. Suyén Rodríguez

2005

“AÑO DE LA ALTERNATIVA BOLIVARIANA PARA LAS AMÉRICAS”

**UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TÍTULO: Comportamiento de cepas de *Pleurotus sp.* frente a
compuestos tóxicos.**

**TESIS EN OPCIÓN AL TÍTULO DE MASTER EN
BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL**

AUTOR: Lic. Rosa Emilia Castillo Caballero

**TUTORES: Dra. Camelia Jutziz Coca
M.Sc. Pedro Gross Cobas**

Consultante: M. Sc. Suyén Rodríguez

**2005
“AÑO DE LA ALTERNATIVA BOLIVARIANA PARA LAS
AMÉRICAS”**

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINAS
I- INTRODUCCIÓN	1
II- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
II.1 Consideraciones generales sobre el estudio de los hongos.	4
II. 2 Aspectos esenciales sobre la biología de los Hongos del Género <i>Pleurotus</i> .	9
II.2.1 Caracterización del género <i>Pleurotus sp.</i>	10
II.2.2 Ciclo de vida.	12
II.2.3 Características taxonómicas del Género <i>Pleurotus</i> .	12
II.2.4 Características biodegradativas del Género <i>Pleurotus</i> .	13
II.3 Decoloración de efluentes coloreados.	17
III- MATERIALES Y MÉTODOS.	21
III.1 Materiales.	21
3.1.1 Reactivos químicos fundamentales.	21
3.1.2 Equipamientos fundamentales.	22
3.1.3 Materiales	22
III.2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	22
3.2.1 Residual coloreado empleado	22
3.2.2 Microorganismos empleados.	23
3.2.3 Medios de cultivos.	23
3.2.3.1 Composición del Medio Basal Mínimo para el cultivo de hongos del Género <i>Pleurotus</i> (Martín y Col; 1997)	24
III.3 DISEÑO EXPERIMENTAL	24
3.3.1 Condiciones de cultivo.	24
III.4 MÉTODOS ANALÍTICOS EMPLEADOS.	26
III.5 PROCESAMIENTO ESTADÍSTICO.	27
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
a) Comportamiento de 8 cepas de <i>Pleurotus sp</i> en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa.	28
b) Comportamiento de las cepas de <i>Pleurotus sp</i> en MBM suplementado con Guayacol 10 mmol.	29
c) Comportamiento de las cepas de <i>Pleurotus sp</i> en MBM suplermentado con compuestos coloreados de caracte	30

rísticas disímiles.	
d) Tratamiento de la vinaza de destilería con <i>Pleurotus sp</i> en placas de petri y en cultivo sumergido agitado.	32
V. VALORACIÓN DEL IMPACTO AMBIENTAL	35
VI. CONCLUSIONES.	36
VII. RECOMENDACIONES	37
VIII. BIBLIOGRAFÍA	38
ANEXOS	

RESUMEN

La decoloración de efluentes coloreados por medio de hongos de putrefacción blanca, es una alternativa para disminuir la contaminación de las aguas. En el presente trabajo se estudian las potencialidades de cepas de *Pleurotus sp* para la degradación de compuestos tóxicos y coloreados presentes en el residual vinaza de destilería. En el mismo se desarrolla un screening para la selección de cepas que cumplan con las potencialidades antes señaladas. También se estudia el comportamiento de las mejores cepas seleccionadas teniendo en cuenta parámetros tales como: potencialidades para la excreción de enzimas, remoción de la demanda química de oxígeno, remoción de color y disminución de los compuestos fenólicos presentes en el residual objeto de estudio, utilizando medios de cultivos como el Agar Papa Dextrosa y el Medio Basal Mínimo suplementado con los compuestos tóxicos y coloreados a diferentes concentraciones. Las cepas de mejor comportamiento en los diferentes tratamientos fueron la 3022 y la 3026 siendo las seleccionadas para el tratamiento del residual vinaza de destilería, donde la remoción de la DQO alcanzó resultados por encima del 50 % para las concentraciones de 50 % y 75 % del residual, así como la remoción de color mostró resultados por encima del 50 % en ambas cepas, las que provocaron una disminución de los compuestos fenólicos por encima del 90 %.

I.-INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la protección del medio ambiente se convierte cada vez más, en una prioridad a tener en cuenta por el hombre, pues de la calidad del entorno depende su vida y la de los demás organismos.

Desde finales del siglo pasado se ha venido prestando gran interés a la búsqueda de solución a los problemas medioambientales y en especial, la contaminación de las aguas provocada por el vertimiento de los subproductos de las industrias. Desde julio de 1997, en Cuba se aprobó en la Asamblea Nacional del Poder Popular, la Ley 81 del Medio Ambiente, la cual ha logrado imponerse gradualmente en defensa de la naturaleza y sus recursos (CITMA, 1997).

En la mayoría de los casos, subproductos de la agroindustria representan una fuente valiosa de materia prima, que puede ser aprovechada, explotando las propiedades de los microorganismos. Este interés está determinado en gran medida por la imperiosa necesidad de encontrar nuevos procedimientos que contribuyan a mejorar situaciones tales como: el agotamiento de recursos energéticos, la escasez de alimentos y la búsqueda de soluciones a los problemas de contaminación ambiental creados por la deposición de residuos orgánicos al medio ambiente (Traba y col., 1992; Roiz y col., 1982).

Actualmente se ha incrementado el interés por el aprovechamiento integral de los residuos, y a la vez dar solución a los problemas ambientales provocados por estos desechos. Tal es el caso del cultivo de setas comestibles, aprovechando diversos residuos de la industria azucarera, (bagazo, mieles finales), residuos de la zafra cafetalera (pulpa, mucílago), la paja de arroz, residuos de cacao, bagazo de uva, residuos de algodón, etc.; que al finalizar los procesos industriales normales, provocan grandes acumulaciones que son vertidas a la naturaleza. Hay que destacar que su aprovechamiento tiene varios propósitos: la producción de alimento humano de alto valor nutritivo, la producción de alimento para animales, el empleo de los residuales finales como materia prima para la elaboración de compost y por supuesto la disminución del impacto ambiental. (GEPLACEA-ICIDCA – PNUD,1990).

Según G. Feijoo y J. L. Lema (1994) los efluentes producen tres tipos de impactos sobre el medio ambiente, ellos son: afectaciones en la demanda biológica de oxígeno (DBO), incremento de color y aumento de la toxicidad.

El color de los efluentes procede de derivados ligninícos de alto peso molecular, que no contribuyen ni a la DBO ni a la toxicidad. El tratamiento de estos mediante procesos biológicos aerobios (lodos activos) o anaerobios metanogénicos; presenta numerosas ventajas frente a los métodos químicos; por lo que se han convertido en una herramienta fundamental en la eliminación y reducción de su

carácter contaminante, habiéndose producido avances significativos en estos últimos años.

Los desechos industriales con un alto grado de color, presentan un elevado poder de bioacumulación y una baja velocidad de despolimerización que implica su acumulación a largo plazo en los lagos y bahías provocando una disminución de la luminosidad de las aguas al actuar como grupos que absorben la luz visible, lo que trae por consecuencia una disminución en la actividad fotosintética de los ecosistemas acuáticos, reduciendo el contenido de oxígeno disuelto. También estos residuales tienen un efecto tóxico sobre los peces y otros organismos marinos. (Rivera Queralt, Y., 2002).

En la actualidad se dispone de tratamientos físico – químicos para la eliminación del color alcanzándose un alto grado de remoción, pero tienen la desventaja de tener altos costos operacionales y la generación de nuevos residuos (Lema,1999). En la década del 80 se comenzó a emplear los hongos de putrefacción blanca en la decoloración de residuales, por su capacidad de degradar compuestos de estructura molecular compleja al tener un sistema enzimático ligninolítico de carácter no específico, siendo ***Phanerochaete crhysosporium*** la especie más estudiada. (Kirk,1987).

Pleurotus sp. es un hongo de putrefacción blanca muy utilizado en zonas tropicales por sus facilidades para crecer sobre una gran diversidad de residuos agroindustriales y por la calidad nutritiva y organoléptica de su cuerpo fructífero (García,1999). Este hongo ha sido investigado también por la capacidad que tiene para decolorar efluentes y degradar compuestos tóxicos (Herrera y Col.,1997). La utilización de esta especie en el tratamiento de efluentes coloreados, tales como: residuales de café, residuales de cacao, etc., pudiera ser una alternativa para la disminución del efecto contaminante de estos residuales antes mencionados, logrando de esta manera que cada una de las producciones se desarrollen con el empleo de tecnologías limpias y ecológicamente viables, por otra parte su empleo sería de gran utilidad en el tratamiento de la vinaza de destilería (efluente coloreado y fuertemente contaminante) del que se vierten diariamente a la bahía santiaguera un aproximado de 500 metros cúbicos, siendo una problemática ambiental que constituye un problema priorizado para nuestro país.

PROBLEMA:

La insuficiente degradación de forma natural de compuestos tóxicos y coloreados presentes en residuales líquidos, provoca un grado de contaminación ambiental considerable producto de su vertimiento al medio ambiente, estos residuales requieren de un tratamiento biotecnológico previo, antes de ser vertidos al entorno, que permita lograr una disminución del efecto contaminante que los mismos poseen.

Por todo lo antes expresado, este trabajo tiene como objetivos los siguientes:

OBJETIVO GENERAL:

- Seleccionar cepas de *Pleurotus sp.* con potencialidades para la degradación y decoloración de compuestos tóxicos y coloreados presentes en residuales líquidos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Seleccionar a partir del screening las cepas de mejor comportamiento frente a los compuestos tóxicos y coloreados y a la vinaza de destilería en cuanto a velocidad de crecimiento.
- Evaluar el comportamiento de las mejores cepas seleccionadas teniendo en cuenta los parámetros: **potencialidades para la excreción de enzimas, remoción de la demanda química de oxígeno, color y fenoles.**

Para darle cumplimiento a los objetivos planteados con anterioridad nos planteamos la siguiente hipótesis de trabajo.

HIPÓTESIS:

A partir del comportamiento de cepas de *Pleurotus sp.* frente a compuestos tóxicos y coloreados se puede disminuir la carga orgánica contaminante del residual vinaza de destilería que se vierte al medio ambiente.

II.-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1 CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE EL ESTUDIO DE LOS HONGOS

Los hongos son un grupo diverso de organismos unicelulares o pluricelulares que se alimentan mediante la absorción directa de nutrientes. Los alimentos se disuelven mediante enzimas que secretan los hongos; después se absorben a través de la fina pared de la célula y se distribuyen por difusión simple en el protoplasma. Junto con las bacterias, los hongos son los causantes de la putrefacción y descomposición de toda la materia orgánica. Hay hongos en cualquier parte en que existan otras formas de vida. Algunos son parásitos de organismos vivos y producen graves enfermedades en plantas y animales. La disciplina científica que estudia los hongos se llama micología.(Casadesús, 1990).

En cuanto a la clasificación de los hongos, Casadesús, (1990) plantea: “Los hongos figuraban en las antiguas clasificaciones como una división del reino Plantas (***Plantae***). Se pensaba que eran plantas carentes de tallos y de hojas que, en el transcurso de su transformación en organismos capaces de absorber su alimento, habían perdido la clorofila, y con ello, su capacidad para realizar la fotosíntesis”. En la actualidad los científicos los consideran un grupo completamente separado, que evolucionó a partir de flagelados sin pigmentos. Ambos grupos se incluyen dentro del reino Protistas, o bien se coloca a los hongos como un reino aparte, debido a la complejidad de su organización.

Hay unas cien mil especies conocidas de hongos. Se cree que los grupos más complejos derivan de los tipos más primitivos, los cuales tienen células flageladas en alguna etapa de su ciclo vital.

A pesar de que en muchos textos se emplean sistemas de clasificación relativamente complicados, los micólogos como Alexopoulos (1990), Casadesús (1990), Martínez y Col.(1985), Herrera, 1990, entre otros, utilizan por lo común un sistema sencillo. Según este sistema, los cuatro filos principales son: Oomicetes (***Oomycota***), Zigomicetes (***Zygomycota***), Ascomicetes (***Ascomycota***) y Basidiomicetes (***Basidiomycota***) y sus respectivos individuos forman oosporas, zigosporas, ascosporas y basidiosporas.

El Phylum **Aphylophorales** (en el sentido literario “ sin agalla”) es un importante grupo de **Basidiomycotas** de alrededor de 2 000 especies descritas, dentro del cual tenemos al Orden **Pleurotales** que incluye la familia **Pleurotacea** (**Pleurotus, Faerbeia, Lentinus, Panus y Phyllotopsis**) (Thon y Royse, 1999; Isikhemhen y col.,2000). El Género **Pleurotus**, según los estudios realizados de Secuencia de Comparación, corresponde a los agaricales por lo que se da el nombre literal de “ hongo con agalla” de un linaje sencillo (**Agaricales sensu stricto o engaricus**) que comprende setas y champiñones. Cerca de 14 especies de agaricus son cultivados para alimentos; de estos 6 son crecidos a escala industrial. Los que incluyen a la seta **Enoshiitake (Flamulina o Veluptipe)**, el **Shiitake (Lentinus edodes)**, al hongo de los pastos (**Agaricus brunnescens y A. bitorquis**) y el hongo ostra (**Pleurotus ostreatus**). (Hibbet y col., 1997). Estos son muy comunes en la naturaleza ya que crecen y se desarrollan en todos los medios.

Difieren de los otros hongos en que ellos producen sus esporas (basidiosporas) en el exterior de una estructura especializada, **el basidio**. Las basidiosporas son generalmente uninucleadas y haploides, aunque también se pueden encontrar binucleada homocariótica. Son el resultado de la plasmogamia, cariogamia y meiosis, ocurriendo las dos últimas en el basidio. En general podemos encontrar los basidiomicetos desarrollándose saprobióticamente en lugares húmedos en bosques en troncos y ramas en descomposición, fundamentalmente debajo de la corteza, en hojas muertas o en otro tipo de materia orgánica. (Gross, 2001)

El micelio de los basidiomicetos está constituido por hifas septadas bien desarrolladas que penetran en el sustrato y absorben los nutrientes, son normalmente de color blanco, amarillo brillante o naranja que a veces se extiende en forma de abanico. En algunos representantes forman cordones de micelios denominados rizomorfos. Estos, se encuentran envueltos por una capa o corteza y se comportan como una unidad (Alexopoulos, C.,1990). En el micelio los septos se forman rápidamente y lo dividen en compartimentos uninucleados. En algunas especies la formación del septo comienza al completarse la primera división del núcleo de la espora, de ahí que el micelio primario sea septado y uninucleado desde el principio (Casadesús, 1990).

La mayoría de los hongos se reproducen por esporas, diminutas partículas de protoplasma rodeado de pared celular. El champiñón silvestre puede formar doce mil millones de esporas en su cuerpo fructífero; así mismo, el pedo o cuesco de lobo gigante puede producir varios billones. Las esporas se forman de dos maneras. En el primer proceso, las esporas se originan después de la unión de dos o más núcleos, lo que ocurre dentro de una o de varias células especializadas. Estas esporas, que tienen características diferentes, heredadas

de las distintas combinaciones de genes de sus progenitores, suelen germinar en el interior de las hifas. Los cuatro tipos de esporas que se producen de esta manera (oosporas, zigosporas, ascosporas y basidiosporas) definen los cuatro grupos principales de hongos. Las oosporas se forman por la unión de una célula macho y otra hembra; las zigosporas se forman al combinarse dos células sexuales similares entre sí. Las ascosporas, que suelen disponerse en grupos de ocho unidades, están contenidas en unas bolsas llamadas ascas. Las basidiosporas, por su parte, se reúnen en conjuntos de cuatro unidades, dentro de unas estructuras con forma de maza llamadas basidios.

El otro proceso más común de producción de esporas implica la transformación de las hifas en numerosos segmentos cortos o en estructuras más complicadas de varios tipos. Este proceso sucede sin la unión previa de dos núcleos. Los principales tipos de esporas reproductivas formadas así son: oídios, conidios y esporangiosporas. Estas últimas se originan en el interior de unos receptáculos, parecidos a vesículas, llamados esporangios. La mayoría de los hongos producen esporas sexuales y asexuales.

En la mayoría de los hongos las paredes de las hifas están compuestas principalmente por quitina y algunas hemicelulosas. La celulosa, que está presente sólo en unos pocos grupos de hongos, es característica de los oomicetes. La proporción de agua de los hongos mucilaginosos generalmente es mayor del 90%. Las esporas pueden tener menos del 50% de agua; otras estructuras de resistencia, tales como los esclerocios, contienen aún menos. Los hongos requieren oxígeno para su crecimiento, así como grandes cantidades de agua y de hidratos de carbono u otras fuentes de carbono. La mayoría de los hongos utilizan azúcares como la glucosa y la levulosa (D-fructosa), pero algunos usan otros compuestos orgánicos como alimento, según su capacidad para sintetizar las enzimas adecuadas. Ciertas micorrizas toman directamente el nitrógeno de la atmósfera; sin embargo, todos los demás hongos lo obtienen de nitratos, sales de amonio u otros compuestos orgánicos o inorgánicos de nitrógeno. Los hongos, además, precisan otros elementos como potasio, fósforo, magnesio y azufre. También son necesarios, aunque en muy pequeñas cantidades, hierro, manganeso, cobre, molibdeno, zinc y galio; así como factores de crecimiento. Determinados hongos son deficitarios, al menos en parte, en uno o más factores de crecimiento.

Estos organismos requieren oxígeno para su crecimiento, así como grandes cantidades de agua y de hidratos de carbono u otras fuentes de carbono. La mayor parte de ellos utilizan azúcares como la glucosa y la levulosa (D-fructosa), pero algunos usan otros compuestos orgánicos como alimento, según su capacidad para sintetizar las enzimas adecuadas (Scagel, y col.,1985; Ortega, 1990; Queralt, 2000). Ciertas micorrizas toman directamente el nitrógeno de la atmósfera; sin embargo, todos los demás hongos lo obtienen de nitratos, sales de amonio u otros compuestos orgánicos o inorgánicos de nitrógeno. Además,

precisan otros elementos como potasio, fósforo, magnesio y azufre. También son necesarios, aunque en muy pequeñas cantidades, hierro, manganeso, cobre, molibdeno, zinc y galio; así como factores de crecimiento. Determinados hongos son deficitarios, al menos en parte, en uno o más factores de crecimiento. (Álvarez, 2004)

En la **Tabla No.1** se presenta un resumen acerca de algunas de las sustancias esenciales empleadas por los basidiomicetos en su función fisiológica.

El glucógeno, sustancia relacionada con el almidón y con la dextrina, es la reserva de hidratos de carbono más común en los hongos. Además, algunos hongos forman polisacáridos y alcoholes polihidroxílicos, como el manitol y la glicerina. Otros producen proteínas y grasas en abundancia. Muchos hongos sintetizan ácido oxálico y otros ácidos orgánicos, como cítrico, fórmico, pirúvico, succínico, málico y acético; la producción de ácido láctico sólo la realiza una familia de hongos. Otros productos del metabolismo fúngico son compuestos de azufre, sustancias que contienen cloro y numerosos pigmentos. Unos cuantos hongos tienen la facultad de formar compuestos volátiles de arsénico cuando crecen sobre sustratos que lo contienen(Martínez,1985).

Morales, 1989 hace un estudio sobre la presencia de numerosos hongos en ríos y arroyos contaminados. Estos participan en la purificación natural de las aguas residuales. Compartimos el criterio expresado y asumimos como importante la efectividad de la acción biológica de los hongos en la degradación de diferentes compuesto tóxicos en residuales líquidos, al margen podemos expresar que algunas especies de hongos son de especial interés, ya que además de su poder degradativo pueden también causar enfermedades en los seres vivos.

El suelo es el medio ambiente típico de los hongos saprofitos, los cuales viven sobre restos orgánicos. También contiene hongos parásitos que pueden infectar a plantas y animales. Numerosos hongos descomponen la celulosa y las proteínas; de esta manera, toman parte activa en la formación del humus.(Brock, M., 1994)

Las enzimas de los hongos pueden actuar sobre una gran variedad de sustancias. Un grupo de enzimas, llamado el complejo zimasa, permite a las levaduras llevar a cabo la fermentación alcohólica. Otras enzimas, como la protopectinasa, la pectasa y la pectinasa, hidrolizan los compuestos pectídicos que hay en las capas medias de las paredes celulares de las plantas. La amilasa, celobiasa, citasa, dextrinasa, invertasa, lactasa, maltasa, proteasa y la tanasa son también enzimas producidas por los hongos (Enciclopedia ENCARTA,2005).

Las enzimas hidrolíticas de los hongos se utilizan en diversos procesos industriales (Lema.J, Feijoo, G., 1996). Cuando crecen sobre salvado caliente de trigo o de arroz, algunas especies fúngicas producen una amilasa que se usa en la fermentación alcohólica (Queralta, 2000). Las proteasas que se obtienen de otros hongos se emplean en la fabricación de pegamento líquido. La producción industrial de alcohol etílico (etanol) se realiza por fermentación de melaza de caña de azúcar o de almidón hidrolizado mediante enzimas formadas por otros hongos. En el proceso de elaboración del pan se añade levadura a la masa para producir dióxido de carbono.

Los hongos se utilizan en la producción industrial de ácido cítrico, de ácido glucónico y de ácido gálico, que todavía se emplea en la fabricación de tintas y colorantes. Algunas resinas se elaboran a partir de ácido fumárico formado por el moho negro del pan. El ácido giberélico, que provoca aumento del crecimiento de las células vegetales, lo produce un hongo que causa una enfermedad en las plantas de arroz. Grasas y aceites que se utilizan comercialmente se obtienen de especies de varios géneros y también hay una especie que es una fuente práctica de proteínas comestibles. La vitamina D se forma al irradiar el ergosterol, una sustancia obtenida a partir de los residuos de la levadura de cerveza. Cierta hongo, semejante a las levaduras, proporciona riboflavina; la biotina se acumula durante el proceso de producción de ácido fumárico por parte de otro hongo. También se utilizan organismos fúngicos en la elaboración del queso Roquefort, así como en la maduración del queso Camembert. (Enciclopedia ENCARTA, 2004)

Los hongos se han utilizado en medicina desde tiempos remotos. El uso de hongos como purgantes ya no es tan común; sin embargo el alcaloide presente en el esclerocio del cornezuelo del centeno se emplea para conseguir contracciones uterinas durante el parto. De los alcaloides del cornezuelo se obtiene también la dietilamida del ácido lisérgico, más conocida como LSD, la cual provoca efectos alucinógenos. La utilización de los antibióticos en la práctica médica comenzó cuando se descubrieron las propiedades antibióticas de la penicilina. Hoy se fabrican muchos antibióticos a partir de microorganismos que no son hongos. La griseofulvina, sin embargo, es un antibiótico antifúngico producido por varias especies de un género de hongos. (Martínez, 1994)

II.2 ASPECTOS ESENCIALES SOBRE LA BIOLOGÍA DE LOS HONGOS DEL GÉNERO *Pleurotus*.

Los hongos comestibles tuvieron gran importancia en la forma de vida y en el desarrollo de las sociedades recolectoras – cazadoras del período preneolítico. En la literatura etnográfica mundial se encuentran evidencias sobre el consumo de hongos comestibles en la América prehispánica, plasmados en códigos indígenas y en las descripciones de misioneros y soldados españoles del Siglo XVI (Villareal y Pérez, 1989). Los Mayas del período 200 a.c. a 200 ó 300 a.c., muy probablemente tuvieron relación con especies de hongos comestibles y alucinógenos según las estatuillas de piedra en forma de hongos superiores producidas por ellos en ese período (Ulloa, 1998).

Los primeros estudios europeos sobre hongos comestibles corresponden a Eurípides (485 – 406 a.c.), Teofrasto (372-283 a.c.) y Plinio (27-79 d.c.).

En Roma hacia el año 185 a.c. se refirió a los macromicetos como el maligno fermento de la tierra; también han sido llamados excrescencias de la tierra y plantas bastardas (Rambotton, 1949). En Europa no se distinguieron los hongos agaricales, poliporales y tuberales hasta finales del Siglo XV, época de la primera impresión del Manual de Herbolaria y del auge de las ilustraciones de hongos. Todavía en 1650, Jean Bahuin, autor de parte del Volumen 3 de la obra micológica ilustrada: Historia Plantarum Universales, denomina a los hongos excrementos de la tierra (Ulloa, 1998). Seguramente el nombre de ***Amanita caesarease*** deriva de la tradición gastronómica de los romanos quienes disfrutaban de su consumo y el de otras setas, tradición que se perdió con la caída del imperio romano (Rambotton, 1949). Según Zadrazil (1978), ***Pleurotus ostreatus*** se cultivó en varias regiones de Europa desde 1900 siendo parte de las “seis grandes setas cultivadas”: ***Agaricus***, ***Lentinula***., ***Auricularia***, ***Volvariella***, ***Flammulina*** y ***Pleurotus***. Pero según García (1978), ***P. ostreatus*** no se cultivó en Europa hasta después de 1960, aunque desde antes se cosechaba para consumo, se recogían de los troncos de los árboles en descomposición que muchas veces se arrimaban a las viviendas donde se les proporcionaba condiciones para la producción de carpóforos. Posteriormente su cultivo se inició en Francia, Hungría, Italia y Checoslovaquia sobre troncos que se incubaban en zanjas y luego se sometían a riegos para obtener los cuerpos fructíferos.

A principios de los años 90, ***P. ostreatus*** ocupaba el segundo puesto entre los más cultivados en el mundo (Shuting,1991); cinco años después, el 24 % de la producción de hongos comestibles en el mundo correspondía a ***P. ostreatus*** y otras especies relacionadas (Matsumoto, 1996). Según Miles y Shuting, 1997, la producción total de ***Pleurotus sp*** en la última década del Siglo XX superó las 25 000 toneladas.

Desde el punto de vista nutricional estas especies contienen cantidades moderadas de proteína de buena calidad, y representan una buena fuente de proteína dietética, vitamina C, vitaminas del complejo B y minerales. Los niveles de lípidos son bajos y la relación de ácidos grasos saturados e insaturados es baja, cerca de 2,0 – 4,5: 1 (Brune, 1990).

En el campo de la Biotecnología Ambiental, actualmente se está experimentando el empleo de *Pleurotus sp.* en la biodegradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos y ya se ha demostrado su capacidad para degradar pireno, benzoantroceno y benzopireno, y podría ser promisorio para solucionar problemas de derrames de petróleo (Wolter y Col.,1997).

Existen antecedentes sobre la utilización de diversas especies de hongos capaces de degradar residuos agroindustriales como son pajas de trigo, cebada, maíz, etc., los cuales son ricos en compuestos ligninocelulósicos, estos últimos representan un grave problema de contaminación. Los hongos del genero *Pleurotus* son organismos cuya fase vegetativa puede ser obtenida relativamente fácil a nivel laboratorio, son clasificados como hongos de pudrición blanca por su capacidad de degradación de lignina, celulosa y hemicelulosa. Estos hongos producen gran cantidad de enzimas fenol-oxidasas, las cuales son responsables de la degradación de lignina. Las lacasas son enzimas fenol-oxidasas, mismas que son de gran importancia en la biorremediación del medio ambiente, ya que oxidan algunos compuestos fenólicos (considerados altamente cancerígenos), llegando incluso a polimerizarlos, provocando así su precipitación eliminándolos de las aguas contaminadas por la industria petroquímica, textilera, de colorantes y pinturas, entre otras.

II. 2.1 CARACTERIZACIÓN DEL GÉNERO *Pleurotus sp*

Pleurotus sp. es un grupo de hongos de putrefacción blanca muy utilizado en zonas tropicales por su capacidad de crecer sobre una gran diversidad de residuales agroindustriales y por la calidad nutritiva y organoléptica de sus cuerpos fructíferos (García, 1999). Este hongo ha sido investigado también por su capacidad para decolorar efluentes y degradar compuestos tóxicos (Guzmán, 1993, Herrera y col., 1997, Queralta, 2000, Sánchez y Royse, 2002, Álvarez, 2004).

Estos hongos los encontramos en la naturaleza en forma de ostra, conocido en México como oreja de cazahuate, oreja blanca y hongo de maguey, tiene sabor a marisco y normalmente se prepara rebozado en huevo y frito. Este hongo crece en racimos, en forma de repisas o ménsulas sobre los troncos de árboles podridos, y

casi no tiene pie. El sombrero es tierno y carnoso, tiene un diámetro entre 8 y 13 cm y es de color aceituna en su etapa inicial aunque adquiere un color crema con posterioridad. Abunda en otoño y primavera.

Según Chang (1991), el número de especies de hongos comestibles, es de aproximadamente 2 000, incluidas en más de 30 géneros. La producción mundial de hongos comestibles entre 1989 – 1990, fue de 3 763 000 toneladas, decreciendo la producción de *Agaricus bisporus* y de *Lentinus edodes*, como consecuencia de la producción de otras especies, como las de *Pleurotus*, que alcanzó el 24.1% en este período.

A este género pertenecen varias especies de hongos de putrefacción blanca. Los hongos ostras son ahora ampliamente cultivados sobre pajas de cereales y otros residuales vegetales. Actualmente, cerca de un millón de toneladas se están produciendo anualmente en países como Japón, Corea del Sur, Singapur, Filipinas, EE.UU., Alemania, Bélgica y Holanda.

La producción está aumentando significativamente asociado a:

- ✓ Una tecnología simple en comparación con *A. bisporus*.
- ✓ La posibilidad del uso de un amplio rango de desechos (residuos de café, paja de trigo, bagazo de caña de azúcar).
- ✓ Se puede producir en temperaturas como las tropicales.
- ✓ Además, el uso de desechos agrícolas es una de las alternativas saludables, empleadas en nuestros días de manera sostenible, para evitar incorporarlos al medio ambiente. (Klibansky, 1993 y García, 1999).

En la naturaleza el crecimiento es fundamentalmente en zonas de temperaturas naturales o en zonas subtropicales frías, por ejemplo en las raíces de árboles, en general tienen un fragante y delicioso sabor.

El crecimiento microbiológico de estos a escala de laboratorio nos indica, tal y como lo refieren Martínez y col.(1989), que las cepas de hongos del género *Pleurotus* presentan un crecimiento típico de hongos filamentosos cuando son cultivados en medios de cultivos convencionales como es el caso del Agar Papa Dextrosa (APD), en pocos días se produce una colonia de contorno circular la que va creciendo a una velocidad dependiente de la cepa utilizada, de la naturaleza del medio de cultivo y de los factores ambientales. El incremento del diámetro de la colonia se puede medir fácilmente en la placa de Petri; sendo utilizado el mismo en estudios de interés investigativo sobre el crecimiento y desarrollo de los hongos. En el desarrollo de la colonia se podrán distinguir caracteres como son: el color, el tamaño y el aspecto. (Martínez y Col. 1989).

II.2.2 CICLO DE VIDA

El micelio de la mayoría de los basidiomicetos como los hongos del género ***Pleurotus*** pasa por tres estadios de desarrollo diferentes que son: micelio primario, secundario y terciario.

Su ciclo de vida comienza con la germinación de las basidiosporas, las cuales originan el micelio primario, es decir, un conjunto de hifas septadas uninucleadas con capacidad de crecimiento indefinido, las cuales se dividen muchas veces a medida que el tubo germinativo emerge y comienza a crecer, esta fase multinucleada de micelio primario es corta debido a que los septos se forman rápidamente y dividen el micelio en compartimentos uninucleados por lo que se hace necesaria la fusión de dos micelios secundarios o dicarióticos. Este se caracteriza por presentar hifas septadas con dos núcleos y por la presencia de estructuras en forma de ganchos, llamadas fíbulas, las que permiten mantener el estado dicariótico del micelio (Arias, 1998).

El micelio dicariótico es capaz de mostrar crecimiento indefinido, se desarrolla abundantemente y esta masa es la que constituye el verdadero hongo de la cual se forman uno o muchos cuerpos fructíferos, en los cuales en su himenio terminará la reproducción sexual, en ciertas condiciones ambientales y por control genético (ciclo sexual), se induce la formación del micelio terciario o cuerpo fructífero, en el que se forman los basidios, estructuras de reproducción sexual en la cual ocurre la cariogamia y rápidamente sufre la división reductora para la formación de 4 esporas en cada basidio y así completar el ciclo (Shan-Thiny, 1989).

II.2.3 CARACTERÍSTICAS TAXONÓMICAS DEL GENERO ***Pleurotus***.

Existe una gran configuración taxonómica del **Género *Pleurotus***, especialmente para aquellas especies que pertenecen al complejo ***Pleurotus ostreatus***. El problema reside en que existe una gran variabilidad morfológica que puede ser atribuida a muchos factores, tales como: condiciones ambientales, plasticidad fenotípica y variaciones genotípicas, según Bridge y Arora (1998).

Según Arias (1998), el **Género *Pleurotus*** se puede dividir en cuatro secciones, corroboradas mediante variaciones isoenzimáticas con un total de 39 especies. En la actualidad por medio de apareamiento y estudios moleculares, donde se utilizó la subunidad ribosomal más grande, encontraron una correlación entre este ADN y los grupos de interestabilidad, identificaron 25 especies biológicas, donde a cada una se le asocia con una o más especies morfológicas.

II.2.4 CARACTERÍSTICAS BIODEGRADATIVAS DEL GENERO *Pleurotus*.

Los basidiomicetos pueden degradar una amplia gama de compuestos orgánicos elaborados por el hombre, como los plaguicidas, aunque no se sabe si lo utilizan como fuente de carbono o energía, son relativamente pocos los que por determinadas razones son capaces de utilizar los hidrocarburos y los polímeros más complejos como la lignina y queratina (Hawksworth, D.L.,1996).

La propuesta de solución a la problemática de contaminación y la necesidad de búsqueda de nuevas alternativas para el aprovechamiento de los residuales agroindustriales, han permitido la implementación de aplicaciones biotecnológicas, que permitan dar solución al problema. Se sabe que *Pleurotus* es capaz de degradar selectivamente la lignina, es por eso que se ha seleccionado como un organismo modelo, por sus características morfológicas y fisiológicas, unido al hecho que es el hongo de putrefacción blanca más estudiado. (Álvarez, 2004)

El cultivo de hongos de pudrición blanca, como *Pleurotus sp*, permite la degradación de lignina más extensa y rápidamente que otros grupos de organismos conocidos. Este hongo es capaz de metabolizar y mineralizar hidrocarburos policíclicos aromáticos (Bezalel, 1992) y colorantes artificiales causantes de contaminación ambiental en industrias textiles (Montaris, 1995).

El proceso de fabricación de los diferentes productos textiles a partir de la lana, algodón y fibras sintéticas se lleva a cabo mediante una serie de etapas que son: chamuscado, desapretado, restregado acústico, blanqueo, mercerizado, teñido, estampado y acabado. Aunque la mayoría de las etapas del proceso contribuyen a la contaminación, es sin duda el restregado, teñido y acabado las etapas que en mayor medida provocan contaminación ambiental. El teñido influye de manera significativa en el parámetro **color** de los residuales generados. La Industria Textil genera, de los procesos de teñido y estampado, enormes volúmenes de agua residual con elevado contenido de colorantes y otros compuestos altamente contaminantes; por lo que el tratamiento del agua de desecho puede ser muy complejo debido a la presencia de productos químicos recalcitrantes. (Kuppusamy y Briones, 1997)

Los colorantes que se utilizan con más frecuencia se clasifican en tintes reactivos, tintes metálicos, dispersos, básicos directos y mordientes. De estos, sin duda se les ha prestado mayor atención a los colorantes que presentan compuestos azo, cuya característica principal consiste en el enlace insaturado de dos moléculas de nitrógeno (N=N). Su tratamiento y biodegradación total es de gran importancia para la salud pública, debido a que los productos intermediarios de la degradación de muchos tintes azo (benzidina, 2-naftalamina y otras aminas aromáticas) son carcinógenos o de algún modo, tóxicos. (Anliker, 1997)

Por presentar un sistema enzimático ligninolítico no específico, *Pleurotus* es empleado en la biodegradación de compuestos tóxicos con la finalidad de transformarlos a formas compatibles con los ecosistemas y poder ser asimilados en los ciclos naturales. La extracción de fenoloxidasa de *Pleurotus sp.*, para la remoción de fenoles coloreados (2- clorofenol, 2,4-diclorofenol) demuestran el gran potencial de estos para el tratamiento de contaminantes fenólicos clorados (Mungia y col., 1997).

Por la necesidad de degradar la lignina de los sustratos industriales, para que sean asimilados por los rumiantes en la dieta, además por la posibilidad de aprovechar toda la celulosa que queda retenida por la glucosa; se han realizado estudios sobre la producción de ligninasa de *Pleurotus* para posteriores estudios de sus actividades oxidativas en sustratos lignocelulosicos. El crecimiento sobre pulpa de café demuestra que *Pleurotus* es un reductor del contenido de cafeína en el sustrato (García, 1999). Según Álvarez (2004) el ELP sin diluir y suplementado es biodegradable por hongos del género *Pleurotus sp.*, obteniéndose elevados porcentajes de remoción de la carga orgánica (DQO), disminución de color, degradación de fenoles y adecuados valores en la obtención de la biomasa. También se ha demostrado su capacidad de crecer en bagazo de caña y producir a su vez lacasa (GEPLACEA- ICIDCA – PNUD,1990, Ustariz y col., 1997). Asumimos como positivo el poder degradativo de hongos del género objeto de investigación para el tratamiento de residuales líquidos como la vinaza de destilería.

El bioblanqueo de pasta Kraft delignificado por *Pleurotus*, en un 74%, fue reportado por Moreira y Sierra, (1995) por lo que su empleo en la industria de pasta y papel es recomendable, lo que permitirá eliminar o atenuar al menos el gran efecto contaminante de esta etapa para el medio ambiente.

Este hongo ha sido empleado en la biorremediación de suelos, para disminuir el contenido de hidrocarburos poliaromáticos (Eggen, 1998), en pretratamientos para mejorar la digestibilidad de residuos lignocelulósicos empleados en la alimentación animal (Keren y Hadar,1998), en procesos de biopulpeo de las industrias papeleras (Feijó y Lema, 1995), en la decoloración de colorantes industriales (Palma y col, 1998), entre otros. Este hongo comestible se ha usado además, como fuente para la obtención de enzimas empleadas en la decoloración de melazas y en la remoción de fenoles.(Queralta, 2000)

Entre los compuestos coloreados, a decolorar por los hongos del género *Pleurotus*, en esta investigación se ensayan el azul de metileno y el rojo fenol.

Un colorante es cualquier producto químico perteneciente a un extenso grupo de sustancias, empleados para colorear tejidos, tintas, productos alimenticios y otras sustancias. En la moderna terminología industrial se amplía el concepto de colorantes a los productos que contienen colorantes orgánicos puros junto con agentes reductores o de relleno que los hacen más manejables. Los colorantes no

deben confundirse con los pigmentos, que son sustancias polvorosas de color que precisan mezclarse con agentes adhesivos antes de aplicarse a una superficie.

El color de los compuestos orgánicos depende de su estructura. Generalmente, los compuestos empleados como tintes son productos químicos orgánicos insaturados. La característica del color es especialmente notable en productos químicos que contienen ciertos grupos insaturados bien definidos. Estos productos químicos, conocidos como cromóforos (portadores de color), tienen diferentes capacidades para dar color.

Los colorantes han de tener la capacidad de penetrar y colorear los tejidos y otros materiales. Los radicales químicos llamados auxocromos, tienen la propiedad de fijar eficazmente el colorante deseado. Se trata de ácidos y bases que originan colorantes ácidos y básicos. En algunos compuestos, la presencia de un grupo auxocromo puede colorear compuestos incoloros.

La materia prima básica de los colorantes sintéticos son compuestos que, como el benceno, se derivan de la destilación seca o destructiva del carbón. Por eso estos colorantes se conocen a menudo popularmente como colorantes de alquitrán de hulla. A partir de la materia prima se elaboran productos intermedios mediante diversos procesos químicos que, normalmente, implican la sustitución de elementos específicos o radicales químicos por uno o más átomos de hidrógeno de la sustancia básica.

Los colorantes pueden clasificarse atendiendo a sus aplicaciones o por su estructura química. La clasificación química suele determinarse por el núcleo del compuesto. Entre los grupos más importantes de colorantes están los azocolorantes, que incluyen el amarillo mantequilla y el rojo congo; los trifenilmetanos, que incluyen el color magenta y el violeta metilo; las ftaleínas; las azinas, que incluyen el color malva, y las antraquinonas, que incluyen la alizarina. Otro grupo importante lo constituyen las ftalocianinas, de color azul o verde, con una estructura química semejante a la clorofila. Los azocolorantes son los más empleados. (**Biblioteca de Consulta Microsoft ® Encarta ® 2005**)

El **azul de metileno** es un colorante artificial básico que desde el punto de vista químico deriva de la fenotiacina, que se obtiene, entre otros métodos, a partir de la para- amino- dimetilanilina, el sulfuro de hidrógeno y el cloruro férrico que actúa como agente oxidante. Es un colorante muy valioso utilizado en biología para teñir ciertas partes de la materia viviente permitiendo de este modo su diferenciación, es considerado un colorante vital, en medicina se ha empleado como un desinfectante en el tratamiento de las vías urinarias y como un fuerte analgésico. No presenta toxicidad elevada; pero si cierta propiedad recalcitrante para ser decolorado por los microorganismos, como es el caso de los hongos.(Kourí, 1987).

En la **tabla No. 2** se muestran los datos físico – químicos para este compuesto. Por su composición química este compuesto ha sido valorado como un producto inhibitorio del crecimiento y desarrollo de microorganismos cuando este se encuentra a altas concentraciones. Presenta anillos bencénicos, es muy soluble en agua, por lo que es capaz de colorear fuertemente aguas de desechos industriales. En la **figura No. 1** se muestra detalladamente su fórmula química.

El **rojo fenol** denominado también Fenolsulfonateína, es un compuesto fuertemente coloreado, empleado como indicador de pH, el mismo varía su tonalidad de color cuando varía el pH, es decir, cuando el medio donde él se encuentra es un medio ácido, adquiere color amarillo; sin embargo en un medio alcalino su coloración es roja.

A diferencia del azul de metileno, el rojo fenol presenta en su estructura química anillos fenólicos, los que hacen que sea un compuesto con una elevada nocividad, muy irritante y tóxico. Es soluble en agua y presenta una residualidad elevada. En la **tabla No. 3** se muestran sus datos físico – químicos y en la **figura No. 2** se detalla su estructura química.

Entre los compuestos tóxicos tratados en la investigación tenemos el **endosulfán** que es un insecticida del grupo de los organoclorados, los que presentan cloro en su molécula. Agrupan a un considerable número de compuestos sintéticos, cuya estructura química corresponde a los hidrocarburos clorados.

El endosulfán es un pesticida. Es un sólido de color crema a pardo en forma de cristales o escamas. Tiene un olor parecido a trementina, pero no se incendia. No se encuentra de forma natural en el medio ambiente. El mismo es usado para controlar insectos tanto en cosechas comestibles como no-comestibles, y también como preservativo para madera. En la **tabla No. 4** se presentan los datos físico – químicos y sus denominaciones.

Su baja presión de vapor, su gran estabilidad físico-química condiciona que la persistencia de estos plaguicidas en el ambiente sea elevada.

Este es liposoluble, con baja solubilidad en agua y elevada solubilidad en la mayoría de los disolventes orgánicos. Tiene estructura cíclica, en general, poseen una alta estabilidad química, una notable resistencia al ataque de los microorganismos y tienden a acumularse en el tejido graso de los organismos vivos, en el suelo y las capas subterráneas.

El endosulfán se obtiene a partir del hexaclorociclopentadieno, mediante la reacción de Diels-Alder con butinediol, seguido de ciclización con cloruro de tionilo.

El consumo de cantidades importantes del mismo en el medio agrícola ha provocado que su presencia medio ambiental sea cada vez más frecuente. En

aquellos trabajos en los que se ha buscado expresamente la persistencia de endosulfán como contaminantes de alimentos, aguas, aire o suelos se ha puesto de manifiesto que hoy día ocupa uno de los primeros lugares en cuanto a concentración y porcentaje de muestras positivas, en muchos casos comparable a la positividad del DDT y sus metabolitos. De hecho los informes científicos sobre la presencia de este pesticida en medio ambiente son un tanto preocupantes. Por ejemplo, es el pesticida más frecuentemente encontrado en el análisis de aguas superficiales realizado en Almería (Fernández Alba y col., 1998) y en la Comunidad Valenciana (Hernández y col., 1996). En el primero de los casos, los estudios de vigilancia llevados a cabo en tierras almerienses durante un año sirvieron para demostrar la presencia y cuantificar la concentración ambiental del endosulfán alfa, beta y sulfato que se mueve en el rango de 0.5-540 mg/l (Penuela y Barceló, 1998). Estos datos parecen confirmar la ubicuidad del pesticida previamente denunciada por Seba y Snedaker (1995) que refieren a este producto como el pesticida más frecuentemente encontrado en la capa superficial de las aguas marítimas.

El endosulfán es un compuesto de elevada toxicidad crónica existe la evidencia necesaria para que este sea considerado un pesticida organoclorado, xenobiótico estrogénico y con una persistencia medio ambiental considerable (Olea y col., 1.996; Olea y col., 1.997; Olea y col., 1.999). La **figura No. 3** presenta su estructura química detallada.

El endosulfán es estable bajo condiciones normales, pero en un ambiente ácido o alcalino se hidroliza formando diol (sustancia menos tóxica) y dióxido de azufre. Debido a su estructura química, resulta más reactivo que el DDT o el lindano.

Su comportamiento en el medio ambiente está determinado por su escasa solubilidad en agua y su volatilidad. Él entra al aire, al agua, y al suelo durante su manufactura y uso. Frecuentemente se rocía sobre cosechas y el rocío puede viajar largas distancias antes de depositarse sobre cosechas, en el suelo o el agua. El endosulfán sobre cosechas generalmente se degrada en un par de semanas, sin embargo se adhiere a partículas en el suelo y puede demorarse años en degradarse completamente, no se disuelve fácilmente en agua. En agua superficial se adhiere a partículas de tierra que flotan o a sedimentos en el fondo.

II. 3 DECOLORACIÓN DE EFLUENTES COLOREADOS

Los efluentes industriales causan diferentes impactos sobre el medio ambiente, que están asociados a su contribución en cuanto a: sólidos en suspensión (SS), carga orgánica (DQO y DBO), toxicidad y color. La DQO (Demanda Química de Oxígeno) representa los compuestos químicos susceptibles a la oxidación por vía biológica o química. La DBO (Demanda Bioquímica de Oxígeno) se atribuye a la presencia de compuestos orgánicos fácilmente biodegradables como

carbohidratos, ácidos orgánicos de bajo peso molecular, alcoholes, entre otros. La toxicidad se relaciona con compuestos de estructura compleja como hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA), fenoles, polifenoles, compuestos organoclorados y otros. La presencia de color puede estar asociada a los compuestos tóxicos presentes y grupos cromóforos o polímeros de alto peso molecular como la lignina.(Fernández,2001)

El color en las aguas puede ser clasificado como **aparente y verdadero** (Sawyer y Mc Carty, 1967). El **color aparente** es de fácil eliminación ya que se origina por la presencia de materiales sólidos en suspensión y se elimina al desaparecer estos, ya sea por filtración, sedimentación o centrifugación; mientras que el **color verdadero** es el atribuido a sustancias disueltas, siendo por tanto de mayor complejidad su eliminación por tratamiento químicos, físicos y biológicos.

Tratamientos biológicos de efluentes coloreados:

Tecnologías biológicas convencionales han sido aplicadas en el tratamiento y detoxificación de muchos efluentes industriales, incluso combinando con tratamientos físico – químicos; resultando una vía secundaria para su procesamiento. Casi siempre estas alternativas presentan limitaciones específicas, particularmente cuando son aplicadas en la decoloración de compuestos recalcitrantes como melazas, residuales de la industria del papel, colorantes sintéticos, etc. (Palma y Col., 1998).

El tratamiento de los efluentes mediante procesos aerobios y anaerobios presentan numerosas ventajas frente a los métodos físico químicos; por lo que se han convertido en una de las herramientas fundamentales en la eliminación y reducción de su carácter contaminante, habiendo producido avances notorios en estos últimos años.

Tratamientos biológicos con hongos de pudrición blanca.

En la década del 80 el empleo de hongos como alternativa para realizar la decoloración de efluentes de la industria papelera, así como para la degradación de compuestos organoclorados y otros compuestos contaminantes de alto peso molecular y ya en los últimos años, diferentes grupos de investigación han estudiado la posibilidad de reducir muchos compuestos aromáticos (pesticidas, desinfectantes, fenoles) y en general, numerosos contaminantes medioambientales, usando hongos y/o sus enzimas ligninolíticas (Martirani y col., 1996; Feijoo y Lema, 1999).

Actualmente se considera la aplicación de los hongos de putrefacción blanca para el pre y postratamiento de los efluentes de la industria maderera y en general, de aquellos efluentes industriales con componentes tóxicos de alto peso molecular. En este sentido, por una parte se esta investigando el empleo de reactores de

tratamiento con micelio libre o inmovilizado que permita la degradación total de los componentes, así como la utilización directa del complejo enzimático ligninolítico dentro de un sistema integral de tratamiento que optimice los procesos aerobios / anaerobios. En este último caso, los estudios que se están realizando pretenden el desarrollo de un biorreactor para la producción a gran escala de enzimas ligninolíticas (Feijoo y Lema, 1995).

El empleo de hongos basidiomicetos tiene varias ventajas respecto al tratamiento con microorganismos, para la biodegradación de compuestos tóxicos. Por lo general, estos compuestos son de estructura compleja y elevados pesos moleculares, y su degradación por microorganismos está limitada debido a algunos factores referidos por Lema (1999): al actuar en fase líquida se limita su acción sobre compuestos hidrófobos, la adsorción de estos compuestos sobre las partículas de los sedimentos dificulta su biodegradabilidad o al menos su biodisponibilidad, la mayor parte de los sistemas microbianos no son capaces de degradar los compuestos orgánicos que sean altamente contaminantes a baja concentración debido a que no se activan los correspondientes sistemas enzimáticos degradativos y la dificultad de degradar enlaces diversos y complejos. En contraposición los hongos de pudrición blanca, se caracterizan por poseer un sistema enzimático extracelular de carácter no específico capaz de romper una gran cantidad de enlaces diferentes y por lo tanto, no ha de extrañarse que estos hongos sean capaces de degradar una gran cantidad de compuestos orgánicos, incluyendo hidrocarburos policíclicos aromáticos, clorofenoles, policlorofenoles, fungicidas, dioxinas y pesticidas. (Higson, 1991; Eggen, 2000). Además como característica adicional, los compuestos intermediarios generados por la degradación son por lo general biodegradables, pudiendo ser mineralizados hasta CO_2 y H_2O . Estos hongos también son empleados en la decoloración de residuales industriales, ya que generalmente el color se debe a la presencia de compuestos de alto peso molecular y compleja estructura que no pueden ser degradados por otras vías. (Rodríguez, 2000).

Los residuales de la planta de setas del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI) como son: pulpa de café y vinaza de destilería han sido estudiados en el centro para su tratamiento y obtención de compuestos de interés como alimento animal, bioabonos, vitaminas, enzimas, pécticas, etc. (García, 1999).

Por vía anaerobia se han logrado buenos valores de remoción de la carga orgánica, para la vinaza; sin embargo permanecen inalterables compuestos de difícil biodegradabilidad y biodisponibilidad y el color. También se ha ensayado la degradación anaerobia del extracto líquido de pulpa (ELP) obtenido de la pasteurización de la pulpa de café, obteniéndose valores de remoción de su carga orgánica de alrededor de un 62 %; pero manteniéndose el color (Pérez y Bermúdez, 1998). Podemos señalar también que en estudios realizados por Queralt (2000) se reportan valores de remoción de la DQO y color por encima del 50 %. Rodríguez, Fernández y Bermúdez (2003) reportan que el tratamiento con *Pleurotus* logra eliminar el 39% y el 44% del color presente en la vinaza y

en el ELP respectivamente, a los 10 días de tratamiento, en el caso de los cultivos en vinaza la remoción del color tiene una estrecha correspondencia con la remoción de la DQO existiendo valores similares en la reducción de ambos parámetros, de lo que puede inferirse que gran parte de la carga orgánica degradada por el hongo es aportada por compuestos coloreados. Álvarez, (2004) obtuvo en experimentos realizados para el tratamiento del ELP con cepas de *Pleurotus sp*, un 92 % de remoción de los fenoles, una elevada remoción de la DQO y del color, desarrollando sus experimentos con sólo 10 días de tratamiento como lo refieren otros investigadores ya citados.

El color de los residuales se debe a compuestos de alto peso molecular como polifenoles, taninos hidrolizables y condensados y cafeína en el caso del ELP, que pueden resultar tóxicos por su composición química; y melanoidinas producto de las reacciones de Millard en el caso de la vinaza.

En los últimos años el interés científico se ha incrementado y ha estado centrado sobre otros sistemas biológicos, como tratamientos para reducir la carga contaminante de muchas aguas residuales de procesos industriales, la disposición de las cuales puede causar o agravar la contaminación ambiental. Entre los más estudiados y prometedores, el empleo de los hongos de pudrición blanca es una alternativa viable, debido a que estos poseen un sistema multienzimático que permite la degradación de compuestos de estructuras disímiles y complejas. (Fernández Boizán, M. 2001)

El hongo *Pleurotus ostreatus* es uno de los 4 hongos de pudrición blanca más estudiados y más expandido su cultivo a nivel mundial. Ha sido empleado en la biorremediación de suelos para disminuir el contenido de hidrocarburos policíclicos aromáticos (Eggen, 1998), en pretratamiento para mejorar la digestibilidad de residuos lignocelulósicos empleados en la alimentación animal (Kerem y Hader, 1998), en procesos de biopulpeo de las industrias papeleras (Feijoo y Lema, 1995), en la decoloración de colorantes industriales (Palma y Col., 1998), entre otros. Este hongo comestible se ha usado además, como fuente para la obtención de enzimas empleadas en la decoloración de melazas de estructura similar a la vinaza y en la remoción de fenoles.

En la literatura revisada se reportan trabajos acerca de la utilización de estos hongos en la decoloración de efluentes coloreados como la vinaza de destilería, el Extracto Líquido de la Pulpa de Café y otros residuales industriales como los que se obtienen del teñido de telas y pieles en la industria textil.

Para la degradación de compuestos coloreados presentes en los residuales líquidos es necesaria la presencia de enzimas, la actividad del sistema enzimático ligninolítico (**figura 5**) por lo general se produce durante el metabolismo secundario, como respuesta a la limitación del nitrógeno, carbono y/o azufre, pero no por las limitaciones de fósforo. Las condiciones medioambientales tales como la concentración de oxígeno en el medio, edad del cultivo, y composición del medio afectan el perfil de las diversas isoenzimas presentes en el medio extracelular, implicando diferentes niveles de actividad enzimática. (Yaropolov, 1994).

III.- MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo experimental se utilizaron los materiales y equipos disponibles en los laboratorios de Sanidad Vegetal y de Suelos y Agroquímica del Dpto. de Agropecuaria del Instituto Superior Pedagógico “Frank País García”. Las Cepas de *Pleurotus sp* utilizadas en los diferentes experimentos proceden del cepario del CEBI de Universidad de Oriente.

III.1 MATERIALES

3.1.1. Reactivos químicos fundamentales:

Se emplearon reactivos comerciales de gran calidad y pureza. Para los análisis químicos, bioquímicos y microbiológicos se requirió de los reactivos siguientes:

Ácido 3,5 – dinitrosalicílico	PANREAC
Ácido acético glacial	ENSUFARMA
Ácido sulfúrico	MERCK
Agar Czapeck	BIOCEN
Agar Extracto Malta	BIOCEN
Agar nutriente	BIOCEN
Azul de metileno	AnalaR
Cafeína	MERCK
Carbonato de sodio	REACHIM
Citrato de sodio	PANREAC
Cloruro de sodio	ENSUFARMA
Dicromato de potasio	AnalaR
Dihidrógenofosfato de potasio	REACHIM
EDTA	FLUKA
Endosulfán o Thiodán	MERCK
Extracto de levadura	OXOID
Fenol	FLUKA
Glucosa	REACHIM
Glucosa anhidra	PANREAC
Guayacol	SIGMA
Hidrogenocarbonato de sodio	BDH
Hidróxido de sodio	MERCK
Peptona	PANREAC
Peróxido de hidrógeno	MERCK
Rojo Fenol (Indicador)	MERCK
Sulfato de magnesio heptahidratado	FLUKA
Sulfato de manganeso tetrahidratado	REACHIM
Sulfato de mercurio	MERCK
Sulfato de plata	MERCK
Sulfito de sodio	REACHIM
Tartrato de sodio y potasio	REACHIM

3.1.2 Equipamientos fundamentales:

1. Autoclave Vertical	(BK – 25)
2. Balanza Analítica	(Labor Muszeripapeari Muvek LB – 1050)
3. Balanza Técnica de Barra Triple	(ROHAUS)
4. Baño de María Vertical	(SELECTA)
5. Cocina de Gas	(IMPUD)
6. Estufa	(KLAUS)
7. Incubadora	(MEMMERT)
8. Plancha eléctrica	(SELECTA)
9. Ph – Metro	(MLW AT3)
10. Microscopio estereoscópico	(Olimpus. México)
11. Microscopio óptico	(Olimpus. México)
12. Zaranda	(SELECTA) Untronic 320- 1R

3.1.3 Materiales:

- **Cristalería:** tubos de ensayos; probetas de 250 mL y 500 mL; pipetas de 1; 5 y 10 mL; beakers; volumétricos; Placas de Petri de 10cm Enlermeyers de 250, 500, 1000 mL; goteros, balones de 1000 mL.
- **Materiales:** Gradillas, pinzas de metal y de madera, bandejas de metal, aguja de platino para la siembra, mecheros, espátulas, Papel Kraff, Papel de Filtro, hilo, algodón, gasa, etc.

III.2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.2.1 Residual coloreado empleado:

Vinaza de destilería:

La vinaza es el residual líquido fuertemente coloreado y contaminante de las destilerías producido a razón de 45 L de vinaza por cada litro de alcohol generado en el proceso de destilación. Sus características fisicoquímicas (ácida, alta temperatura y alto contenido de materia orgánica e inorgánica) hacen de este residuo líquido uno de los efluentes industriales más difíciles de tratar y disponer. Presenta en su composición química compuestos complejos y altas concentraciones de K^- y SO_4^{2-} según trabajos realizados (Noyola, 1996). En este residual, generalmente más del 50 % está formado por materias reductoras, ácidos volátiles y alcoholes, en la **tabla No. 5** se muestran la caracterización química de este residual.

El color de la vinaza, pardo o castaño, es el producto de una reacción de pardeamiento no enzimático, de naturaleza exclusivamente química consistente en la condensación de los azúcares con los aminoácidos y proteínas fue estudiado por primera vez por Maillar en 1912 de quien lleva su nombre. Los aldehídos, cetonas y azúcares reductoras se combinan fácilmente por condensación aldólica (Braverman, 1967).

Las hexosas, lo mismo que todos los ácidos urónicos, se degradan con facilidad cuando se calientan en medio ácido; teniendo como ejemplo la hidrólisis ácida del almidón para la formación de jarabes de glucosa que contienen dextrinas, o bien en la elaboración de cervezas. Todos estos productos son pardos o castaños debido a la llamada caramelización de los azúcares, que se producen incluso en ausencia de proteínas o aminoácidos. (Braverman, 1997)

Dentro de los residuales de mayor interés en la provincia de Santiago de Cuba, se encuentra el residual de la destilación de alcohol (vinaza) de la cervecería "Hatuey"; debido a que es uno de los contaminantes más agresivos de la bahía. Se vierte a razón de 500 metros cúbicos diarios.

3.2.2 Microorganismos empleados:

Se utilizaron 8 cepas del género *Pleurotus* sp de la colección de Cultivos del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI) de la Universidad de Oriente, conservados en Agar Extracto de Malta a 6°C en refrigeración comercial.

1. <i>Pleurotus ostreatus</i>	CEBI 3021
2. <i>Pleurotus sp</i>	CEBI 3022
3. <i>Pleurotus ostreatus</i>	CEBI 3023
4. <i>Pleurotus sp (P. ostreatus + P. pulmonaris)</i>	CEBI 3024
5. <i>Pleurotus ostreatus</i>	CEBI 3025
6. <i>Pleurotus ostreatus</i>	CEBI 3026
7. <i>Pleurotus florida</i>	CEBI 3028
8. <i>Pleurotus ostreatus</i>	CEBI 3035

3.2.3 Medios de Cultivos:

Se emplearon medios de cultivos comerciales de gran calidad, cada uno con finalidades específicas, ellos son: **Agar Papa Dextrosa** (OXOID) para el crecimiento y conservación de las cepas de *Pleurotus sp*. en tubos de ensayos y crecimiento de colonia gigante en Placa de Petri para observar y medir crecimiento radial y velocidad de crecimiento, **Agar Medio Basal Mínimo** (OXOID) suplementado con diferentes compuestos tóxicos tales como: Azul de Metileno, Rojo Fenol y Endosulfán, cada uno de ellos a concentraciones de 1, 2.5 y 5 % respectivamente, los cuales fueron añadidos junto al medio de cultivo, siendo esterilizados con el mismo a 1 atm de presión y a una temperatura de 121⁰ C,

durante 15 minutos con la finalidad de observar la degradación de compuestos tóxicos y coloreados.

Fue utilizado también el Guayacol en Medio Basal Mínimo, a una concentración 10 mmol, este fue añadido después de esterilizado el medio de cultivo, para ello fue necesario licuar el medio, el que fue vertido a placas de petri añadiendo posterior a esto 10 ml de guayacol, realizando rotaciones de las placas de petri con el mismo número de vueltas de derecha a izquierda para lograr la homogeneidad del mismo, se mantuvo en reposo hasta su solidificación total para proceder a la siembra de las muestras a tratar. Este medio fue empleado con la finalidad de observar halo de excreción de enzimas por parte de cada una de las cepas de *Pleurotus sp* ensayadas.

De la misma forma se utilizó el Medio Basal Mínimo suplementado con el residual vinaza de destilería a concentraciones de 1; 2,5 y 5 % respectivamente, para medir la acción de degradar compuestos coloreados de la cepas de *Pleurotus sp*. seleccionadas.

3.2.3.1 Composición del Medio Basal Mínimo para el cultivo de hongos del género *Pleurotus*. (Martín y col; 1997)

Para el crecimiento de las cepas se empleó el **medio basal mínimo (MBM)** con la siguiente composición química: 2% de Glucosa; 0,5% de peptona; 0,2% de Extracto de levadura; 0,2% de hidrógeno fosfata de potasio (KH₂ PO₄) y 0,05 de sulfato de magnesio, 6% de Agar, agua destilada c.s.p. 1000 mL. Ajustando pH 6,5. El mismo se esterilizó a 1 atm de presión y a 121^oC por espacio de 15 minutos.

III. 3 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para el desarrollo experimental fue necesario la preparación del material (cristalería) y de los medios de cultivos para la siembra de las cepas de *Pleurotus* antes mencionadas. Se realizaron pases de cada una de las cepas a tubos de ensayos con Medio Agar Papa Dextrosa para su conservación en fresco.

Se realizaron varios experimentos en los que fueron cultivadas las 8 cepas de *Pleurotus sp*. en diferentes condiciones de cultivo:

3.3.1 CONDICIONES DE CULTIVO

a) Siembra de las cepas de *Pleurotus sp* en Placas de Petri con Medio Agar Papa Dextrosa:

Las cepas anteriormente mencionadas se llevaron al Laboratorio de Microbiología del ISP "Frank País García". Se efectuaron pases sucesivos de cada una de ellas a tubos de ensayos con Agar Papa Dextrosa para su conservación.

Fueron tomados inóculos de cada una realizando la siembra en Placas de Petri. Las mismas fueron incubadas a temperatura de 30° C por espacio de 15 días, realizando lecturas y mediciones del crecimiento del diámetro de la colonia cada 2 días. Se obtuvieron los valores de la velocidad del crecimiento en cada una de las cepas.

b) Siembra de las cepas de *Pleurotus sp* en Placas de Petri con Medio Basal Mínimo suplementado con Guayacol 10 mmol.

Fue empleado Medio Basal Mínimo suplementado con Guayacol a una concentración 10 mmol. Para desarrollar la siembra se procedió de la siguiente forma:

- Fueron tomadas con aguja de platino pequeñas porciones de cada una de las cepas realizando la siembra en Placas de Petri.
- Las mismas fueron incubadas a temperatura de 30° C por espacio de 15 días.
- Se realizaron lecturas y mediciones del crecimiento del diámetro de la colonia cada 2 días, para observar halo de color púrpura en el medio de cultivo producto de la excreción de enzimas fenoloxidasas encargadas de la decoloración de compuestos fenólicos, desarrollo miceliar del hongo y velocidad de crecimiento.
- Se montaron 3 réplicas, calculando el valor de la media del crecimiento diametral en cm, medido cada 2 días después de efectuada la inoculación.
- Se efectuó un total de 7 lecturas por espacio de 15 días.
- Fue evaluada la velocidad de crecimiento de cada una de las cepas estudiadas.

c) Siembra de las cepas de *Pleurotus sp* en Placas de Petri con Medio Basal Mínimo suplementado con los diferentes productos tóxicos y coloreados

Empleando Medio Mínimo suplementado con diferentes productos tóxicos y coloreados: se ensayaron los colorantes Azul de Metileno y Rojo Fenol. Como producto tóxico, recalcitrante y xenobiótico se ensayó el Endosulfán (thiodán) todos a concentraciones de 1, 2,5 y 5% respectivamente.

- Fueron tomadas con aguja de platino pequeñas porciones de cada una de las cepas realizando la siembra en Placas de Petri.
- Las mismas fueron incubadas a temperatura de 30° C por espacio de 15 días.
- Se realizaron lecturas y mediciones del crecimiento del diámetro de la colonia cada 2 días, para observar cambio en la coloración del medio de cultivo producto de la degradación y desarrollo miceliar del hongo.

Para cada uno de los tratamientos anteriores se montaron 3 réplicas, calculando el valor de la media del crecimiento diametral en cm, medido cada 2 días después de

efectuado la inoculación; se efectuó un total de 7 lecturas por espacio de 15 días. Fue evaluada la velocidad de crecimiento en cada uno de los experimentos antes señalados

d) Tratamiento de la vinaza de destilería con *Pleurotus sp* en cultivo sumergido agitado.

Este experimento se diseñó con la finalidad de evaluar la disminución del efecto contaminante (remoción de color, DQO y contenido de fenoles) en las condiciones y con las cepas seleccionadas una vez realizado el screening antes explicado.

Para el desarrollo del mismo se emplearon los residuales suplementados con Glucosa; a concentraciones de 50, 75 y 100 % respectivamente, se emplearon como cepas de estudio *Pleurotus ostreatus CEBI 3022* y la *Pleurotus ostreatus CEBI 3026*, hasta los 10 días de fermentación sumergida con agitación; determinando parámetros tales como: remoción de color, remoción de la DQO y disminución de compuesto fenólicos, los cuales son indicadores que permiten medir el efecto contaminante del residual, tal y como lo refiere Álvarez, 2004.

III.4 Métodos analíticos empleados:

a) Análisis de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) por reflujo cerrado (APHA, 1998)

Fundamento: la determinación de la DQO se emplea como una medida del contenido del oxígeno equivalente a la materia orgánica de la muestra que es susceptible a la oxidación por un ácido fuerte.

b) Determinación de luminancia (Estándar Methods, 1989)). Cálculo de la remoción de color:

Fundamento: este método consiste en la medición del porcentaje de transmitancia de la muestra para un conjunto de longitudes de ondas específicas, utilizando agua destilada como blanco. La suma de los porcentajes de transmitancia multiplicada por un factor nos da la luminancia (%) que es una medida de cuán clara es percibida la muestra por el ojo humano. Las muestras deben centrifugarse para la eliminación de sólidos en suspensión y luego diluirse de modo que su transmitancia no sea mayor del 10 %.

La remoción del color se calcula mediante la expresión

$$R = (A_i - A_f) / A_i \quad (2)$$

$$A = 2 - \log L \quad (3)$$

Donde:

L: valor de luminancia.

R: remoción de color.

Ai :absorbancia obtenida a partir de los valores de luminancia inicial según ecuación. 2.

Af: absorbancia obtenida a partir de los valores de luminancia final según ecuación. 3.

c) Análisis del contenido de fenoles por el método Folin – Denis en aguas residuales (Maestro y col.,1991)

Fundamento: las concentraciones de fenoles usualmente encontradas en aguas residuales están sujetas a oxidaciones químicas y biológicas. En general, en las aguas residuales pueden aparecer muchos tipos de compuestos fenólicos, desde fenoles monoméricos hasta polímeros polifenólicos complejos. El método de Folin – Denis se basa en la formación de un complejo azul entre el ácido fosfowolfrámico – fosfomolibdico y los fenoles, en medio básico. El contenido de fenoles en la muestra se determina por la reacción del reactivo con todos los hidroxibencenos.

III.5 Procesamiento estadístico:

En cada estudio se realizaron experimentos tipo, en los cuales se procesaron 3 réplicas para cada tratamiento. Para el tratamiento estadístico de los resultados se utilizó el paquete estadístico de diseños experimentales FAUANL, Versión 2,5 Facultad de Agronomía UANL. Se utilizaron las herramientas de Análisis de Comparación de Medias, Diseño completamente al azar, Diseño Bifactorial y Test de Normalización. En el caso de diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos experimentales, las medias fueron comparadas mediante el test de comparación de medias. En todos los casos se utilizó nivel de significación del 0,05 %.

IV.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

a) Comportamiento de 8 de las cepas de *Pleurotus* sp en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa.

El medio de cultivo Agar Papa Dextrosa es un medio sintético para el crecimiento y desarrollo de los hongos. Posibilita mantener las cepas en un ambiente adecuada con los elementos nutricionales necesarios para garantizar el desarrollo de las diferentes fases de crecimiento completando su ciclo vital, es por ello que se empleó este medio para el estudio del crecimiento diametral de las cepas objeto de investigación. Tomando en cuenta el comportamiento de las cepas frente a este medio de cultivo, se pudo comparar la acción de las mismas frente a otros compuestos ensayados.

Según Rivera (2000), en las aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos resulta de primordial importancia estudiar el crecimiento de la colonia bajo condiciones predeterminadas.

De este experimento se obtuvo como resultado que la cepa de mejor comportamiento fue la **3021** la cual mostró un crecimiento medido en diámetro de la colonia de **9,23 cm** y una velocidad de crecimiento de **16,71 cm.d⁻¹**, seguida de las cepas **3022, 3026, 3028, 3025, 3035 y 3024**, cuyos crecimientos en diámetros de sus colonias están por encima del valor de **5 cm**. La cepa 3023 fue la de peor comportamiento quedando demostrado esto en el bajo valor del diámetro de su colonia el cual fue de 1,46 cm. En la **figura No. 6** se representan gráficamente los valores alcanzados del diámetro de la colonia y la velocidad de crecimiento para cada una de las cepas ensayadas.

En investigaciones realizadas por otros autores como Queralta, 2000; Fernández Boizán, 2001 y Álvarez, 2004; la cepa 3022 ha mostrado excelentes resultados en su crecimiento y desarrollo bajo cualquier condición establecida como experimento. En esta investigación los resultados obtenidos con relación a los valores medios de la velocidad de crecimiento de cada una de las cepas antes mencionadas corroboran los alcanzados por otros autores.

Desde el punto de vista estadístico la cepa 3021 mostró diferencias altamente significativas con respecto a las demás cepas, al igual que la cepa 3023, sin embargo entre las cepas 3022, 3026, 3028, 3025 y 3035 no existen diferencias significativas, la cepa 3024 muestra diferencias medianamente significativas con relación al resto de las cepas. Los resultados se expresan en la **tabla No. 6**

b) Comportamiento de las cepas de *Pleurotus sp* en MBM suplementado con Guayacol 10 mmol.

El guayacol es un éter monomérico, denominado también ortometoxi-fenol que se encuentra en la resina del Guayaco y en el alquitrán de hulla. Es un compuesto utilizado para la identificación de excreción de enzimas por los hongos lignocelulolíticos los cuales son capaces de excretar enzimas fenoloxidasas al medio de cultivo con la finalidad de degradar compuestos fenólicos coloreados.

Como aparece registrado en Materiales y Métodos, fue utilizada una solución 10 milimolar del mismo para el desarrollo experimental. De las 8 cepas de *Pleurotus sp* sembradas en MBM suplementado con guayacol se obtuvo como resultado, que las cepas **3023 y 3035** fueron las de peor comportamiento en cuanto a su crecimiento diametral coincidiendo estos valores con los alcanzados en su velocidad de crecimiento y con los valores obtenidos en el tratamiento con Agar Papa Dextrosa, donde la cepa **3023** alcanzó un diámetro de 1,46 cm; la cepa **3035** en este experimento no reportó crecimiento micelial, no observándose halo de coloración en el medio de cultivo como indicador de las potencialidades para la excreción de enzimas fenoloxidasas, a diferencia de su crecimiento en Agar Papa Dextrosa que fue de 5,73 cm de diámetro. A las 18 horas de efectuada la siembra se observó crecimiento radial, aunque no muy abundante en la formación de halo concéntrico de color pardo rojizo alrededor del inóculo, en casi todas las placas, coincidiendo este resultado con el alcanzado en otras investigaciones donde se hace referencia de que a partir del quinto día de efectuada la siembra comienza la aparición de halo de coloración pardo rojiza. La cepa 3021 mostró un crecimiento casi nulo alcanzando 0,6 cm de diámetro su colonia; con un halo de coloración muy pequeño con tonalidad pardo muy tenue, a diferencia de su crecimiento en el medio de cultivo Agar Papa Dextrosa donde esta cepa alcanzó el valor más alto de todas las ensayadas en iguales condiciones de cultivo

El diámetro medido para las colonias de las cepas 3022, 3023, 3024, 3025, 3026 y 3028, osciló entre 1 y 2.6 cm y la coloración del halo concéntrico fue de color pardo rojizo. Los valores del crecimiento de la colonia así como su velocidad se expresan en la **Tabla No. 9**

De las 8 cepas de *Pleurotus sp* experimentadas, las cepas 3028 y 3026 fueron las de mejor comportamiento, las mismas mostraron un crecimiento que fue de 2,3 y 2,2 cm de diámetro de la colonia respectivamente; seguidas de la cepa 3022 presentando de igual forma un halo de coloración pardo rojiza. En la **Figuras 6** se muestran los resultados antes mencionados.

La Tabla No. 7, reporta los valores de la velocidad de crecimiento de las 8 cepas estudiadas. En la misma no se observan diferencias significativas entre las cepas 3021,3023,3025 y 3035, sin embargo estas presentan diferencias significativas con las cepas 3024, 3022, 3026 y 3028 (ellas entre sí no presentan diferencias significativas). Se utilizó un nivel de significación de 0,05.

c) Comportamiento de las cepas de *Pleurotus sp* en Medio Basal Mínimo suplementado con compuestos coloreados de características disímiles:

El azul de metileno es un colorante básico, electropositivo, con una alta concentración de grupos hidroxilos. Es una sal, por poseer carga positiva se une a otros compuestos que se encuentran cargados negativamente, tiene diferencias estructurales con el rojo fenol que es otro colorante. En su estructura química presenta tres anillos bencénicos enlazados a su grupo cromóforo. Por otro parte el rojo fenol, que es también un colorante utilizado como indicador de variación de pH presenta en su estructura química anillos fenólicos compuestos que hacen que el mismo alcance un mayor grado de toxicidad. Fueron tomados estos dos colorantes como referencia para el estudio del comportamiento de las cepas de *Pleurotus sp* y su posible acción decolorativa sobre los mismos producto de la acción oxidante que ejercen las enzimas fenoloxidasas sobre estos compuestos coloreados.

Los resultados obtenidos en la siembra con el Medio Basal Mínimo suplementado con Azul de Metileno a concentraciones de 1; 2,5 y 5 % respectivamente reflejaron que las cepas de mayor crecimiento fueron las cepas 3026, 3035 y la 3022 con 3.74, 2,95 y 2,7cm de diámetro respectivamente, seguidas de la 3021, 3025, 3027 y 3024, siendo la de peor comportamiento la cepa 3023. La concentración a la cual se obtuvieron estos resultados fue la de 5 %. Según Merck (2005), revisado en la página Web WWW.chemdat.de, expresa que este colorante es soluble en agua con una toxicidad de grado 3, es una sustancia denominada colorante artificial básico que tiene un grupo cromóforo con propiedades metacromáticas muy pronunciadas. Se oxida fácilmente por la presencia de otras sustancias que actúan como agentes oxidantes. Las cepas de hongos utilizadas en el desarrollo experimental actuaron degradando este grupo cromóforo producto de la acción de su sistema enzimático con la presencia de las enzimas fenoloxidasas, por lo que se pudo inferir que ejercen una acción oxidativa provocando la decoloración del mismo. Los datos sobre el crecimiento se reportan en la **Tabla No. 8**. Estos resultados alcanzados muestran que no existió en ninguna de las cepas inhibición de su crecimiento, es decir el producto no es considerado como tóxico para las cepas; sin embargo el azul de metileno en este experimento se mostró recalcitrante para su decoloración y las cepas mostraron cierto grado de absorción de algunos de los componentes del colorante incorporando parte del mismo a su micelio. **Figuras No. 7**

Al comparar los resultados alcanzados en el comportamiento de cada una de las cepas en el medio de cultivo Agar Papa Dextrosa, en el MBM + guayacol con los alcanzados en el tratamiento con azul de metileno se observó que la cepa 3021 (la de mejor comportamiento en el agar papa dextrosa y la de peor comportamiento en el tratamiento con guayacol) se encuentra entre una de las cepas que alcanzó un crecimiento elevado, por lo que se puede inferir que a pesar de su pobre crecimiento en el medio con guayacol si puede crecer y desarrollarse en medios con compuestos fuertemente coloreados como es el caso del azul de metileno. La

cepa 3023 se comportó en este tratamiento de la misma forma que en los tratamientos anteriores. El resto de las cepas mantienen un comportamiento igual en las condiciones experimentales analizadas. Existen diferencias significativas en los resultados alcanzados por la cepa 3026, 3035 y la 3022 con respecto al resto de las cepas, pudiendo expresar que para las concentraciones ensayadas no existen diferencias significativas. **Figura No. 8**

Como se hace referencia en el Capítulo II epígrafe II.3; el Rojo Fenol es un producto de elevada toxicidad y de alto grado de irritabilidad a las mucosas. Como se puede apreciar los hongos son organismos vivos y también pueden ser afectados por la acción de productos tóxicos coloreados; sin embargo las cepas **3026, 3022, 3021, 3024, y 3035** fueron las de mayor crecimiento. Si comparamos los de las cepas antes mencionadas con los alcanzados en el agar papa dextrosa, se obtuvo que la **3021** alcanza un valor similar en cuanto al diámetro de su colonia; sin embargo en el tratamiento con guayacol fue la cepa de peor resultado, el resto de las cepas se comportan de la misma forma en los tratamientos anteriores, a excepción de la cepa **3035** que su crecimiento fue nulo.

Figura No. 9

Estas cepas al alcanzar buenos resultados en su crecimiento provocaron un efecto positivo sobre el medio, incidiendo en la variación de color de rojo violeta a amarillo parduzco en la zona de crecimiento y desarrollo. Las **figuras 10 y 11** muestran estos resultados. La concentración más recalcitrante y donde los valores de crecimiento observados fueron menores, fue la concentración de 5%.

Existieron diferencias significativas entre el crecimiento de la cepa **3026** y el resto de las cepas tratadas y de esa misma forma en la cepa **3023** considerada como la cepa de peores resultados, existen diferencias medianamente significativas entre la cepa **3022** y las cepas **3026,304, 3021, 3025 y 3028**.

Uno de los productos tóxicos probados en esta investigación es el Endosulfán que es un insecticida del grupo de los Clorados, del subgrupo de los Bicicloheptenos, utilizado en la Agricultura como un plaguicida fundamentalmente para la eliminación de la Broca en plantaciones de café. El mismo ha sido aplicado al suelo donde se acumula con gran facilidad y presenta elevados niveles de persistencia. Según Koch (1989) este compuesto presenta una elevada bioacumulación, es medianamente soluble en agua, la bibliografía reporta un 1,4 mg/L; sin embargo es fuertemente soluble en solventes orgánicos como el benceno, xileno, cloroformo, tetraclorometano, metanol, etc. Es un producto bastante estable bajo condiciones normales, pero este se hidroliza en un medio alcalino o ácido descomponiéndose en diol (sustancia menos tóxica) y dióxido de azufre, disminuyendo de esta manera su toxicidad, esta propiedad química del endosulfán es aprovechada por algunos organismos su degradación metabólica con formación endosulfandioli.

Las cepas de mejor crecimiento frente a este producto tóxico, recalcitrante y xenobiótico fueron la **3026, 3028, 3025, 3025, 3022 y la 3035**. El diámetro de la colonia osciló entre 2,3 y 3,2 cm, siendo la cepa más representativa la **3026** con un crecimiento de 3,26 cm, coincidiendo este resultado con los alcanzados por

esta cepa en los tratamientos analizados anteriormente en los que siempre se mantuvo entre las mejores cepas, mostrando diferencias altamente significativas con el resto de las cepas estudiadas. Las cepas de peores resultados en cuanto a crecimiento fueron las cepas 3021 cuyo crecimiento fue nulo al igual que en el tratamiento con el guayacol, aunque fue la de mejor comportamiento en agar papa dextrosa y la 3023 que se ha comportado como la peor en cuanto a crecimiento en todos los tratamientos realizados. En este tratamiento no existieron diferencias significativas entre ellas. Los resultados obtenidos se muestran en la **tabla No. 10**

Como se observa en la **figura No. 12** los resultados alcanzados en este tratamiento son muy similares a los obtenidos en los tratamientos frente a los compuestos coloreados; sin embargo son menores que los alcanzados en el tratamiento con agar papa dextrosa para todas las cepas ensayadas.

Los valores obtenidos después de haber desarrollado los tratamientos anteriores como la degradación de productos tóxicos y coloreados y su comportamiento con respecto a las potencialidades en la excreción de enzimas fenoloxidasas, permitieron seleccionar las cepas 3022 y 3026 como las mejores, las cuales fueron empleadas para el tratamiento del residual vinaza de destilería.

d) Tratamiento de la vinaza de destilería con *Pleurotus sp.* en placas de petri y en cultivo sumergido

El residual vinaza de destilería ha sido estudiado en el Centro de Estudios de Biotecnología Industrial de la Universidad de Oriente frente a diferentes cepas de hongos del Género *Pleurotus* como uno de los residuales fuertemente coloreados por diferentes autores tales como Rivera(2000), Fernández(2001) y Bermúdez y Col.(2003), obteniéndose los resultados esperados en cuanto a remoción de la DQO, remoción de color y disminución de compuestos fenólicos. En esta investigación se seleccionaron dos cepas de *Pleurotus sp* y fueron ensayadas en condiciones de cultivos determinando su poder degradativo.

Se desarrolló un tratamiento previo con la finalidad de observar en el crecimiento diametral de la colonia la presencia de un halo de decoloración en Medio Basal Mínimo suplementado con el residual objeto de estudio, a concentraciones de 1; 2,5 y 5 % respectivamente. En las 2 cepas seleccionadas en el screening antes realizado se observaron buenos resultados en cuanto al diámetro de la colonia lo que permitió inferir que estos residuales son ricos en sustancias nutritivas que las cepas pueden emplear en su metabolismo degradativo., sin embargo no se observó en las placas de petri muestras de decoloración del medio de cultivo ya que no fue posible identificar halo de decoloración, este resultado corrobora el obtenido por Queralt (2000), donde refleja que para los hongos poder degradar los compuestos responsables del color de los residuales (taninos, etc) es necesario que el se encuentre en la fase estacionaria de su crecimiento, es

precisamente en este momento que los hongos segregan al medio las enzimas encargadas de la degradación, en Placas de Petri es un tanto difícil que el hongo alcance esta fase sin haber cubierto totalmente la superficie del medio de cultivo siendo imposible observar halo de decoloración. Los resultados correspondientes se expresan en la **Tabla No. 10**, donde se observó que la cepa de mejor comportamiento fue la 3026 seguida de la 3022. La concentración de mejores resultados fue la de 5 % a pesar de ser la de más alto valor en este tratamiento no rebasa aún el 25 % reflejado por Rivera(2000) la que reporta que la concentración del 25 % resulta estimulante para el crecimiento de estos hongos motivado por la baja concentración a la que se encuentran los componentes tóxicos y coloreados presentes en este residual, prevaleciendo el efecto favorable para el crecimiento que tienen la presencia de aminoácidos y vitaminas, en los cuales son ricas las vinazas (Bermúdez, 1998).

Para el tratamiento en cultivo sumergido agitado fueron desarrollados diversos métodos analíticos en los cuales se obtuvieron como resultados la remoción de la demanda química de oxígeno (DQO), remoción de color y la disminución de la concentración de fenoles en el residual producto de la acción degradativa de las cepas 3022 y 3026.

Según Álvarez (2004), el estudio del crecimiento, resulta de vital importancia para determinar las aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos. Por otra parte desde el punto de vista medioambiental es también de vital importancia determinar las potencialidades de decoloración y de remoción de la carga orgánica (DQO) de residuales líquidos fuertemente coloreados antes de ser incorporados a los ecosistemas acuáticos. Tal es el caso del residual vinaza de destilería, generado en el proceso de destilación de alcohol en la Fábrica de Ron de Santiago de Cuba.

El residual vinaza de destilería se caracteriza por ser un residual fuertemente colorado, la determinación del color empleando el método espectrofotométrico reportado por el Standard Methods (APHA,1998) reportó valores que oscilan entre 37 y 59,5% para la cepa 3022 y entre 35 y 67,9 % para la cepa 3026.

Las cepas 3022 y 3026 fueron cultivadas en igualdad de condiciones en el residual objeto de estudio, con la finalidad de establecer comparaciones en cuanto al comportamiento de las mismas, los resultados obtenidos se expresan de la siguiente manera:

En el tratamiento de cultivo sumergido agitado de la vinaza de destilería suplementada con glucosa se observaron los mejores valores de la remoción de color en las concentraciones de 50 y 75% respectivamente. En estas, las cepas objeto de estudio, provocaron en la concentración de 50 % una remoción de color del residual en un 59,5 % con la cepa **3022** y un 67,9 % con la cepa **3026**, para la concentración de 50 % y no existiendo diferencias significativas entre estos valores. En la concentración del 75 %, se obtuvo una remoción de color de 54.2 y 57.3% respectivamente manteniendo las condiciones de cultivo agitado mediante

Zaranda a 160 rpm. En la concentración del 100% del residual, se obtuvo 44% con la cepa **3022** y 49.7% con la cepa **3026**, no encontrándose diferencias significativas. Los resultados obtenidos en este experimento corroboran los de otros autores como Queralta,2000, Fernández ,2001, los que plantean que con este residual se obtienen porcentos de remoción de color superiores al 50% para cultivo agitado, cuando se utiliza el residual a concentraciones menores del 100 %, **figura No.13**

Los valores para la remoción de la carga orgánica (DQO) reflejaron que la cepa 3026 frente a una concentración del residual de un 50% , remueve un 72 % y la 3022 un 69 % demostrando que a menor concentración del residual ocurre mayor remoción producto de la menor concentración en que se encuentran los compuestos tóxicos y coloreados en el residual. Estos resultados aparecen reflejados en la **tabla No. 11**

Los resultados de la disminución de los compuestos fenólicos alcanzados en el residual vinaza de destilería después de su tratamiento con las cepas 3022 y 3026 oscilan entre el 90,7 % y el 93,8% respectivamente, en la concentración del 50% del residual suplementado con glucosa. Esto corrobora que las cepas de ***Pleurotus sp*** tienen potencialidades para degradar los compuestos fenólicos que son los responsables del color de los residuales, coincidimos con lo planteado por Álvarez, 2004 en que con una elevada remoción de demanda química de oxígeno y de color se disminuyen los compuestos fenólicos en el residual y por supuesto se logra la disminución de la carga orgánica del mismo antes de su vertimiento al entorno, logrando la protección medioambiental y garantizando la biodiversidad.

V.- VALORACIÓN DEL IMPACTO AMBIENTAL

La protección del medio ambiente constituye una de las premisas del estado cubano, por lo que las empresas se ven comprometidas a ejecutar acciones que redunden en estos objetivos.

Los efluentes industriales vertidos al medio ambiente provocan diferente impacto sobre éste en función de su naturaleza. En este sentido, podemos hablar de sólidos en suspensión, carga iónica, toxicidad y color. El color, pocas veces considerado una forma de contaminación a pesar de los daños que provoca, puede estar asociado a la presencia de compuestos tóxicos y grupos cromóforos o polímeros de alto peso molecular como la lignina. Durante el tratamiento de un residuo coloreado se debe prestar atención a la reducción o eliminación del color, contribuyendo a reducir el impacto sobre los ecosistemas donde son vertidos.

El tratamiento de residuales que son coloreados y que pueden presentar además compuestos tóxicos para los ecosistemas acuáticos, como polifenoles, derivados furfural, taninos, requiere de tratamientos físico-químicos asociados a tratamientos biológicos para la degradación final. La biorremediación de aguas y suelos contaminados a menudo requiere de la utilización de grupos de microorganismos por la especificidad de actividades que los mismos poseen.

En el ámbito mundial se ha incrementado el empleo de enzimas de hongos ligninolíticos para la degradación de compuestos recalcitrantes, teniendo en cuenta lo inespecífico de sus enzimas que permiten un rango mayor de compuestos posibles a tratar, en el caso que nos ocupa que es el tratamiento de un residual fuertemente coloreado y que es vertido a la bahía santiaguera a razón de 500 metros cúbicos diariamente, el empleo de estos hongos a escala de laboratorio ha tenido resultados satisfactorios en cuanto a la remoción de la carga orgánica, remoción de color y disminución de la cantidad de compuestos fenólicos presentes en el mismo, esto permite inferir que con el empleo de los tratamientos biológicos sobre este residual se reducen los parámetros antes mencionados encargados de determinar su grado o nivel de contaminación.

V. CONCLUSIONES

- ❖ Por el comportamiento demostrado a través de los ensayos experimentales realizados fueron seleccionadas como las cepas de ***Pleurotus*** con mayores potencialidades para la degradación de compuestos tóxicos y coloreados presentes en residuales líquidos, la cepa 3022 y 3026.

- ❖ En el tratamiento de los compuestos tóxicos y coloreados las cepas de ***Pleurotus sp*** de mejor comportamiento en cuanto a velocidad de crecimiento fueron la 3021, 3022, 3014, 3025, 3026 y 3028 y las de peor comportamiento las cepas 3023 y 3025.

- ❖ Los mejores valores de remoción de color, de la demanda química de oxígeno y de los compuestos fenólicos se alcanzaron a la concentración del 50 % del residual vinaza de destilería suplementado con glucosa, tratado con las cepas de ***Pleurotus*** 3022 y 3026

- ❖ Por los resultados alcanzados se demuestra que se puede disminuir la carga orgánica contaminante del residual vinaza de destilería que se vierte al medio ambiente a partir del comportamiento de cepas de ***Pleurotus sp*** frente a compuestos tóxicos y coloreados.

VI- RECOMENDACIONES

- ❖ Continuar el estudio de la acción que ejercen las enzimas fenoloxidasas excretadas por cepas de hongos del género *Pleurotus* en la degradación de efluentes coloreados.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez Cortés, Héctor (2004). Evaluación de la biodegradación del Extracto Líquido de Pulpa por *Pleurotus sp.* Tesis en opción al Título de Master en Ciencias. CEBI. Universidad de Oriente, 2004
- Anliker. R. Color chemistry and the environment. *Ecotoxicology Environmental Safety*: 211-237. 1977.
- A.O.A.C (1980). Official methods of analysis of association of official analytical chemist..13 edition ,Washington D. C.
- APHA.(1998). Standard Methods for the examination of water and wastewater. 20th Edition, Washington D.C, USA.1124.
- Aust, S.D., Benson, J. (1993). The fungus among us-use of white rot fungi to biodegrade environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives* 101: 232-233.
- Bello, R. (1999). Digestión anaerobia de residuales del cultivo de setas comestibles. *W. J. Microbial. Biotechnology* 33.357-359.
- Biblioteca de Consulta Microsoft ® Encarta ® 2005. © 1993-2004 Microsoft Corporation. Reservados todos los derechos.
- Bridge, P. D.; Aurora, D. K. (1998). Interpretation of PCR methods for species definition. In: P. D. Bridge, D. K. Aurora, D. K. Reddy and R.P. Elander (eds). *Application of PCR in Mycology*. CAB International, London, United Kingdom; 63-84.
- Brock.M *Biology of Microorganism*. 7th Edition. Prentice- Hall International, Inc., USA, 1994.
- Casadesús, L. col. (1990). *MICOLOGÍA*. Universidad de la Habana.
- Cerniglia, C. E. and M. A. Neitkamp. (1984). Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the aquatic environment in *Metabolism* Varanosi, U. (Ed) CRC Press. Boca Ratón, Florida.
- CITMA. (1997). Informe de la situación ambiental de la provincia Santiago de Cuba. Informe Anual: 25.
- Chávez, M.A. (1998) *Manual de Prácticas de enzimología*. Ed. Pueblo y Educación. Ciudad de la Habana, Cuba.
- Dubois, M.; Guilles, K.; Hamilton, J.; Robert, P.; Smith, F. (1956). Colorimetric determination of sugars and related substances. *Analytic. Chem.* 28: 350-356.
- Eggen, Trine. (1999) . *Bioremediation of recalcitrant aromatic organic pollutants with white rot fungi*. Doctor Scientiarum Theses. Agricultural University of Norway, Jordforsk, Norway.
- Feijoo, J., Lema, J. (1995) .*Tratamiento de efluentes de industria de la madera con compuestos tóxicos y recalcitrantes, mediante hongos*. *Afinidad* 4, tomo II:.57.
- Fernández, M. (2001). Ensayo de decoloración en residuales líquidos de vinaza de destilería y extracto líquido de pulpa. Universidad de Oriente. Trabajo de Diploma. Santiago de Cuba. Cuba: 36

- Field, J.; Lettinga, G. (1987). The effect of oxidative coloration on the methanogenic toxicity and anaerobic biodegradability of phenols. *Biological Waste* 29: 161-179.
- García, N. (1999). Producción de setas comestibles *P. ostreatus* sobre subproductos de café y cacao. Tesis de maestría. Universidad de Oriente, CEBI.
- Guillén, G., F. Márquez, J. Sánchez . (1998). Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. *Rev. Iberian. Micol.* 15: 302 – 306.
- Gutierrez, A. (1994). Anisaldehyde production and Aryl – Alcohol oxidase and dehydrogenase activities in ligninolytic fungi of the genus *Pleurotus*. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (6): 1123-1128.
- Guzmán, G., Mata, G., Salmones, D., Soto-Velasco. (1993). El cultivo de hongos comestibles. Primera Edición .Xalapa, Veracruz, México.
- Hatamoto O., Seine H., Nakano E. ABM K. (1999). Cloning and expression of a DNA encoding the laccase from *Schizophium commune*. *Biosci. Biotechnology. Biochemist.* 63: 58-64.
- Hawksworth, D.L. (1995). The dimation of biodiversity magnitude, significance, and conservation. *Micological Resarch* 35: 641- 655.
- Herrera, Y. (1997). Oxidación enzimática de compuestos tóxicos en medio acuoso. Memorias VII Congreso Nacional de Biotecnología y Ingeniería y II Simposio Internacional sobre Ingeniería de Bioprocesos. Veracruz, México.
- <http://www.unex.es/botánica/hongos/hongos.o.htm> (sitio Web para Hongos)
- <http://www.uco.es/investiga/grupos/rea> (Sitio Web para Agrobiología)
- <http://www.oneworld.org/patp/people/aralsea.html> (Página Web sobre la contaminación y su efecto en la población)
- <http://media.payson.tulane.edu:8086/spanish/envsp/Vol324.htm>. Página Web sobre productos tóxicos. Endosulfán. Marzo, 2005
- Bredberg, K. et al.(2001) Microbial detoxification of waste rubber material by wood- rotting fungi. *Bioresource Technology* 83: 221-224..
- Lema, J. Moreira, M., Feijoo, M.. (1996). Producción y empleo de enzimas ligninolíticas para la degradación de compuestos Xenobióticos. Edición Galindo. *Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería*. España.
- Maestro, D.; Borja, R.;Martín, A.; Fiesta, J.A. y Mendoza, J. (1991).Biodegradación de los compuestos fenólicos presentes en el alpechín. *Fasc. Vol.42: 271-276..*
- Martínez, A. T.; Camarero, S.; Guillén, F.; Gutiérrez, A.; Muñoz, C.; Varela, M.; Martínez, E.; Barrosa, J.; Ruel, K.; Pelayo, M. (1994a). Progress in biopulping of noun woody materials: chemical, enzymatic and ultrastructural aspects of wheat –straw delignification with ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. *FEMS Microbiology Review* 13: 265-284.
- Martínez, M. J. (1996). MnP Isoenzymes Produced by two *Pleurotus sp.* in liquid Culture and During Wheat- Strow Solid-state Fermentation. Edición Galindo. *Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería*. Madrid, España.
- Martirani, L.; Giardina, P.; Marzullo, L., Sannia, G. (1996). “ Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill wastewaters with the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*”. *Water Research* 30 (8), 1914- 1918.

- MERCK. (2003) .Catálogo de reactivos y productos químicos. Frankfur, Alemania.
- Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Ana. Chem. 31, 426-428.
- Montaris, H. P. (1995). Involvement o fan extracellular H₂O₂ dependent ligninoly activity of the white – rot fungus ***Pleurotus ostreatus*** in decolorization of remozol brilliant blue. Applied Environmental Microbial.37: 567-571.
- Morales, José J. (1989). Tratamiento de aguas residuales. Reutilización y prensado de pulpa en el beneficio de café. I Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria Cafetalera, México.
- Nieto- López, C. and Sánchez – Vázquez, J.E. (1997). “Micelial growth of ***Pleurotus auricularia*** in agroindustrial effluents. Mycology Neotropical. México. 10 : 47 – 56.
- Palmieri, G.; Giardina, P.; Bianco, C.; Scalani, A.; Ceppaso, A.; Sannia, G. (1997). A novel white laccase from ***Pleurotus ostreatus***. Journal of Biological Chemistry 272 (50): 31301-31307.
- Peláez, F., Martinyland M. J., Martínez, A.T., .(1995). Screening of 68 sp of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. Micol. Res. 99 : 37–42.
- Pellinen, J.; Yin, C.; Joyce, T.; Chang, H. (1988). Treatment of chlorine bleaching effluent using a white-rot fungus. Journal of Biotechnology 8: 67-76.
- Rodríguez, S.; Fernández, M.; Pérez, R. (2000). Biodegradabilidad de las aguas residuales de beneficio húmedo del café. Rev. INTERCIENCIA 25(7):12-15.
- Peter Baldrian, Jiri Gabriel. (2003). Lignocellulose degradation by ***Pleurotus ostreatus*** in the presence of cadmium. FEMS Microbiology Letters, 220,235 – 240.
- Roaska, L. (1990). Production of ***Lentinus edodes*** mycelium in liquid medium of mycelia growth by medium modification. Mash J. Tropics.. p 10, 79-92.
- Rodríguez, E .; Pickard, M.; Vázquez- Duhalt, R. (1999). Industrial Dye Decolorization by Laccases from Ligninolytic Fungi. Current Microbiology 38, 27-31.
- Rodríguez, S., Fernández, M., Bermúdez, R. C.; Morris, H. (2003). Tratamiento de efluentes industriales coloreados con ***Pleurotus sp.*** Rev. Iberoam. Micol 20 (4): 164-168.
- Rivera, Queralta, Yoira. (2000). Determinación de condiciones experimentales para el cultivo de ***Pleurotus sp.*** En efluentes coloreados. Trabajo de Diploma. CEBI. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba. (58 p.)
- Sánchez, José ; Royse, Daniel. (2002) . La Biología y el cultivo de ***Pleurotus spp.*** Editorial Lemusa, S. A. México. pág 27-47.
- Shin, K.; Oh, I.; Kim, C. (1997). Production and purification of Remazol Brilliant Blue R. Decolorization peroxidase from the culture filtrate of ***Pleurotus ostreatus***. Appl. Environ. Microbiol.63,1744- 1748.

- Sunagowa, Massahide and Mago, Yumi. (2001) .Transformation of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* by particle bombardment. FEMS Microbiology Letters, 21: 143 – 146.
- Toscano, G.; Colarieti, M.; Greco, G. (2003) .Oxidative polymerization of phenols by a phenol oxidase from green olives. Enzyme and Microbial Technology XX: 1145-1149.
- Traba, J. A; Marañón, A; I. Salgado; S. Castillo y R. C, Bermúdez. (1992) . Composición y aprovechamiento de los residuales del café. Estación experimental de Café y cacao, Cruce de los Baños, Santiago de Cuba, Cuba,
- Tuomela M. et al. (2002) .Degradation of synthetic C- lignin by various white- rot fungi in soil. Soil Biology Biochemistry. 34:11613- 1620.
- Vidal, G., Méndez, R., Lema, J. (1996) .La industria de pastos celulósicos y papel, Revista Ingeniería Química. 53. 357
- Wesenberg, D.; Kyriakides, I.; Agathos, S. (2003). White rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. Biotechnology Advances 22: 161-187.
- Yaropolov, A. I.; Skorobogotko, U.; Vortanov, S.; Vorfolomeyev, S. (1994). Lacase Properties, Catalytic Mechanism, and Applicability. Applied Biochemist and Biotechnology. 49: 257-280.

Tabla No.1 RESUMEN ACERCA DE ALGUNAS DE LAS SUSTANCIAS ESENCIALES EMPLEADAS POR LOS BASIDIOMICETOS EN SU FUNCIÓN FISIOLÓGICA

ELEMENTOS	FUNCIÓN FISIOLÓGICA
Hidrogeno	Constituyente del agua y de la materia orgánica celular
Oxígeno	Constituyente del agua y de la materia orgánica celular. Aceptor de electrones en la respiración.
Carbono	Constituyente de la materia orgánica celular
Nitrógeno	Constituyente de proteínas, ácidos nucleicos y coenzimas
Azufre	Constituyente de proteínas y coenzimas
Fósforo	Constituyente de ácidos nucleicos, fosfolípidos y coenzimas
Potasio	Cofactor enzimático, uno de los principales cationes inorgánicos celulares
Magnesio	Cofactor enzimático, forma parte de las clorofilas en las cianobacterias y algas.
Manganeso	Cofactor enzimático. Sustituto en ocasiones del Mg y del Fe.
Calcio	Cofactor enzimático
Cobalto	Constituyente de las vitaminas

Fuente: Gross Cobas, 2001.

TABLA No.2 DATOS FÍSICO-QUÍMICOS BÁSICOS DEL AZUL DE METILENO

Fórmula empírica:	$C_{16}H_{18}ClNS \times H_2O$	
Masa molecular relativa:	373.90	
Densidad:	0,99 g/cm ³	
Punto de ebullición:	180°C	
Punto de fusión:	Prod. técnico	160° C
Solvólisis:	En agua:	5 mg/l;
	en alcohol:	33 g/l;
	en metanol:	11 g/l.

Fuente: Dean, A. John . Lange's Handbook of Chemistry, 1985

TABLA No.3 DATOS FÍSICO-QUÍMICOS BÁSICOS DEL ROJO FENOL

Fórmula empírica:	C ₁₉ H ₁₄ O ₅ S	
Masa molecular relativa:	354.37	
Densidad:	0,99 g/cm ³	
Punto de ebullición:	140°C	
Solvólisis:	En agua:	50g/l;
	en acetona:	31 g/l;
	en alcohol:	13 g/l.
Toxicidad:	Clasificada como (CH) F	
Nocividad:	Altamente nocivo	
Residualidad	Elevada	

TABLA No. 4 DATOS FÍSICO-QUÍMICOS BÁSICOS DEL ENDOSULFÁN

Fórmula empírica:	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	
Masa molecular relativa:	406,95 g	
Densidad:	1,745 g/cm ³	
Densidad relativa del gas:	14,1	
Punto de ebullición:	106° C a 0,9 hPa (descomposición parcial)	
Punto de fusión:	Prod. técnico	70-100° C
	isómero a	108-109°C
	isómero b	206-208°C
Presión de vapor:	< 1 x 10 ⁻³ Pa	
Solvólisis:	En agua:	1,4 mg/l;
	en benceno:	33 g/l;
	en xileno:	45 g/l;
	en cloroformo:	50 g/l;
	en tetraclorometano:	29 g/l;
	en metanol:	11 g/l.

Tabla No. 5 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL RESIDUAL TRATADO

Parámetros	Vinaza
Sólidos totales (g/L)	58.6
pH	4.2
DQO (g/L)	73.6
DBO	48.2
Nitrógeno Total (g/L)	0,70
Fósforo (mg/L)	4.19
Sodio (g/L)	8.8
Magnesio (g/L)	0.48
Calcio (g/L)	0.106
Cobre (g/L)	0.014
Hierro (g/L)	trazas

Fuente: Fernández Boizán, 2001

TABLA No.6 Crecimiento micelial y velocidad de crecimiento de 8 cepas de *Pleurotus sp* en Medio de Cultivo Agar Papa Dextrosa

CEPAS	DIÁMETRO(cm)	μ (cm día⁻¹)
3021	9.233 a	17,485 a
3022	6.266 ab	8,9049 ab
3023	1.466 c *	3,1717 c *
3024	5.033 bc	7,7900 bc
3025	5.733 ab	10,666 ab
3026	5.966 ab	10,523 ab
3028	5.866 ab	10,952 ab
3035	5.733 ab	10,752 ab

Nivel de significación: 0,05

TABLA No.7 Crecimiento micelial y velocidad de crecimiento de 8 cepas de *Pleurotus sp* en Medio Basal Mínimo suplementado con Guayacol 10 mmol

CEPAS	DIÁMETRO(cm)	+ S	μ (cm día ⁻¹)
3021	0.6000 b	0.2309	1.7706
3022	2.2222 a	0.2645	3.1604
3023	0.2000 b	0.0000	1.2313
3024	1.6666 a	0.2309	2.0310
3025	0.5111 b	0.5196	1.5421
3026	2.3333 a	0.3511	3.1813
3028	2.3667 a	0.1906	3.1411
3035	0.0000 b	0.0000	0.0000

Nivel de significación: 0,05

TABLA No. 8 CRECIMIENTO MICELIAL DE LAS CEPAS DE *Pleurotus sp* EN MBM SUPLEMENTADO CON AZUL DE METILENO Y ROJO FENOL

CEPAS	AZUL DE METILENO		ROJO FENOL	
	DIÁMETRO(cm)	μ (cm día ⁻¹)	DIÁMETRO(cm)	μ (cm día ⁻¹)
3021	2.3333 de	2.9457	2.2222 bc	3.1607
3022	2.7000 bc	4.0318	2.7556 ab	3.3457
3023	1.8667 f	2.3725	0.7333 e	1.8998
3024	2.1444 ef	2.4479	2.2000 bc	2.8567
3025	2.5111 cd	3.7125	1.6000 d	2.0501
3026	3.7444 a	5.7336	3.0444 a	3.3475
3028	2.5000 cde	3.2725	1.7500 cd	2.7996
3035	2.9556 b	4.4868	1.9789 cd	2.4771

TABLA No.9 Crecimiento micelial de 8 cepas de *Pleurotus sp* en Medio Basal mínimo suplementado con Endosulfán.

CEPAS	DIÁMETRO(cm)	μ (cm día ⁻¹)
3021	1.3444 f	0.1464
3022	2.4000 cd	2.4889
3023	1.7667 e	1.6464
3024	1.9667 e	2.0714
3025	2.6667 bc	2.9640
3026	3.2667 a	3.8889
3028	2.8889 b	3.3964
3035	2.3000 d	2.2393

Nivel de significación: 0,05

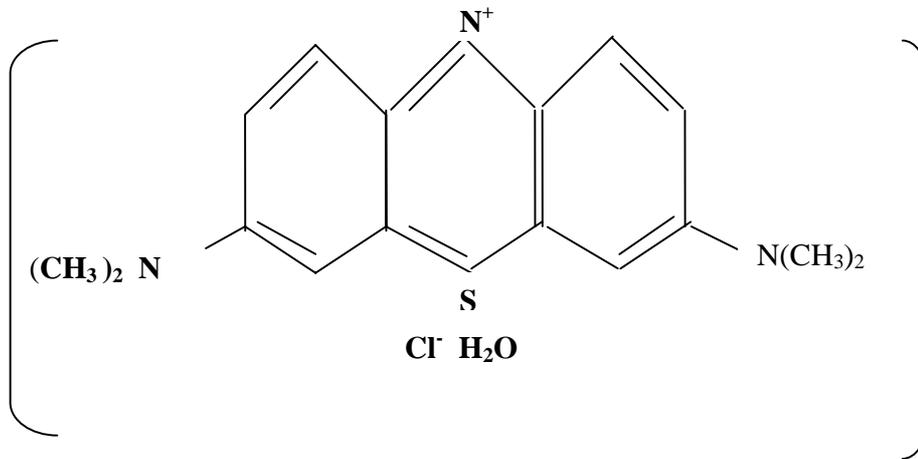
TABLA No. 10 COMPORTAMIENTO DE LAS CEPAS DE PLEUROTUS SP. 3022 Y 3026 EN EL MBM SUPLEMENTADO CON RESIDUAL VINAZA DE DESTILERÍA

CEPAS	CRECIMIENTO DIAMETRAL (cm)			MEDIA
	1%	2,5%	5%	
3022	3.3333	2.6333	2.9667	2.9778 b
3026	3.4333	4.1667	4.5000	4.0333 a

TABLA No. 11 COMPORTAMIENTO DE LAS CEPAS DE PLEUROTUS SP. 3022 Y 3026 EN EL RESIDUAL VINAZA DE DESTILERÍA S Y SU INFLUENCIA EN LA REMOCIÓN DE COLOR (%)

CEPA	MEDIO	REMOCIÓN DE DQO (%)	REMOCIÓN DE COLOR (%)	REMOCIÓN DE FENOLES(%)
3022	Vinaza 50 %+ G	69 a	59,5 a	90,7
	Vinaza 75 % + G	54 b	57,3 a	83,2
	Vinaza 100% + G	44 c	37 b	76,3
3026	Vinaza 50 %+ G	72 a	67,9 a	93,8
	Vinaza 75 % + G	56 b	48,86 b	88
	Vinaza 100% + G	49,7 c	35 c	78,5

FIGURA No.1 FÓRMULA QUÍMICA DESARROLLADA



FUENTE: Dean, A. John . Lange's Handbook of Chemistry, 1985

FIGURA No.2 ESTRUCTURA QUIMICA DEL ROJO FENOL.

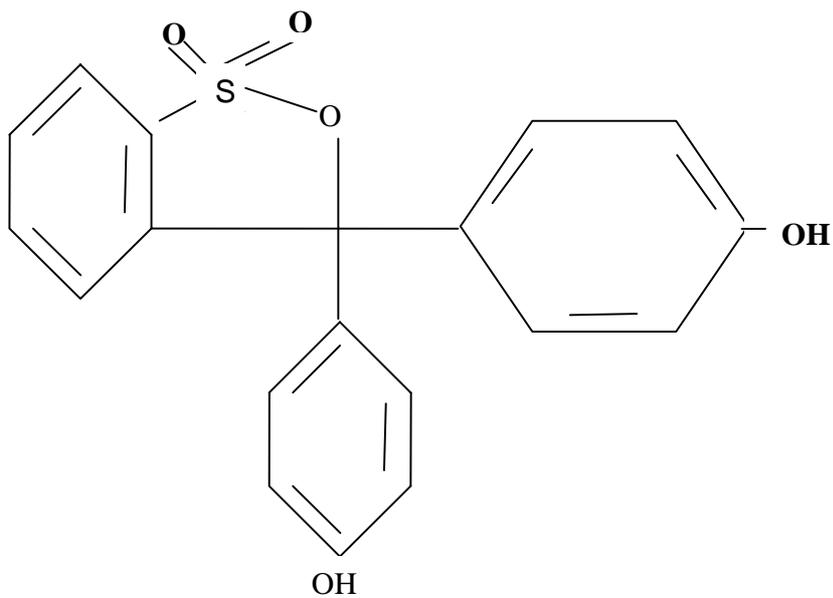
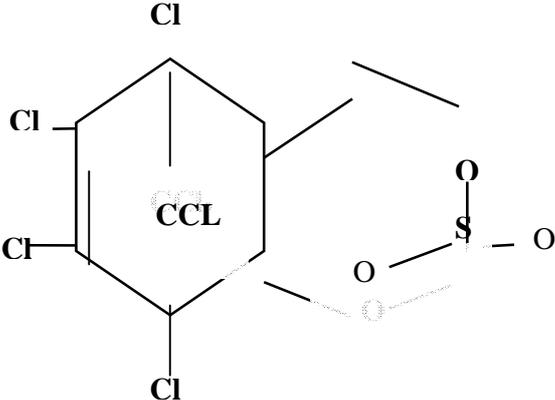


FIGURA No.3 ESTRUCTURA QUIMICA DEL ENDOSULFAN



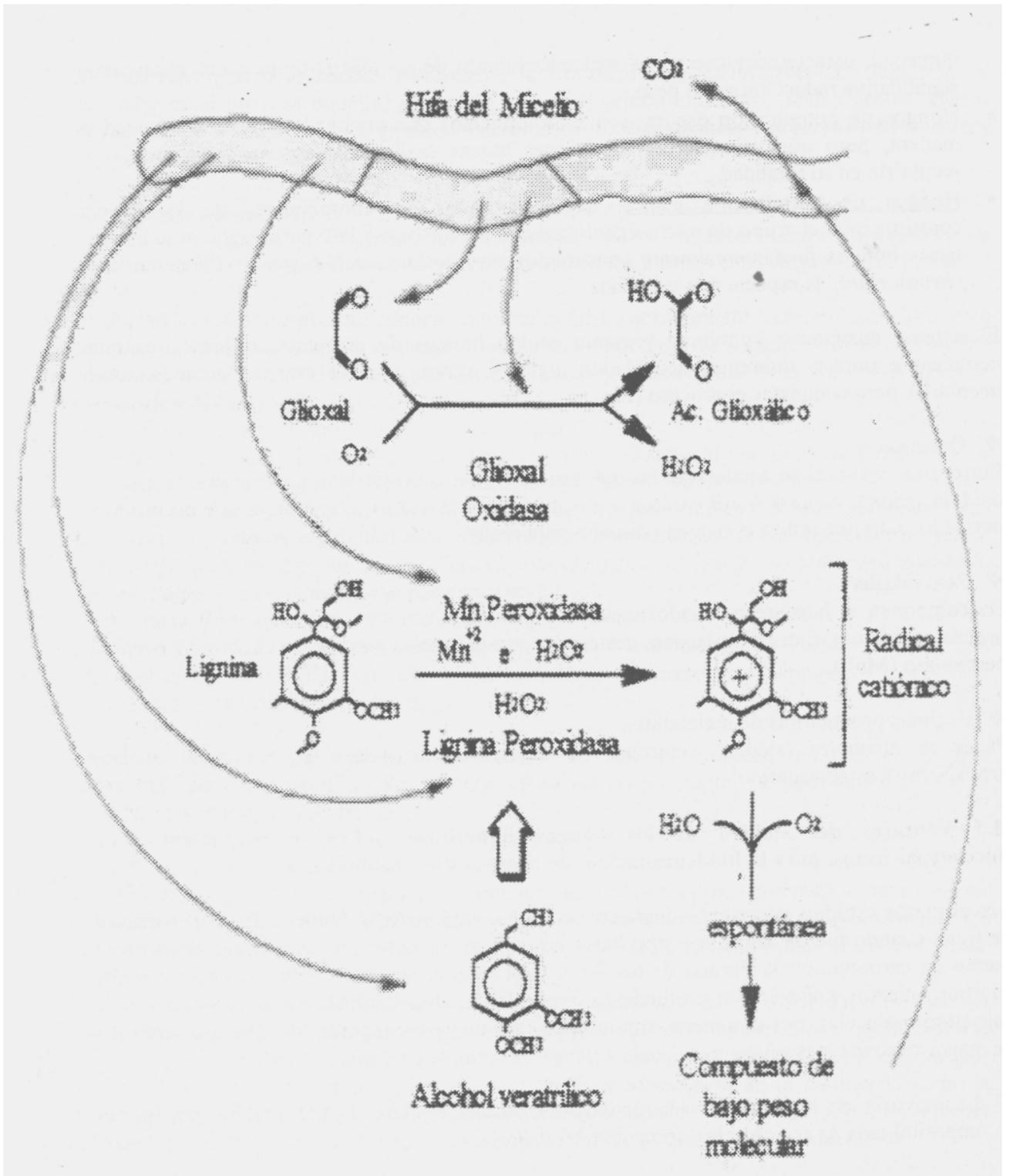


FIGURA NO. 4 SISTEMA LIGNINOLÍTICO DE HONGOS DE PUTREFACCIÓN BLANCA

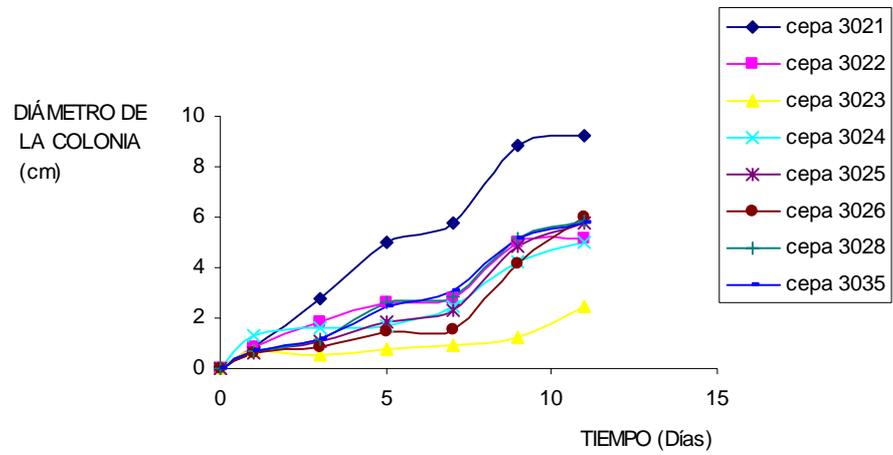


FIGURA No. 5 CRECIMIENTO DIAMETRAL DE LAS CEPAS DE *Pleurotus sp* EN MEDIO DE CULTIVO AGAR PAPA DEXTROSA.

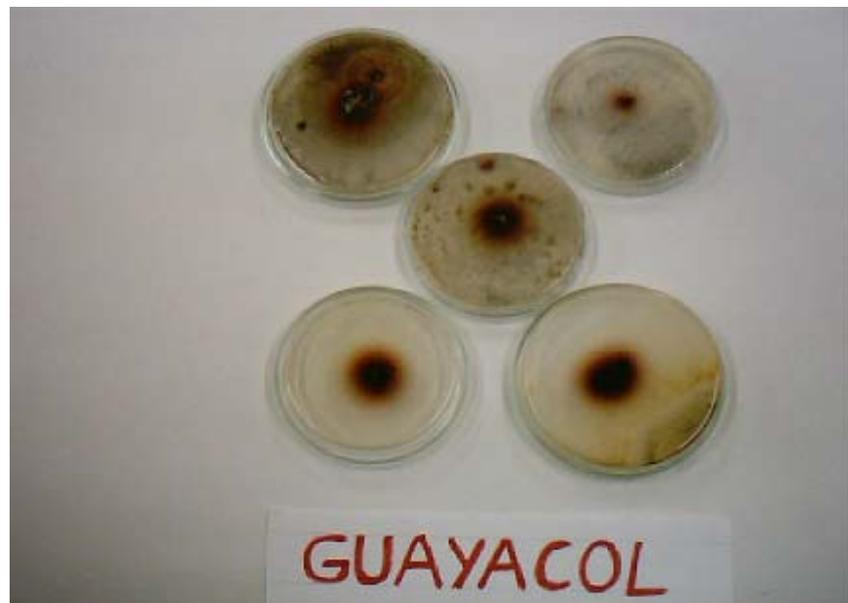


FIGURA No. 7 FORMACIÓN DE HALO COLOR PÚRPURA EN CEPAS DE *Pleurotus*

FIGURA No. 8 EFECTO DEL AZUL DE METILENO EN EL CRECIMIENTO DE CEPAS DE PLEUROTUS SP.

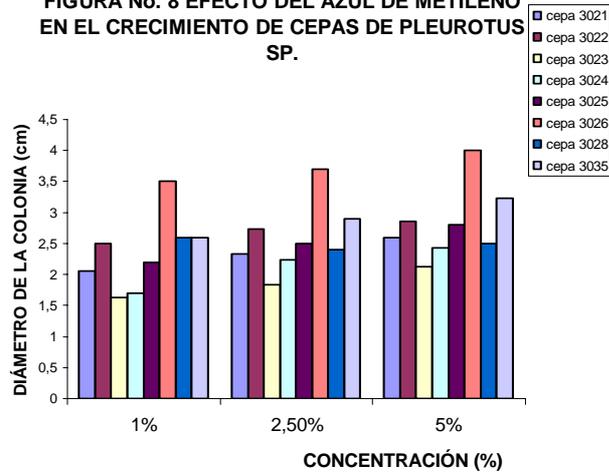


FIGURA No. 9 EFECTO DEL ROJO FENOL PARA EL CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Pleurotus* sp

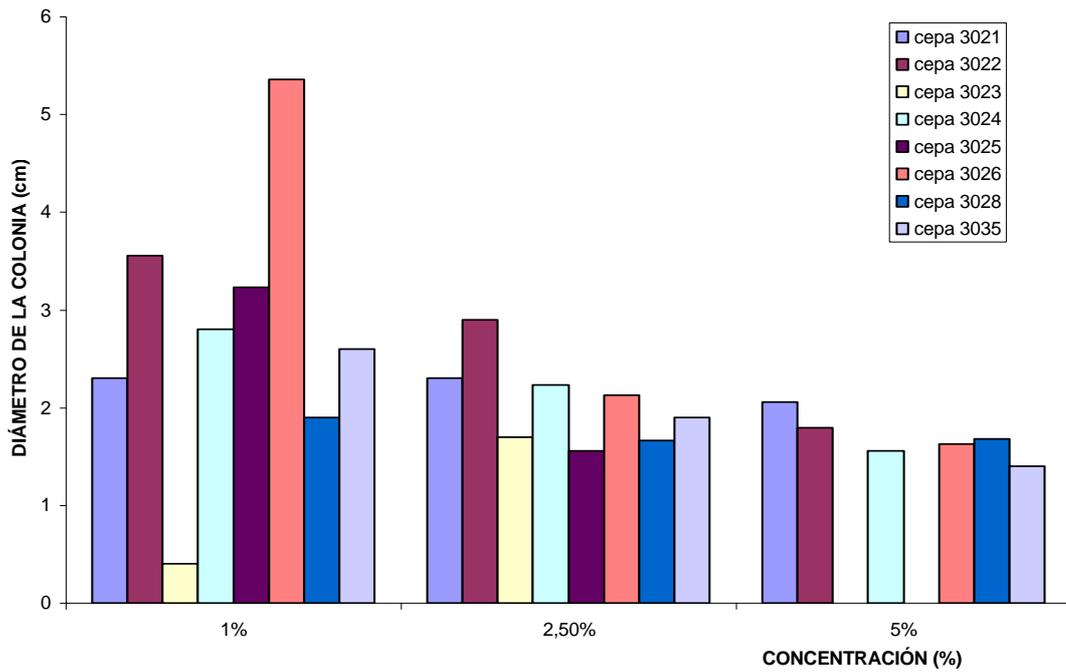


FIGURA No. 10 EFECTO DEL ROJO FENOL EN ALGUNAS CEPAS DE *Pleurotus* sp



FIGURA No. 11 EFECTO DEL ROJO FENOL EN LAS CEPAS DE *Pleurotus* sp 3022 Y 3026

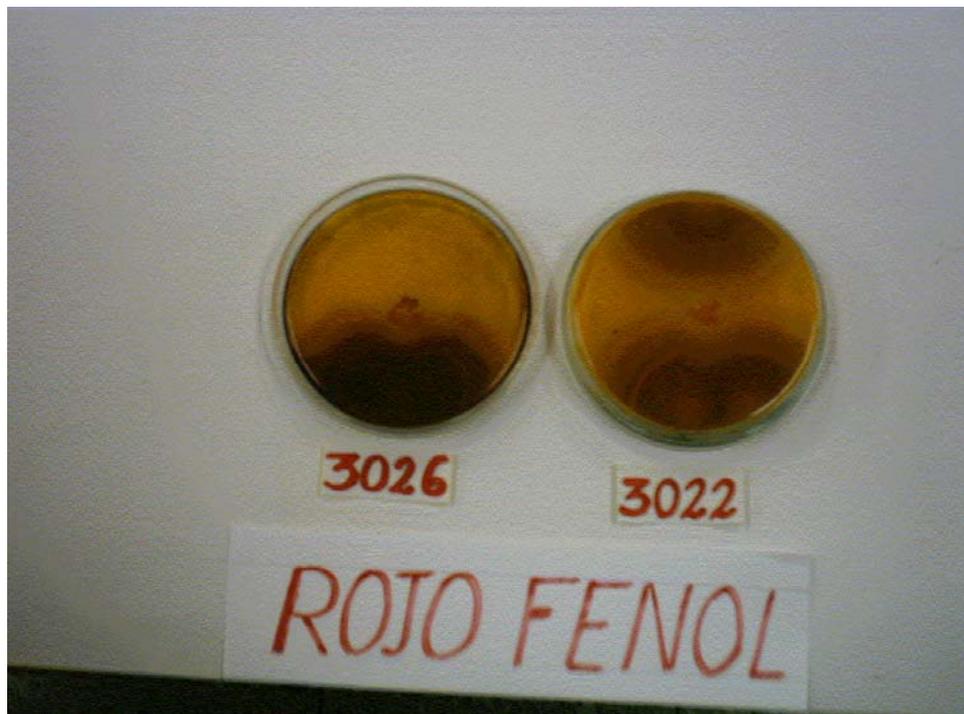


FIGURA No. 13 EFECTO DEL ENDOSULFÁN SOBRE EL CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Pleurotus sp*



FIGURA No. 14 CRECIMIENTO SUMERGIDO AGITADO DE CEPAS DE *Pleurotus sp* EN RESIDUAL VNAZA DE DESTILERÍA



