

EFFECTO DEL pH Y SALES INORGÁNICAS EN LA DEGRADACIÓN DE COLORANTES INDUSTRIALES POR *Pleurotus djamor*

Mario Peñafiel-García^{1*}, Cristhopher Romero-Zambrano¹, Carlos Moreira-Mendoza¹, Ernesto Rosero-Delgado¹

¹Escuela de Ingeniería Química. Facultad de Ciencias Matemáticas, Físicas y Químicas. Universidad Técnica de Manabí (UTM). Portoviejo, Manabí, Ecuador. E-mail: mario29javier03@gmail.com, mc_0096@hotmail.com, carlos.moreira@utm.edu.ec, ernestrosdel@gmail.com

*Autor para la correspondencia: mario29javier03@gmail.com

Recibido: 22-09-2020 / Aceptado: 05-07-2021 / Publicación: 30-08-2021

Editor Académico: Sedolfo Carrasquero¹

RESUMEN

En la presente investigación se planteó el uso de la cepa *Pd318* del hongo *Pleurotus djamor* como agente biorremediador, con el objetivo de evaluar su capacidad para degradar el colorante reactivo azul 19 (A19). Para ello se estudió la influencia que tienen cinco sales inorgánicas en el crecimiento y actividad lignolítica del hongo. Un cribado de sales inorgánicas en placa determinó que las sales $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ tienen mayor influencia en el desarrollo micelial y actividad lignolítica de la cepa. Ensayos de fermentación líquida (FEL) con diferentes combinaciones a distintas concentraciones de las sales de calcio y manganeso permitieron demostrar la capacidad de degradación del colorante azul 19 a los 7 días de fermentación líquida a temperatura ambiente y agitación constante. Los máximos porcentajes de degradación del colorante fueron obtenidos con las combinaciones A1B1 y A2B1 con 43,47% y 41,36%, respectivamente. Se observó que a un pH de 5 unidades se favorece la degradación del colorante. Los estudios en placa señalaron que la adición de sales de calcio y manganeso en 10 días de incubación favorecieron el desarrollo micelial y la actividad lignolítica de *Pd318*, mientras que en un sistema FEL de 7 días, únicamente la adición de manganeso influye favorablemente a la actividad lignolítica del hongo y en consecuencia a su capacidad de degradación de azul 19.

Palabras clave: Colorante azul 19, degradación de colorantes, enzimas lignolíticas, *Pleurotus djamor*.

EFFECT OF pH AND INORGANIC SALTS ON THE DEGRADATION OF INDUSTRIAL COLORS BY *Pleurotus djamor*

ABSTRACT

In the present investigation, the use of the *Pd318* strain of the *Pleurotus djamor* fungus as a bioremediation agent was proposed, with the aim of evaluating its ability to degrade reactive dye blue 19 (A19). For this, the influence of five inorganic salts on the growth and lignolytic activity of the fungus was studied. A plate screening of inorganic salts determined that the $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ salts have a greater influence on the mycelial development and lignolytic activity of the strain. Liquid fermentation tests (FEL) with different combinations at different concentrations of the calcium and manganese salts allowed to demonstrate the degradation capacity of the blue dye 19, after 7 days of liquid fermentation at room temperature and constant stirring, the maximum degradation percentages of the dye were obtained with the combinations A1B1 and A2B1 with 43.47% and 41.36% respectively. It was observed that at a pH of 5 units the



degradation of the dye is favored. The plate studies indicated that the addition of calcium and manganese salts in 10 days of incubation, favored mycelial development and the lignolytic activity of *Pd318*, while in a 7 day FEL system, only the addition of manganese favorably influenced the lignolytic activity of the fungus and consequently its ability to break down blue 19.

Keywords: Blue dye 19, dye degradation, lignolytic enzymes, *Pleurotus djamor*.

EFEITO DO pH E DOS SAIS INORGÂNICOS NA DEGRADAÇÃO DE CORANTES INDUSTRIAIS POR PLEUROTUS DJAMOR

RESUMO

Na presente investigação, foi proposta a utilização da cepa Pd318 do fungo *Pleurotus djamor* como agente de biorremediação, com o objetivo de avaliar sua capacidade de degradar o corante reactivo azul19 (A19). Para isso, foi estudada a influência de cinco sais inorgânicos no crescimento e na atividade lignolítica do fungo. Uma triagem de placa de sais inorgânicos demonstrou que os sais $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ têm maior influência no desenvolvimento micelial e na atividade lignolítica da cepa. Os testes de fermentação líquida (FEL) com diferentes combinações em diferentes concentrações dos sais de cálcio e manganês permitiram demonstrar a capacidade de degradação do corante azul 19 após 7 dias de fermentação líquida em temperatura ambiente e agitação constante. As percentagens máximas de degradação do corante foram obtidas com as combinações A1B1 e A2B1 com 43,47% e 41,36%, respectivamente. Observou-se que a um pH de 5 unidades a degradação do corante é favorecida. Os estudos em placa indicaram que a adição de sais de cálcio e manganês em 10 dias de incubação favoreceu o desenvolvimento micelial e a atividade lignolítica de Pd318, enquanto em um sistema FEL de 7 dias, apenas a adição de manganês influenciou favoravelmente a atividade lignolítica do fungo e, conseqüentemente, sua capacidade de decompor o azul 19.

Palavras-chave: Corante azul 19, degradação de corante, enzimas lignolíticas, *Pleurotus djamor*.

1. INTRODUCCIÓN

Los colorantes industriales son sustancias utilizadas en procesos de tinción de textiles, cosméticos y otros productos comerciales. A nivel industrial los procesos de tinción generan grandes cantidades de efluentes coloreados que muchas veces son vertidos en los cuerpos de agua sin recibir ningún tipo de tratamiento fisicoquímico (Singh & Arora, 2011). La contaminación por colorantes en los ecosistemas acuáticos no solo se limita al problema estético que representan, sino también otros efectos negativos como la disminución de la transmisión de la luz solar, lo cual provoca que los organismos fotosintéticos disminuyan su actividad y en consecuencia se produzca una disminución de los niveles de oxígeno disuelto (Ghaly, Ananthashankar, Alhattab & Ramakrishnan, 2014). Algunos estudios comparativos demuestran que los colorantes inducen efectos mutagénicos y carcinogénicos en organismos de diferente complejidad biológica, por lo que suponen un riesgo para la salud de microorganismos y de animales superiores, incluido el ser humano (Novotný et al., 2006; De Lima, et al., 2007 & Balakrishnan, et al., 2016).

El uso de hongos de pudrición blanca en procesos de tratamientos de efluentes industriales coloreados fue propuesto a partir de la década de los 80 (Rodríguez, Pickard & Vazquez-Duhalt, 1999), la utilización de sistemas biológicos para destruir o transformar compuestos tóxicos para el medio ambiente se conoce como biorremediación (Atlas & Unterman, 1998). Los hongos de pudrición blanca pertenecen a la clase de basidiomicetos, hongos que son conocidos por su capacidad de degradar lignina (Quintero, 2011). El uso de este tipo de hongos en la biorremediación es debido a un sistema enzimático extracelular de actividad no específica producido por el metabolismo de los mismos, las enzimas más significativas expresadas por estos organismos son lacasas (L), lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y veratril peroxidasa (VP), caracterizadas por tener una fuerte acción oxidante y por la capacidad de actuar una amplia gama de compuestos como herbicidas, pesticidas, hidrocarburos y colorantes industriales (Ijoma, & Tekere, 2017; Wali, Gupta, Gupta, Sharma, Salgotra & Sharma, 2020 & Zhuo, et al., 2011;). Entre los hongos con mayor potencial a emplearse en los tratamientos de biorremediación se encuentran citados *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* y *Pleurotus spp* (Cardona, Osorio & Quintero, 2009), sus principales ventajas su tolerancia a concentraciones considerablemente altas de compuestos contaminantes y capacidad de crecimiento a pH ácidos (Magan, Fragoeiro & Bastos, 2010).

La fermentación líquida (FEL) es uno de los métodos que permite un mayor control y manipulación de las condiciones de cultivo, puesto que durante estos ensayos es posible mantener la uniformidad de factores como el pH, temperatura, concentración de nutrientes y concentración del contaminante que se desea evaluar (Lee, et al., 2004).

Los microorganismos juegan un papel importante en la bioconversión de residuos orgánicos y, por tanto, se han vuelto prometedores para la obtención de enzimas de valor añadido (Menezes, et al., 2017). El uso de residuos lignolíticos en el medio de cultivo a modo de inductores provocan en los hongos basidiomicetos la producción de enzimas extracelulares, las cuales les permiten acceder a los nutrientes contenidos en los residuos (Thiribhuvanamala, Kalaiselvi, Parthasarathy, & Anusha, 2017).

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de la adición de sales de manganeso, calcio, magnesio, sodio y potasio, y de la variación en el pH inicial sobre la degradación del colorante textil azul reactivo 19 (A19) por el hongo *Pleurotus djamor*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Muestra de hongo

La muestra de *Pleurotus djamor* fue obtenida del banco de cepas del Laboratorio de Investigación Científica de la Universidad Técnica de Manabí, codificada como *Pd318*, la cual estaba contenida en Agar Papa Dextrosa (PDA) para su conservación y usos posteriores.

2.2. Preparación del soporte sólido

El soporte sólido utilizado para estimular la producción de enzimas fue el bagazo de caña de azúcar, el cual fue cortado, lavado y desinfectado con una solución de hipoclorito de sodio al 10%. Adicionalmente, fue sometido a un proceso de secado hasta alcanzar aproximadamente un 12% de humedad, luego se redujo el tamaño de partícula a 5 mm de diámetro mediante trituración mecánica y tamizado (Daza & Vera, 2019). El bagazo de caña fue obtenido de una licorería artesanal ubicada en el cantón Junín de la provincia de Manabí-Ecuador.

2.3. Cribado de inorgánicas en placa

El cribado de sales inorgánicas se realizó utilizando un medio sólido con la siguiente composición base para el control experimental; experimento A: Sulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]= 1 \text{ g.L}^{-1}$; sacarosa $[\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}]= 9,37 \text{ g.L}^{-1}$; peptona= $2,5 \text{ g.L}^{-1}$; ABTS (ácido 2,2 azino bis (3-etilbenzo tiazolin-6 sulfónico)= $0,25 \text{ g.L}^{-1}$; agar agar= 20 g.L^{-1}) (Daza & Vera, 2019; Jo, Kim, Seok, Jung & Park, 2014). El medio base fue complementado con 1 sal inorgánica para los experimentos B: cloruro de sodio, $[\text{NaCl}]$, C: fosfato monopotásico $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$, D: sulfato de magnesio heptahidratado $[\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}]$, E: sulfato de manganeso pentahidratado $[\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}]$ y F: cloruro de calcio dihidratado $[\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$, a una concentración de 1 g.L^{-1} c/u (Cardona, et al., 2009; Grandes, Téllez, Delgado, Rojas & Bibbins, 2013; Rojas & Hormaza, 2015 & Yonni, Fasoli & Álvarez, 2008) con el fin de

evaluar si las sales inorgánicas empleadas tienen efecto en el crecimiento micelial y expresión enzimática en el hongo *Pleurotus djamor* (cepa *Pd318*). Discos de micelio de *Pleurotus djamor* (cepa *Pd318*) de 5 mm de diámetro contenidos en agar papa dextrosa (PDA) se colocaron en el centro de cada placa de Petri (85 mm) que contenían aproximadamente 20 mL del medio de cultivo respectivo para los experimentos A, B, C, D, E y F. Cada medio experimental fue ajustado a pH= 5 utilizando hidróxido de sodio [NaOH] o ácido clorhídrico [HCl] al 1 meq.L⁻¹. Todos los medios experimentales se realizaron por duplicado. Los hongos fueron incubados en oscuridad durante 10 días a 29°C. Posteriormente, se examinó cada día el aumento del diámetro del halo de oxidación de ABTS contenido en los medios experimentales, el crecimiento micelial y la densidad de la colonia.

2.4. Efecto de la adición de sales en la degradación

El efecto de la adición de sales en la degradación del colorante textil A19 fue evaluado en un sistema de fermentación líquida (FEL), el cual se realizó en tubos Falcon de 50 mL que contenían 0,15 g del soporte sólido y 15 mL de un medio de cultivo sintético con la siguiente composición: sulfato de amonio [(NH₄)₂SO₄]= 1 g.L⁻¹; sacarosa [C₁₂H₂₂O₁₁]= 9,37 g.L⁻¹; y colorante azul 19 [A19]= 200 mg.L⁻¹ (Daza & Vera, 2019). Adicionalmente, se agregaron las sales inorgánicas seleccionadas en el cribado, siguiendo un diseño factorial multinivel de orden 3² mostrado en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Atributos del diseño factorial 3² en la degradación del colorante textil A19.

Sales	Nivel	Código de nivel	Concentración (g.L ⁻¹)
Factor A	Bajo	A1	0
	Intermedio	A2	1,5
	Alto	A3	3,0
Factor B	Bajo	B1	0
	Intermedio	B2	1,5
	Alto	B3	3,0

Fuente: Elaboración propia.

El medio fue ajustado a pH= 5 utilizando hidróxido de sodio [NaOH] o ácido clorhídrico [HCl] al 1 meq.L⁻¹ según el caso. Todos los tubos se esterilizaron en autoclave a 121 °C por 15 minutos y posteriormente fueron inoculados con un disco de micelio en agar de 5 mm de diámetro. Las combinaciones fueron realizadas por duplicado, adicionando tres tubos por cada combinación sin inocular con el objetivo de descartar la adsorción del colorante por el soporte sólido. Los tubos se incubaron en agitación vertical moderada por siete días a temperatura ambiente (Daza & Vera, 2019). La concentración de A19 fue evaluada en un espectrofotómetro THERMO SCIENTIFIC EVOLUTION 60S midiendo la absorbancia a 596 nm, la cual corresponde a la longitud de onda que absorbe A19 (Palmieri, Cennamo & Sannia, 2005). El porcentaje de degradación de A19 se calculó mediante la siguiente ecuación propuesta por Rojas y Hormaza (2016):

$$\%D = \frac{STP - CTP}{CI} * 100$$

Donde “%D” es el porcentaje de degradación del colorante A19, “CI” es la concentración inicial del colorante A19 en mg. L⁻¹, “STP” es la concentración final del colorante A19 del tratamiento sin presencia de *Pleurotus djamor* (cepa *Pd318*) (absorción del soporte sólido) en mg. L⁻¹ y “CTP” es la concentración final del colorante A19 del tratamiento en presencia de *Pleurotus djamor* (cepa *Pd318*) en mg. L⁻¹.

2.5. Efecto del pH inicial en la degradación de A19

En la evaluación del efecto del pH inicial en un sistema de fermentación líquida, se establecieron 3 niveles de pH, bajo, intermedio y alto: 2, 5 y 8 unidades, respectivamente (Barchuk, Fonseca, Giorgio, & Zapata, 2019 & Oviedo, Casas, Valencia & García, 2016). El ensayo se realizó utilizando la composición del medio de cultivo sintético de las combinaciones que registraron la mayor degradación durante el ensayo del apartado anterior. En total se evaluó el pH inicial a tres niveles para cada una de las combinaciones seleccionadas. El pH fue ajustado utilizando soluciones hidróxido de sodio [NaOH] o ácido clorhídrico [HCl] al 1 meq.L⁻¹. Los tubos se prepararon, se inocularon y se incubaron siguiendo el procedimiento mencionado en el experimento anterior. La concentración de A19 fue evaluada por espectrofotometría (Palmieri, et al., 2005).

2.6. Análisis estadísticos

El procesamiento de los datos estadísticos se efectuó mediante el software *Statgraphics Centurion XVI*. Para la selección de las sales inorgánicas se realizó una comparación de las medias del crecimiento micelial y expansión del halo de oxidación de ABTS, la selección se hizo utilizando una prueba de rangos múltiples mediante el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. El efecto de la adición de las sales fue evaluado mediante un diseño factorial multinivel de orden 3² mostrado en la **Tabla 1**. Las mejores combinaciones de sales se seleccionaron mediante la prueba de rangos múltiples. De la misma manera, el pH inicial óptimo para la degradación de A19 fue seleccionado comparando las medias del porcentaje de degradación mediante la prueba de rangos múltiples.

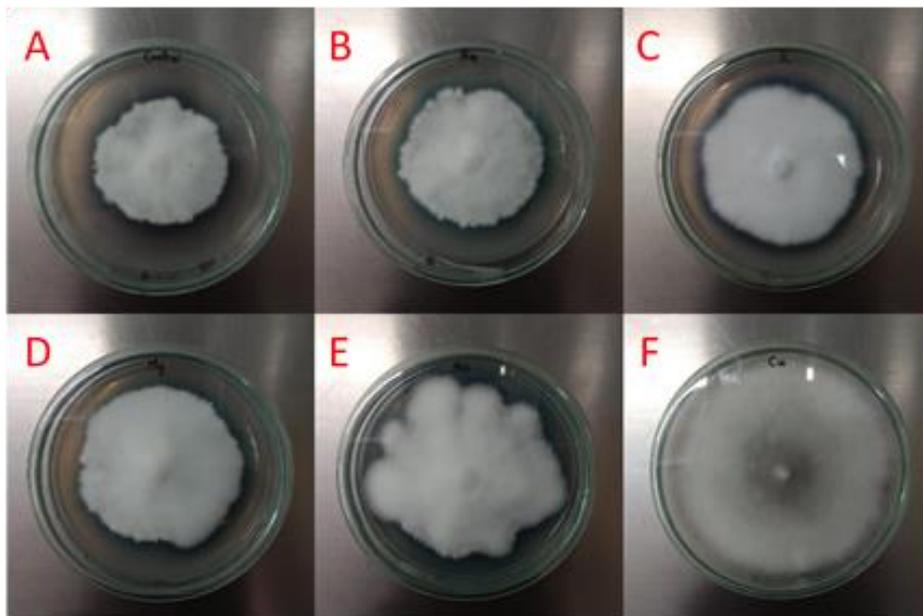
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Cribado de sales inorgánicas en placa

El crecimiento micelial en los experimentos: A, B, C, D y E fue similar con estructuras miceliales compactas y densas, a excepción del experimento F (**Figura 2**). En este caso, el micelio creció

desarrollando estructuras ramificadas, largas y de baja densidad, lo cual ha sido observado en otros estudios que indican que la adicción de Ca^{2+} provoca un crecimiento granular y más ramificado del micelio (Pera & Callieri, 1997).

Por otro lado, en todos los cultivos se observó una formación de un halo de color verde de diferente tamaño, el cual rodeaba el perímetro del micelio, esta coloración se debe a un compuesto producido por la oxidación que sufre el ABTS a causa de las enzimas lignolíticas (Bourbonnais, Leech & Paice, 1998). Según Montoya (2014), la longitud del diámetro del halo de oxidación de ABTS puede ser utilizada como un indicador para comparar la capacidad de expresión de la enzima lacasa entre varias cepas y especies de hongos.



A: Control, B: NaCl, C: KH_2PO_4 , D: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, E: $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, F: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Figura 2. Crecimiento micelial y actividad lignolítica de *Pleurotus djamor* (cepa Pd318) en medio sólido complementado con sales inorgánicas. A los 10 días de fermentación a 29°C .

Fuente: Elaboración propia.

En la **Tabla 2** se observa que la presencia de las sales de calcio y manganeso favoreció al crecimiento micelial, alcanzando una media de 9,00 cm y 7,93 cm, respectivamente. De la misma manera, la mayor expansión del halo de oxidación de ABTS fue observado con la adición de las sales de calcio y manganeso, alcanzando una media de 9,00 cm y 8,23 cm al décimo día de incubación. El medio con la sal de calcio reportó el crecimiento más rápido, debido a que al término del séptimo día el micelio ya había colonizado toda la superficie de la placa de Petri, en comparación con los experimentos que no contaban con esta sal, los cuales mostraron un crecimiento de aproximadamente el 60% de la superficie.

Tabla 2. Crecimiento micelial y presencia de actividad de la enzima Lacasa de *Pleurotus djamor* (cepa Pd318) a 29°C

a los 10 días de fermentación.

Sal inorgánica	Crecimiento del micelio (cm)	Actividad Lacasa en ABTS (cm)	Densidad del micelio
Control	5,83±0,35 ^a	6,30±0,33 ^a	MD
NaCl	5,98±0,14 ^a	6,38±0,10 ^a	MD
MgSO ₄ .7H ₂ O	6,60±0,12 ^b	6,95±0,08 ^b	HD
KH ₂ PO ₄	6,68±0,10 ^b	7,13±0,02 ^b	HD
MnSO ₄ .5H ₂ O	7,93±0,18 ^c	8,23±0,22 ^c	HD
CaCl ₂ .2H ₂ O	9,00±0,00 ^d	9,00±0,00 ^d	LD

HD: Densidad alta, MD: Densidad media, LD: Densidad baja. ±: Desviación estándar

^{a-d}: Los valores en las columnas de crecimiento micelial y actividad de la enzima lacasa en ABTS con diferente letra difieren en la prueba de rango múltiple de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. ($\alpha=0,05$).

Fuente: Elaboración propia.

3.2. Efecto de la adición de sales en la degradación de A19

Los resultados mostraron que a medida que la concentración de sales de manganeso (Factor A) y calcio (Factor B) disminuyó se maximizó la degradación de A19. Los valores máximos de degradación se registraron en las combinaciones A1B1 (43,47%) y A2B1 (41,36%) (**Tabla 3**). Los porcentajes de decoloración obtenidos fueron menores que los reportados por Cardona et al. (2009), los cuales obtuvieron entre 82 y 98% de decoloración de medios líquidos en colorantes industriales. De igual manera, Grandes et al. (2013), obtuvieron hasta 95% de decoloración de A19 en ensayos de fermentación líquida, lo cual podría deberse a que estos investigadores no utilizan un soporte sólido en el medio de cultivo.

Tabla 3. Efecto combinado de las sales de MnSO₄.5H₂O (factor A) y CaCl₂.2H₂O (factor B) en la degradación de A19 (200 mg.L⁻¹) por *Pleurotus djamor* (cepa *Pd318*) a 29°C. pH= 5 a los 7 días FEL.

Combinación	Concentración Inicial (mg.L ⁻¹)	Concentración final (mg.L ⁻¹)	Absorción soporte sólido (%)	Degradación azul19 (%)	Color ^a
A1B1	197,33	18,88±0,03	46,96±0,26	43,47±0,02 ^a	R-
A1B2	196,26	9,19±0,11	63,76±0,83	31,75±0,07 ^b	R-
A1B3	198,12	19,33±1,59	71,65±0,14	18,48±0,98 ^{cd}	R+
A2B1	196,29	12,35±1,61	52,60±0,89	41,36±1,00 ^a	R-
A2B2	203,34	18,36±3,97	70,27±0,21	19,83±2,39 ^d	R+
A2B3	195,11	20,85±4,77	73,77±1,03	15,84±3,00 ^e	R-
A3B1	196,36	10,66±2,65	65,33±0,11	29,41±1,66 ^b	R-
A3B2	205,23	14,84±0,14	70,99±0,32	20,66±0,08 ^d	R-
A3B3	196,41	28,21±5,60	73,94±0,84	11,82±3,49 ^e	G

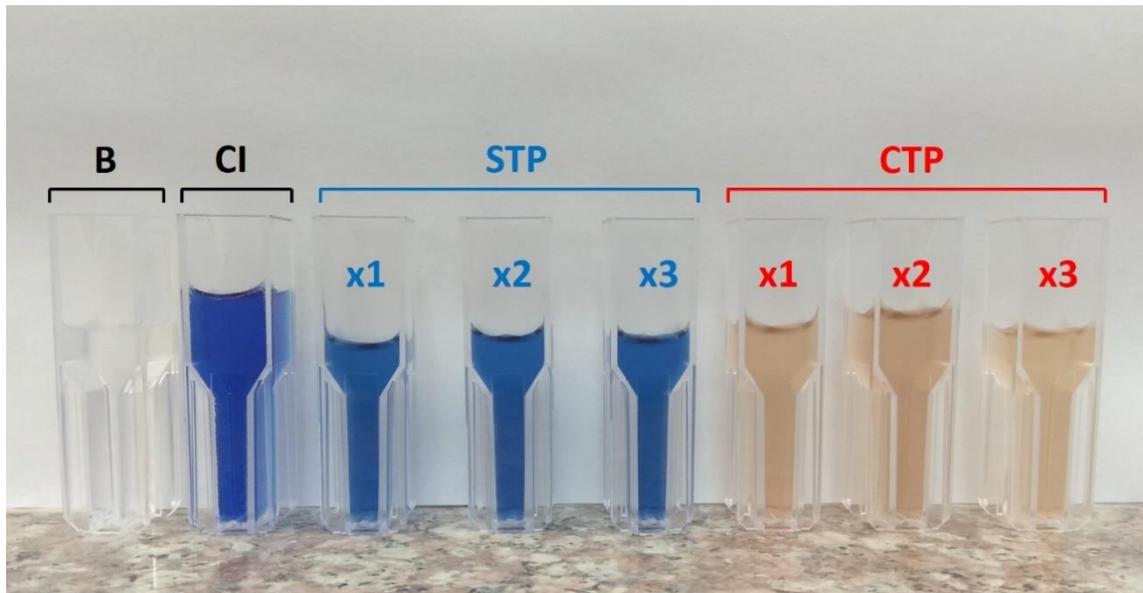
a: R+: rojo, R-: rojo menos intenso, G: gris.

^{a-d}: Los porcentajes de degradación de azul 19 con diferente letra difieren en la prueba de rango múltiple de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. ($\alpha=0,05$). ±: Desviación estándar.

Fuente: Elaboración propia.

En las réplicas que no fueron sometidas al tratamiento de *Pleurotus djamor* (cepa *Pd318*) (STP) se observó que a pH de 5 unidades y en función de la concentración de sales en el medio de cultivo, el soporte sólido absorbió entre el 46 y 73% de la concentración inicial de A19. En la **Figura 3** se

observa una diferencia en la intensidad del colorante entre los tratamientos en presencia de la cepa *Pd318* del hongo *Pleurotus djamor* y los que no contenían la misma.



B: blanco de medición, CI: concentración inicial de A19, STP: réplicas sin *Pleurotus djamor* (cepa *Pd318*), CTP: réplicas con *Pleurotus djamor* (cepa *Pd318*).

Figura 3. Efecto combinado de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en la degradación de A19 ($200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) por *Pleurotus djamor* (cepa *Pd318*) a los 7 días FEL. Combinación A1B1.

Fuente: Elaboración propia.

A partir del tercer día de fermentación se observó que en casi todas las combinaciones la solución empezó a tomar un cambio de coloración entre violeta y rojo (R+) hasta alcanzar el color rojo menos intenso (R-) al séptimo día de fermentación, como se observa en la Figura 4. Toh et al. (2003), mencionaron que la acción de enzimas lignolíticas sobre los colorantes reactivos como A19 puede provocar la ruptura del mismo en múltiples compuestos. Al respecto, Christie (2001) informa que es posible que el cambio de coloración se deba a la ruptura del cromóforo aromático derivado de la antraquinona y del grupo auxocrómico ($-\text{NH}_2$), los cuales son responsables de la intensidad y coloración de A19. Por otra parte, se descartó que este fenómeno se deba a una posible reacción entre las sales de Mn y Ca adicionadas al medio, ya que en la combinación A1B1 que no contiene las sales mencionadas, pero si contiene el hongo *Pleurotus djamor* (cepa *Pd318*), se observó un cambio de coloración similar a las de los tratamientos que tienen presencia de estas sales (**Figura 4**).

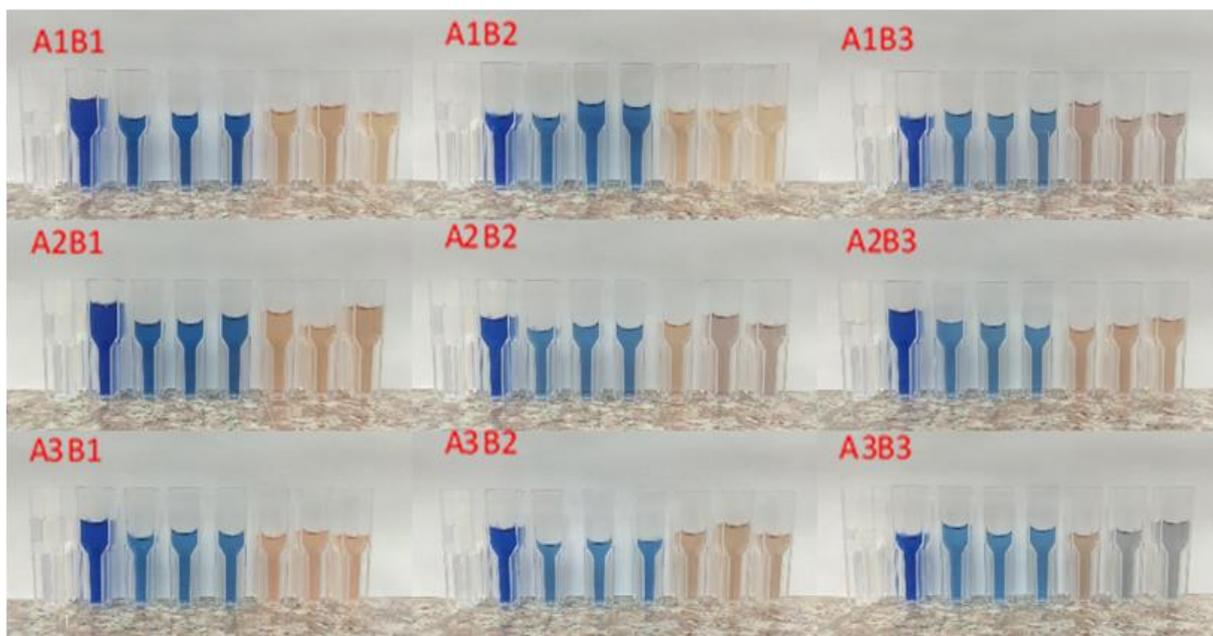


Figura 4. Efecto combinado de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en la degradación de A19 ($200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) por *Pleurotus djamor* (cepa Pd318) a los 7 días FEL.
Fuente: Elaboración propia.

El diagrama de Pareto (**Figura 5**) señala los efectos que tienen las sales de manganeso (A) y calcio (B) en la degradación de A19. En el diagrama se puede observar que cuando las sales son agregadas de manera individual (A y B color azul), estas tienen mayor efecto en la degradación del colorante textil A19, y que la interacción de conjunta de las sales (AB color gris) no tiene un efecto relevante. Estos efectos se corroboran con los datos de porcentaje de degradación de azul 19 mostrados en la **Tabla 3**.

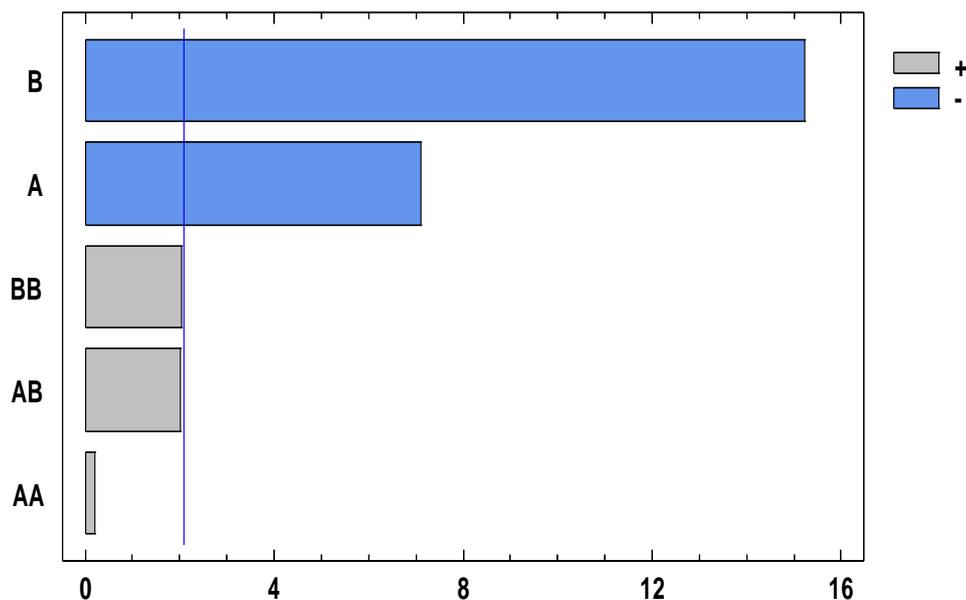


Figura 5. Diagrama de Pareto estandarizado para el porcentaje de degradación para el efecto combinado de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en la degradación de azul 19 ($200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) por *Pleurotus djamor* (cepa Pd318) a los 7 días FEL.
Fuente: Elaboración propia.

3.3. Efecto del pH inicial en la degradación de A1

Los niveles de pH evaluados en las combinaciones de sales seleccionadas muestran que *Pleurotus djamor* (cepa *Pd318*) presenta una mayor expresión lignolítica a pH de 5 unidades debido a que a ese valor se observaron los mayores porcentajes de degradación del colorante A19, mientras que a pH de 8 unidades la degradación ocurrió en menor medida; por su parte, a pH de 2 unidades no existe desarrollo alguno del hongo (**Tabla 4**). La prueba de rangos múltiples ($\alpha=0,05$) determinó que no existen grupos homogéneos en los distintos niveles de pH evaluados. Los máximos porcentajes de degradación fueron alcanzados a pH= 5, 43,47% para la combinación A1B1 y 41,36% para la combinación A2B1. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Guillén, et al. (1998), quienes determinaron que la mayor velocidad de crecimiento en *P. ostreatus* se encuentra en el rango de pH de 4,5 a 5,5. De la misma manera, Rawte y Diwan (2011) determinaron que el pH óptimo para una fermentación con hongos del género *Pleurotus* es de pH= 5, adicionalmente reportaron que con valores inferiores a pH= 3 no se observa ningún crecimiento.

Tabla 4. Efecto del pH en la degradación de A19 por *Pleurotus djamor* (cepa *Pd318*) a 29°C.

Combinación	Nivel de pH	% Degradación
A1B1	2	NEC
	5	43,47±0,02
	8	33,96±2,33
A2B1	2	NEC
	5	41,36±1,00
	8	19,04±1,00

NEC: no existe desarrollo del hongo.

±: Desviación estándar

Fuente: Elaboración propia.

4. CONCLUSIONES

El hongo basidiomiceto *Pleurotus djamor* (cepa *Pd318*) demostró tener la capacidad de degradar el colorante textil azul 19 (A19) en un sistema de fermentación líquida (FEL) utilizando bagazo de caña de azúcar pretratado como soporte sólido e inductor enzimático. La cepa fue capaz de crecer en presencia de una concentración alta del colorante (200 mg.L⁻¹) y reducir este valor en un 43,47% a un inicial de 5 unidades. Los experimentos demostraron que el pH del medio de cultivo fue un factor determinante para el desarrollo del hongo y su expresión de enzimas lignolíticas ya que, el hongo *Pleurotus djamor* presentó un mayor desarrollo y expresión a pH de 5 unidades. El sistema biológico evaluado puede ser usado como agente biorremediador en aguas contaminadas con colorantes, y ser una alternativa al tratamiento de efluentes con dicha problemática. Es importante considerar que durante el proceso el soporte sólido adsorbe un alto porcentaje del colorante presente en el medio,

por lo cual sería conveniente evaluar un sistema mixto de biorremediación de aguas contaminadas con alta carga de colorantes.

5. REFERENCIAS

- Atlas R., & Unterman R. (1998). Bioremediation. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Second edition. SM Press, Washington D.C., 666-681.
- Balakrishnan V. K., Shirin S., Aman A. M., de Solla S. R., Mathieu-Denoncourt J. & Langlois V. S. (2016). Genotoxic and carcinogenic products arising from reductive transformations of the azo dye, Disperse Yellow 7. *Chemosphere*, 146, 206-215. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.11.119>
- Barchuk M., Fonseca M., Giorgio E. & Zapata P. (2019). Efectos de pH, temperatura y tiempo de incubación sobre el crecimiento fúngico y la actividad lacasa en *Trametes villosa* BAFC 2755. *Revista de Ciencia y Tecnología*, 32(1), 91-98. <https://doi.org/10.36995/j.recyt.2019.32.015>
- Bourbonnais R., Leech D. & Paice M. (1998). Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1379(3), 381–390. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(97\)00117-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(97)00117-7)
- Cardona M., Osorio J. & Quintero J. (2009). Degradación de colorantes industriales con hongos ligninolíticos. *Revista de Ingeniería Universidad de Antioquía*, 48, 27-37. <http://www.scielo.org.co/pdf/rfiua/n48/n48a03.pdf>
- Chan Cupul, W., Heredia Abarca, G. P. & Rodríguez Vázquez, R. (2016). Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática ligninolítica de macromicetos del estado de Veracruz, México. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 32(3), 339-351. <https://doi.org/10.20937/rica.2016.32.03.08>
- Christie R. (2001) Colour Chemistry. *The Royal Society of Chemistry*, Cambridge, United Kingdom.
- Daza V. & Vera P. (2019). Diseño de un medio de cultivo para la producción de metabolitos con aplicación práctica en la biodegradación de colorantes industriales. <https://utm.edu.ec/component/search/?searchword=Diseño%20de%20un%20medio%20de%20cultivo&searchphrase=all>
- De Lima, R. O. A., Bazo, A. P., Salvadori, D. M. F., Rech, C. M., de Palma Oliveira, D. & de Aragão Umbuzeiro, G. (2007). Mutagenic and carcinogenic potential of a textile azo dye processing plant effluent that impacts a drinking water source. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 626(1-2), 53-60. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.08.002>
- Ghaly A. E., Ananthashankar R., Alhattab M. & Ramakrishnan V.V. (2014). Production, characterization and treatment of textile effluents: a critical review. *Journal of Chemical Engineering & Process Technology*, 5(1), 1-19. <https://doi.org/10.4172/2157-7048.1000182>
- Grandes A., Díaz G., Téllez M., Delgado R., Rojas M. & Bibbins M. (2013). Ligninolytic activity patterns of *Pleurotus ostreatus* obtained by submerged fermentation in presence of 2,6-dimethoxyphenol and remazol brilliant blue R dye. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 43(5), 468-480. <https://doi.org/10.1080/10826068.2012.746233>
- Guillén G., Márquez F. & Sánchez J. 1998. Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. *Revista Iberoamerica de Micología*, 15, 302-306. <http://reviberoammicol.com/1998-15/302306.pdf>
- Ijoma, G. N., & Tekere, M. (2017). Potential microbial applications of co-cultures involving ligninolytic fungi in the bioremediation of recalcitrant xenobiotic compounds. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 14(8), 1787-1806. <https://doi.org/10.1007/s13762-017-1269-3>
- Jo W. S., Kim D. G., Seok S. J., Jung H. Y. & Park S. C. (2014). The culture conditions for the mycelial growth of *Auricularia auricula-judae*. *Journal of Mushrooms*, 12(2), 88-95. <https://doi.org/10.14480/JM.2014.12.2.88>
- Lee B. C., Bae J. T., Pyo H. B., Choe T. B., Kim S. W., Hwang H. J. & Yun J. W. (2004). Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(5), 369-376. <https://doi.org/10.1016/j.enzymtec.2003.12.015>
- Magan N., Fragoeiro S. & Bastos C. (2010). Environmental factors and bioremediation of xenobiotics using white rot fungi. *Mycobiology*, 38(4), 238-248. <https://doi.org/10.4489/myco.2010.38.4.238>
- Menezes D.B., Brazil O. A., Romanholo-Ferreira L. F., de Lourdes T. M., Ruzene D. S., Silva D. P. & Hernández-Macedo M. L. (2017). Prospecting fungal ligninases using corncob lignocellulosic fractions. *Cellulose*, 24(10), 4355-4365. <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1427-2>
- Montoya S., Sánchez O. & Levin L. (2014). Evaluación de actividades endoglucanasa, exoglucanasa, lacasa y lignina peroxidasa en diez hongos de pudrición blanca. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 12(2), 115-124. <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v12n2/v12n2a13.pdf>
- Novotný Č., Dias N., Kapanen A., Malachová K., Vándrovová M., Itävaara M. & Lima N. (2006). Comparative use of bacterial, algal and protozoan tests to study toxicity of azo-and anthraquinone dyes. *Chemosphere*, 63(9), 1436-1442. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.10.002>

- Oviedo J., Casas A., Valencia J. & García L. (2016). Evaluación de tres variables de crecimiento del *Pleurotus pulmonarius* sobre tusa de maíz empleando procesamiento digital de imágenes. *Información tecnológica*, 27(5), 27-36. <https://doi.org/10.4067/s0718-07642016000500004>
- Palmieri G., Cennamo G. & Sanna G. (2005). Remazol brilliant blue R decolourisation by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(1), 17-24. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.03.026>
- Pera L. M. & Callieri D. A. (1997). Influence of calcium on fungal growth, hyphal morphology and citric acid production in *Aspergillus niger*. *Folia microbiologica*, 42(6), 551-556. <https://doi.org/10.1007/BF02815463>
- Quintero J. (2011). Degradación de plaguicidas mediante hongos de la pudrición blanca de la madera. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 64(1), 5867-5882. <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v64n1/a12v64n01.pdf>
- Rawte, H., & Diwan, R. (2011). Growth response of *Pleurotus spp.* on different basal media and different pH levels. *Journal of Ecobiotechnology*, 3(4), 10-12. <https://updatepublishing.com/journal/index.php/jebt/article/view/136/135>
- Rodríguez E, Pickard M. & Vazquez-Duhalt R. (1999). Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Current Microbiology*, 38, 27-31. <https://doi.org/10.1007/PL00006767>
- Rojas J. & Hormaza A. (2015). Evaluación de la biodegradación del colorante azul brillante utilizando hongos de la podredumbre blanca y sus consorcios. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 19(1), 179-187. <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v19n1/v19n1a21.pdf>
- Singh K. & Arora S. (2011). Removal of synthetic textile dyes from wastewaters: a critical review on present treatment technologies. *Critical reviews in environmental science and technology*, 41(9), 807-878. <https://doi.org/10.1080/10643380903218376>
- Thiribhuvanamala, G., Kalaiselvi, G., Parthasarathy, S., & Anusha, B. (2017). Induction of lignolytic enzyme activities in different agro residues by the white rot fungi, *Pleurotus sajar-caju*. *International Journal of Chemical Studies*, 5(2), 89-94. <https://www.chemjournal.com/archives/2017/vol5issue2/PartB/5-1-34-980.pdf>
- Toh Y.C., Yen J.J.L., Jia L., Obbard J.P. & Ting Y.P. (2003). Decolorization of azo dyes by white-rot fungi (WRF) isolated in Singapore. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 69-575. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00177-7](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00177-7)
- Wali A., Gupta M., Gupta S., Sharma V., Salgotra R. K. & Sharma, M. (2020). Lignin degradation and nutrient cycling by white rot fungi under the influence of pesticides. *3 Biotech*, 10(6), 266-266. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02251-z>
- Yonni F., Fasoli H. & Álvarez H. (2008). Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad sobre colorantes textiles. *Higiene y Sanidad Ambiental*, 8, 331-334. [https://saludpublica.ugr.es/sites/dpto/spublica/public/inline-files/bc51018b8e7e129_Hig.Sanid_Ambient.8.331-334\(2008\).pdf](https://saludpublica.ugr.es/sites/dpto/spublica/public/inline-files/bc51018b8e7e129_Hig.Sanid_Ambient.8.331-334(2008).pdf)
- Zhuo R., Ma L., Fan F., Gong Y., Wan X., Jiang M., Zhang X. & Yang Y. (2011). Decolorization of different dyes by a newly isolated white-rot fungi strain *Ganoderma sp.* En3 and cloning and functional analysis of its laccase gene. *Journal of hazardous materials*. 192(2):855-873. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.05.106>

Contribución de autores

Autor	Contribución
Mario Peñafiel-García	Concepción y diseño, redacción del artículo, metodología, revisión, búsqueda bibliográfica, búsqueda de información.
Cristhopher Romero-Zambrano	Concepción y diseño, redacción del artículo, metodología, revisión, búsqueda bibliográfica, búsqueda de información.
Carlos Moreira-Mendoza	Revisión.
Ernesto Rosero-Delgado	Concepción y diseño, metodología, revisión, validación.

Citación sugerida: Peñafiel, M., Romero, C., Moreira, C., Rosero, E. (2021). EFECTO DEL pH Y SALES INORGÁNICAS EN LA DEGRADACIÓN DE COLORANTES INDUSTRIALES POR *Pleurotus djamor*. Revista Bases de la Ciencia, 6(2), 13-26. DOI: https://doi.org/10.33936/rev_bas_de_la_ciencia.v%vi%i.2670 Recuperado de: <https://revistas.utm.edu.ec/index.php/Basedelaciencia/article/view/2670>
