

Selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* para la decoloración de efluentes industriales

Suyén Rodríguez Pérez, Rosa C. Bermúdez Savón
Manuel Serrat Díaz, Ansoumane Kourouma

Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente,
Patricio Lumumba s/n CP. 90500, Santiago de Cuba. Cuba

Selection of *Pleurotus ostreatus* strains for the decolorization of industrial wastewaters

Abstract: The use of white-rot mushrooms has become a promising alternative for the treatment of coloured wastewaters and the degradation of dyes. In the following research a study was made for the selection of *Pleurotus ostreatus* strains for the treatment of coloured effluents, for which a screening method was used based on parameters such as the growth rate at room temperature and in media supply with dyes and coloured wastewaters. The decolorization of vinasse and aqueous extract of the coffee pulp was assayed in submerged fermentation with agitation using different strains. In both wastewaters, colour removals higher than 50 % were achieved employing the *P. ostreatus* selected strains.

Key words: *Pleurotus*, screening, coloured wastewaters, dyes, coffee pulp, vinasses.

Resumen: El empleo de hongos de pudrición blanca ha devenido una alternativa prometedora para el tratamiento de efluentes coloreados o la degradación de tintes y colorantes. En la siguiente investigación se hizo un estudio para la selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* con potencial para el tratamiento de efluentes coloreados. Con este objetivo se utilizó una estrategia de selección basada en parámetros como el índice de crecimiento a temperatura ambiente, en medios con colorantes y en residuales coloreados. Se ensayó además la decoloración de los residuales líquidos de destilería (vinaza) y del cultivo de setas comestibles (extracto líquido de pulpa de café), mediante el cultivo sumergido de este hongo. En ambos casos la remoción del color por encima del 50 % se alcanzó con las cepas seleccionadas.

Palabras clave: *Pleurotus*, selección de cepas, efluentes industriales, colorantes, pulpa de café, vinazas.

Received 13 June 2005; accepted 6 June 2006.

Recibido 13 de junio 2005; aceptado 6 de junio 2006.

Introducción

Los efluentes industriales causan diferentes impactos sobre el medio ambiente. El color está generalmente asociado a la presencia de compuestos tóxicos con grupos cromóforos o polímeros de alto peso molecular. Los desechos industriales con un alto grado de color, tienen un gran poder de

*Autor para la correspondencia: Suyén Rodríguez Pérez
suyen@cebi.uo.edu.cu*

bioacumulación y una baja velocidad de depolimerización. Esto supone 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 y en consecuencia una disminución en la actividad fotosintética de los ecosistemas acuáticos, reduciéndose el contenido de oxígeno disuelto y afectando a los organismos acuáticos [5, 13]. Durante el tratamiento de un residual coloreado se debe prestar atención a la reducción o eliminación del color,

contribuyendo de esta forma a reducir el impacto sobre los ecosistemas donde son vertidos.

En la actualidad se dispone de tratamientos fisicoquímicos 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 [9, 14]. En la década de los 80, se comenzó a emplear los hongos de pudrición blanca en la decoloración de residuales, por su capacidad de degradar compuestos de compleja estructura molecular mediante un sistema enzimático oxidativo de carácter no específico, siendo *Phanerochaete chrysosporium* la especie más estudiada [4, 11, 19].

Varias especies del género *Pleurotus*, son cultivadas en zonas tropicales por sus facilidades para crecer sobre una gran diversidad de residuos agroindustriales y las óptimas cualidades nutritivas y organolépticas de sus cuerpos fructíferos [17]. Estos hongos también han sido investigados por su capacidad para decolorar efluentes y degradar compuestos xenobióticos, pues su sistema enzimático ligninolítico posee un amplio espectro de sustratos sobre los cuales actúan [4, 10]. La utilización de *Pleurotus* spp. en el tratamiento de efluentes coloreados pudiera ser una alternativa para disminuir el efecto contaminante de los residuales, por lo que se hace necesaria la selección de cepas que posean potencialidades para estos usos.

En la región oriente de Cuba se generan dos efluentes industriales, uno es el extracto líquido de pulpa de café (ELP), el cual se obtiene en las plantas de cultivo de las setas comestibles durante la pasteurización del sustrato, generándose alrededor de 20 l de efluente por cada Kg de pulpa de café pasteurizada. Se calcula que para la producción de 1 Kg de setas comestibles se generan aproximadamente 67 l de esta agua residual, la cual debe ser previamente tratada a su vertido en los cuerpos receptores, ya que presenta un intenso color por contener fundamentalmente polifenoles [14, 20]. El segundo efluente generado es la vinaza de destilería (V), también conocida como mosto, residual líquido de las

plantas de producción de alcohol, líquido obtenido después de las fermentaciones de las mieles finales y de la destilación para la producción del alcohol, liberándose aproximadamente 15 l de vinaza por cada litro de alcohol producido. En ambos casos, la coloración de los residuales se debe a la presencia de compuestos de alto peso molecular estructuralmente diferentes, pero que pueden resultar recalcitrantes a la biodegradación. El efecto contaminante del ELP se produce al pasar elementos de la fracción soluble de la pulpa de café al agua de pasteurización y su color oscuro, es debido a la presencia de compuestos polifenólicos como el ácido clorogénico y los taninos, descritos en trabajos previos con actividad antimicrobiana [6, 15, 20]. En la vinaza, los compuestos responsables del color son las melanoidinas y los caramelos, llegando a representar las primeras entre el 70 y el 80 % del peso de las sustancias coloreadas [9]. Las melanoidinas son polímeros de alto peso molecular y frecuentemente son tóxicas para los microorganismos utilizados en el biotratamiento de efluentes [7, 13].

Ambos efluentes son generados por importantes actividades industriales de nuestra región y su vertimiento en los ecosistemas acuáticos existentes provoca un impacto negativo. Estos efluentes han sido tratados por métodos biológicos convencionales, fundamentalmente anaerobios, pero bajo estas condiciones, el color y algunos compuestos de difícil biodegradabilidad permanecen inalterables [2, 3].

El objetivo de este trabajo fue seleccionar cepas de *Pleurotus ostreatus* para el tratamiento de los residuales coloreados ELP y V. Se ensayó además la decoloración de los efluentes con la cepa seleccionada de *P. ostreatus* en cultivos sumergidos de vinaza y pulpa de café, relacionándola con la actividad de sus enzimas ligninolíticas.

Materiales y métodos

Se estudiaron ocho cepas de *Pleurotus ostreatus* depositadas

en la Colección de Cultivos del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI), de la Universidad de Oriente, Cuba. Las cepas están registradas como: 3021, 3022, 3023, 3024, 3025, 3026, 3028 y 3035, proceden de la Colección Mundial de Hongos Comestibles y fueron donadas por el Dr J. Labarere. Las cepas son mantenidas en agar malta (AM) y para realizar la presente investigación fueron transferidas a placas de agar papa dextrosa (APD), el cual fue utilizado como medio basal de referencia.

Para la selección de cepas en medio sólido se prepararon placas de APD suplementado con compuestos fenólicos recalcitrantes, como los colorantes azul de bromofenol (0.1 %) y rojo fenol (0.1 %), además de guayacol (10 mM). El tiempo de incubación de los cultivos fue de siete días, y la selección de las cepas se basó en: a) índice de crecimiento de las cepas a temperatura ambiente (30-35°C), b) variaciones en los índices de crecimiento de los cepas en APD (medio control) y los suplementados con los colorantes, y c) formación de un halo rojizo en los medios en cultivos, como consecuencia de la excreción de enzimas fenoloxidasas.

Las cepas que presentaron mejores índices de crecimiento en los medios suplementados fueron utilizadas para evaluar su crecimiento sobre los efluentes industriales de vinaza (V) y extracto líquido de pulpa de café (ELP), para ello las cepas fueron cultivadas en placas de medio de cultivo preparado con los siguientes compuestos (g/l): glucosa 20, extracto de levadura 0.5, L asparagina 0.65, KH_2PO_4 1s, KCl 0.5, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5. Los efluentes fueron añadidos en concentraciones del 25 %, 50 %, 100 % (v:v). Para la solidificación del medio se añadió agar al 2 % y el pH se ajustó a 6.5. La evaluación de las cepas se basó en los índices de crecimiento alcanzados entre los diferentes tratamientos y el medio de cultivo control (APD). El radio del crecimiento micelial fue medido diariamente y la tasa de crecimiento específica (μ) fue estimada a partir del índice de crecimiento micelial, considerando que la zona periférica de crecimiento

(w) no varía significativamente, pues se mantienen constantes las condiciones de cultivo [22].

Posteriormente se evaluó la capacidad de decoloración de las cepas en medio líquido conteniendo los efluentes. Para esta prueba el medio basal fue preparado de manera similar al experimento anterior, sin agregar agar, y los residuales V y ELP se añadieron al 50% (v/v). La incubación se realizó a 30 °C, en la oscuridad y bajo agitación en zaranda orbital a 120 rpm, evaluando la decoloración durante 10 días de crecimiento micelial. La luminancia de las muestras líquidas fue considerada la medida de color, según refiere el Standard Methods [1]. Para ello se realizó la lectura de las transmitancias de las muestras (diluciones 1/10), empleando las siguientes diez longitudes de onda diferentes: 489.5, 515.2, 529.8, 541.4, 551.8; 561.9, 572.5; 584.8, 600.8, 627.3 nm. En todos los experimentos se utilizaron tres réplicas en cada tratamiento y los resultados obtenidos son el promedio de dos experimentos realizados.

Resultados y discusión

Las especies de *Pleurotus* pueden crecer en un intervalo amplio de temperaturas (7-35 °C) con un óptimo para *P. ostreatus* entre 25 a 30 °C [22].

De las ocho cepas estudiadas, la 3021 y la 3025 presentaron un crecimiento escaso a nulo a las temperaturas ensayadas (30-35 °C), utilizando este criterio como excluyente para continuar el proceso de selección, ya que los residuales de interés en esta investigación, constituyen vertidos de procesos industriales o semindustriales donde previo a su liberación se realizan tratamientos térmicos como parte del proceso productivo (ej. destilaciones, pasteurizaciones). Por lo anterior, poseer cepas que crezcan a temperaturas por encima de los 30 °C posibilita reducir el tiempo de tratamiento o evita establecer sistemas de enfriamiento para los residuales. Además, las temperaturas

ambientales predominantes en la región de estudio fluctúan entre los 30-35 °C, por lo que era necesario contar con organismos con un crecimiento óptimo bajo estas condiciones.

Por otra parte, el empleo de colorantes a menudo sirve de referencia para conocer si un determinado microorganismo posee capacidad para degradar determinadas estructuras químicas, que constituyen la base de los grupos cromóforos de los componentes de muchos residuales coloreados [8]. Es por eso que en este trabajo se comparó el crecimiento de las cepas en medio APD, con el crecimiento producido en el medio suplementado con los colorantes azul de bromofenol y rojo fenol. Los mayores índices de crecimiento correspondieron a las cepas 3022, 3024 y 3035 para los cultivos con azul de bromofenol, y las cepas 3022, 3024 y 3028 para el medio suplementado con rojo fenol (Tabla 1). En contraste, la cepa 3026 presentó los índices de crecimiento más bajos en ambas condiciones.

En la mayoría de las cepas se mostró una estimulación del crecimiento por adición al medio de azul de bromofenol, aunque no se observaron halos de decoloración. Esto podría indicar que a las concentraciones del colorante ensayadas, la cantidad de haluros presentes en la estructura química de este compuesto, no resultaron tóxicos para el crecimiento de estas cepas. Además, este colorante resultó recalcitrante al ataque del sistema enzimático ligninolítico

característico de este basidiomiceto, constituido básicamente por lacasa y manganeso peroxidasa, aunque este resultado también pudo deberse a que el tiempo de incubación no fue suficiente para que el hongo excretara al medio las enzimas capaces de degradar esta estructura compleja, probablemente del tipo peroxidasa, que por lo general son detectadas en estadios avanzados del crecimiento, durante la idiofase [19].

En el ensayo con rojo fenol se observó cierta toxicidad de este componente para las cepas de *P. ostreatus*, lo cual puede ser el resultado del incremento de los grupos fenólicos de su estructura. En las placas donde hubo un crecimiento mayor se evidenció decoloración del medio, tornándose de rojo a amarillo tenue, cambio que comenzó a producirse a partir de las 18 h de inoculación. Señalamos que los compuestos fenólicos constituyen sustratos típicos de las enzimas ligninolíticas, tanto del tipo oxidasas como algunas peroxidasa, por lo que la degradación y concomitante decoloración del mismo se vió favorecido por la riqueza en estos grupos químicos. La temprana aparición de cambios de color en el medio sugieren la relación de estos procesos con la excreción de lacasa, que como se ha reportado previamente, no requiere de condiciones limitantes de nutrientes y se excreta en esta especie de hongos de forma constitutiva, aunque sea en pequeñas cantidades [18, 21]. Los cambios de coloración como indicio de la degradación de este compuesto tóxico y la sugerencia de la relación con la excreción de la

Tabla 1. Tasa de crecimiento específica (día⁻¹) comparativa de las cepas de *P. ostreatus* en presencia de colorantes recalcitrantes.

Cepas	Control (APD)	Rojo fenol (0.1 %)	Bromofenol azul (0.1 %)
3022	9.4	3.3	14.8
3023	9.6	1.9	7.9
3024	6.8	3.1	13.5
3026	1.9	2.0	5.3
3028	5.9	3.1	10.9
3035	6.1	2.5	14.4

Los CV no exceden el 15 % para todos los valores reportados

lacasa, coincide con valoraciones realizada en otros trabajos donde se atribuye a esta enzima su participación en mecanismos de detoxificación de algunos hongos de pudrición blanca [18, 23].

Tabla 2. Crecimiento de *P. ostreatus* (cepas 3022 y 3024) en diferentes concentraciones de los efluentes vinaza (V) y extracto líquido de pulpa de café (ELP).

Cepa	Medio	%	(día ⁻¹)	S
3024	Control	-	6.309 ^b	0.949
		25	8.695 ^a	0.305
		50	6.284 ^b	0.335
	Vinaza	100	3.625 ^{cd}	0.707
		25	6.984 ^{ab}	1.910
		50	6.131 ^b	0.456
3022	ELP	100	5.390 ^b	0.154
		-	4.694 ^{bc}	0.582
		25	5.656 ^b	0.657
	Vinaza	50	5.118 ^{bc}	1.303
		100	2.171 ^d	0.947
		25	7.459 ^{ab}	0.478
ELP	50	7.267 ^{ab}	1.029	
	100	6.923 ^{ab}	0.723	

Los supraíndices corresponden a los indicadores de significancia de la prueba de comparación de intervalos múltiples de Duncan S: desviación estándar.

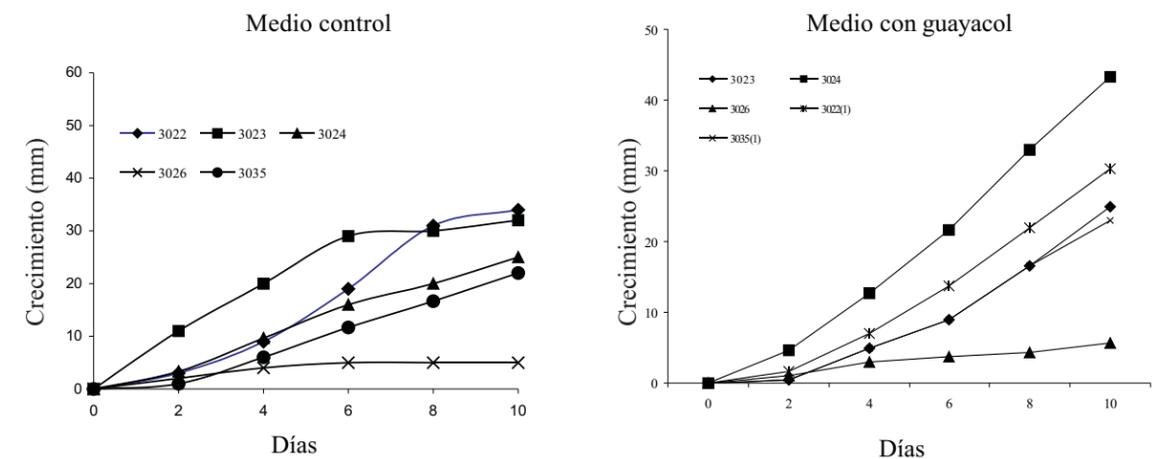


Figura 1. Crecimiento comparativo de las cepas de *P. ostreatus* en medio para detección de excreción de enzimas ligninolíticas.

En los cultivos suplementados con guayacol, la cepa de mayor crecimiento micelial fue la 3024 (Figura 1), además en esta cepa y las identificadas como 3022 y 3028 se observó un halo de color rojo, probablemente debido a la oxidación del guayacol, por la presencia de lacasas y algunas peroxidasa [16,18]. En estas tres cepas la aparición del color comenzó al cuarto día de incubación, sugiriendo la activación del mecanismo ligninolítico y la excreción de fenoloxidasas en fases tempranas del crecimiento.

Para determinar la capacidad de decoloración de *P. ostreatus* en medio líquido conteniendo los efluentes ELP y V se utilizaron las cepas 3022 y 3024. Para ambas cepas se observó que en el residual de ELP no existieron diferencias significativas (p<0.05) en la velocidad de crecimiento radial entre los tres niveles de concentración ensayados, ni de ellos con relación al control; incluso a la concentración de 25 % se hace ligeramente mayor con respecto al control, siendo más característico este comportamiento en la cepa 3022 (Tabla 2). En los cultivos con vinaza se observó un efecto inhibitorio en ambas cepas, el cual fue gradualmente incrementado a partir de los tratamientos con 50 % de efluente, llegando a ser estas

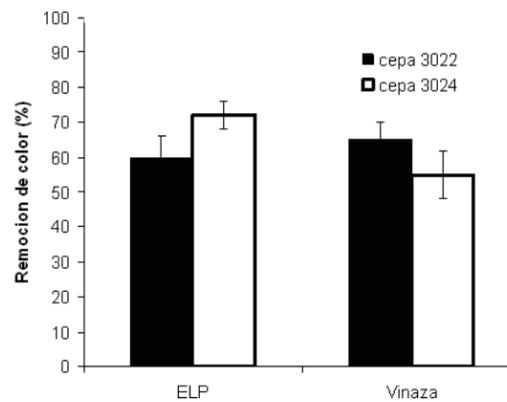


Figura 2. Color removido en los residuales coloreados tratados con las cepas seleccionadas 3022 y 3024.

diferencias significativas cuando se trabajó con concentración del 100 %, comparada con las restantes. Este comportamiento puede atribuirse al incremento en la vinaza de compuestos recalcitrantes e inhibidores que pueden estar interfiriendo en el crecimiento del micelio y que llegan a este residual procedente de las mieles finales. Entre ellos pueden mencionarse el furfural, derivados premelanoidinos de intensa coloración y fenoles como el ácido gálico y el vanilínico, los cuales están presentes en este efluente y son potenciales inhibidores de la actividad microbiana [7, 9]. En todos los tratamientos no se evidenció halo de decoloración en las placas crecidas con los efluentes bajo estudio, después de siete días de crecimiento.

Para los ensayos de decoloración en cultivos sumergidos, los resultados obtenidos en todos los tratamientos superaron el 50 % de remoción de color de los efluentes (Figura 2). Estos valores son similares a los obtenidos en investigaciones previas con otros residuales coloreados, utilizando cepas de *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete chrysosporium* [7, 12, 21]. Sin embargo, en este trabajo se emplearon mayores concentraciones de los residuales.

En conclusión, la presente investigación mostró la factibilidad de utilizar cepas de *P. ostreatus* en el tratamiento de efluentes industriales coloreados, pero será necesario optimizar las estrategias de selección que permitan tener cepas con alta capacidad de biodegradación. Este es un tema que se debe profundizar en futuros estudios, para lograr la diversificación del uso de este versátil hongo ligninolítico, en aras de la obtención de tecnologías más limpias.

Literatura citada

1. APHA, 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th ed. APHA, Washington, D. C.
2. Bello R., 1999. Anaerobic digestion of wastewater from pasteurization of coffee pulp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33: 357-359.
3. Bermúdez, R.C., J. Hoyos, S. Rodríguez, 2000. Evaluación de la disminución de la carga contaminante de la vinaza de destilería por tratamiento anaerobio. *Revista Interamericana de Contaminación Ambiental* 16(3): 23-27.
4. Coulibaly, L., G. Gourene, S. Agathos, 2003. Utilization of fungi for biotreatment of raw wastewaters: review. *African Journal of Biotechnology* 2: 620-630.
5. Feijoo, G., J.M. Lema, 1999. Tratamiento de efluentes de industrias de la madera con compuestos tóxicos y recalcitrantes mediante hongos ligninolíticos. *Revista AFINIDAD LIV*: 171-180.
6. Field, J., G. Lettinga, 1987. The effect of oxidative coloration on the methanogenic toxicity and anaerobic biodegradability of phenols. *Biological Wastes* 29: 161-179.
7. Fitzgibbon, F.J., P. Nigam, D. Singh, R. Marchant, 1995. Biological treatment of distillery waste for pollution-remediation. *Journal Basic of Microbiology* 35: 293-301.
8. González, T., M.C. Terrón, S. Yague, M. García, J.M. Carbajo, A. González, 2003. Aplicación de pruebas cualitativas al estudio de la capacidad de degradación de un hongo basidiomiceto. *Revista ICIDCA* 37: 50-57.
9. ICIDCA, 1986. La industria de los derivados de la caña de azúcar. Editorial Científico-Técnica. La Habana.
10. Ikehata, K., I. Buchanan, D. Smith, 2004. Recents developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. *Journal of Environmental Engineering and Science* 3: 1-19.
11. Jagroop, D., D. Singh, P. Nigam, 2001. Decolourisation of synthetic and spentwash melanoidins using the white-rot *Phanerochaete chrysosporium* JAG-40. *Bioresource Technology* 78: 95-98.
12. Kissi, M., M. Mountandar, O. Assobhel, E. Gargiulo, G. Palmieri, P. Giardina, G. Sannia, 2001. Roles of two white-rot basidiomycete fungi in decolorisation and detoxification of olive mill waste water. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57: 221-226.
13. Verma, I., 1976. Toxicity of distillery waste to *Puntius sophore* (Ham) and *Mystinvittatus* (Bloch) (*Piscu Cyprinidal Bagridal*). Part 3. Bioassay studies and TLM determination. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* 4: 547-550.
14. Sirianuntapiboon, S., K. Chairattanawan, S. Ohmomo, 1998. Removal of coloured substances from molasses waste water by biological treatment system combined with chemical treatment. *Japan*

Agricultural Research Quarterly 32: 1-30.

15. López, Z., J. Sánchez, R. Bello, 1991. Coffee wastes: quality of effluent water from de pasteurizing of coffee pulp. *In: Proceeding 16th International Scientific Colloquium on Coffee*. Kyoto. pp. 440-446.
16. Martínez, M.J., 1996. MnP isoenzymes produced by two *Pleurotus sp.* in liquid culture and during wheat- straw solid-state fermentation. *In: Galindo, E. (ed.) Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería*. UNAM. México, D.F.
17. Martínez-Carrera, D., 2000. Mushroom biotechnology in tropical America. *International Journal of Mushroom Science* 3: 9-20.
18. Mayer, A.M., R.C. Staples, 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60: 551-565.
19. Ollikka, P., K. Alhonnaki, V. M. Leppanen, T. Glumoff, T. Rajjola, I.

Suominen, 1993. Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Environmental Microbiology* 59: 4010-4016.

20. Ramírez-Martínez, J., M. N. Clifford, 2000. Coffee pulp polyphenols, an overview. *In: Sera, T., C.R. Soccol, A. Pandey, S. Roussos (eds.), Coffee Biotechnology and Quality*. Kluwer, Dordrecht. pp. 471-488.
21. Rodríguez, S., M. Fernández, R. C. Bermúdez, H. Morris, 2003. Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus sp.* *Revista Iberoamericana de Micología* 20: 164-168.
22. Sanchez, J., D. Royse, 2002. La Biología y el cultivo de *Pleurotus spp.* Editorial Limusa, México, D.F. pp. 27-47.
23. Thurston, C. F., 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140: 19-26.