

DECOLORACION DE PAPEL DE DIARIO CON CEPAS FUNGICAS DE AGARICALES

(Decoloration of newspaper with fungal strains of Agaricales)

Eduardo Valenzuela F., Oscar Martínez V.
& Hugo Yáñez S.

Instituto de Microbiología. Facultad de Ciencias,
Universidad Austral de Chile Casilla 167, Valdivia, Chile.

Palabras claves: Agaricales, decoloración, hongos, papel de diario, lignina.

Key word: Agaricales, decoloration, fungi, newspaper, lignin.

RESUMEN

Se determinó la capacidad de las cepas miceliales UACHMMm-302 de *Mycena metuloidifera*, UACHMPs-428 de *Pholiota spumosa* y la cepa control *Trametes versicolor* para crecer sobre agar extracto tinta (AET) con y sin suplemento de NaNO_3 o glucosa. Además de decolorar y usar las fracciones finas de un extracto líquido (FL) y biodegradar constituyentes de la fracción sólida (FS) ambas obtenidas desde papel de diario de desecho reciclado. A las FS luego de ser incubadas a 23 °C por 3 meses se les evaluó el área colonizada por los micelios y los porcentajes de celulosa y lignina según la norma TAPPI.

Por su parte Cada 7 días en alícuotas de 100 mL de la FL se determinó la decoloración leyendo la Abs en el rango de 340 a 580 nm, la degradación de los azúcares totales determinado por el método del ácido p-aminobenzoico, proteínas por el método de Buiet, nitratos y fósforo totales por el método modificado de Anderson & Ingram y el índice de crecimiento fúngico. La mayoría de las cepas colonizaron un 100% los AET, el menor porcentaje lo presentó UACHMPs-428 (76%) en AET con NaNO_3 .

Todas las cepas colonizaron un 100% la FS independiente de los tratamientos aplicados. La cepa fúngica UACHMPs-428 se perfiló como la mejor para degradar la lignina de la fracción sólida obtenida de papel de desecho y los azúcares, fósforo y proteínas totales de la fracción líquida obtenida del papel de desecho. Además presenta la mejor capacidad para decolorar la fracción líquida y un moderado índice de crecimiento.

ABSTRACT

The ability of the mycelial strains UACHMMm-302 of *Mycena metuloidifera*, UACHMPs-428 of *Pholiota spumosa* and the control strains *Trametes versicolor* was assessed to grow on agar ink extract (AIE) with and without supplement of NaNO_3 or glucose. Besides, to discolor and to use the fine fractions of a liquid extract (LF) and to biodegrade elements of the solid fraction (SF) both obtained from newspaper of recycled remainder. The SF, after being incubated at 23°C for 3 months, the area colonized by the mycelial was evaluated and the percentage of cellulose and lignin was determined according to TAPPI standard.

On the other hand, discolouration was determined every 7 days in 100ml aliquots of the LF by reading the Abs in the 340 to 580 nm range, degradation of total sugars was established by the p-aminobenzoic method, proteins by Buiet method while total nitrates and phosphorus by means of the modified Anderson & Ingram method together with the index of fungal growth. Most of strains colonized 100% of AIE., the smallest percentage was shown by UACHMPs-428 (76%) in AIE with NaNO_3 .

All strains colonized 100% the SF independent of the treatment applied. The fungal strain UACHMPs-428 was the best to degrade the lignin of the solid fraction obtained from the remainder paper and sugars and also phosphorus and total proteins of the liquid fraction obtained from the remainder paper. In addition, it shows the best ability to discolor the liquid fraction and a moderate index of growth.

INTRODUCCION

Solo a finales del siglo XVIII se generalizó en Europa y los Estados Unidos la producción a escala industrial de papel, apareciendo las primeras manifestaciones de contaminación provenientes de la elaboración de la celulosa y sus productos. En Chile, la industria del papel es relativamente nueva y la elaboración de celulosa data solo desde 1958.

Entre el sector papelerero y el medio ambiente se señalan aspectos positivos, como el uso alternativo de residuos agroindustriales (paja de trigo) y de papeles reciclados como materia prima para la elaboración de papel, además, muchos productos que ofrece hoy esta industria son reciclables o biodegradables. Entre los aspectos negativos están el alto consumo de energía, agua y una considerable descarga de residuos sólidos, líquidos y gaseosos provenientes de los diferentes tratamientos a que es sometida la materia prima (Vélez, 1990 en Ferguson 1994). Con el afán de disminuir la contaminación generada por los residuos que son evacuados a los ecosistemas terrestres y acuáticos, se ha planteado y recurrido como alternativa al aprovechamiento del papel de desecho y al uso de microorganismos para su degradación (Kirk *et al.*, 1993). El uso de papel de desecho reduce a lo menos en un 74% la contaminación atmosférica, un 36% del agua y un 64% de la energía usada en la producción de papel (Alid, 1984 en Ferguson 1994). No obstante y a pesar de los beneficios, los procesos industriales conducentes principalmente al destintado de este tipo de papeles, son muy complejos y requieren de múltiples etapas. Por esta razón se buscan nuevos procesos microbiológicos que sean más simples y sobre todo no contaminantes.

Entre los microorganismos que se han utilizado en algunas etapas de producción de papel y para tratar desechos resultante de la actividad papelerera, destacan algunos hongos, tales como: *Aspergillus sydowii*, *Chaetomium* spp., *Trichoderma* spp., y principalmente los **Aphylophorales** como *Trametes versicolor* y *Phanerochaete chrysosporium*, debido a su fácil obtención de sus cepas miceliales y buen crecimiento. Pero la utilización de estos hongos en lo que respecta a su uso en el biopulpaje y destintado, no son los adecuados, pues metabolizan principalmente la celulosa y muestran una pobre capacidad para degradar la tinta de los papeles de desecho. Para subsanar lo anterior se ha recurrido a la obtención de cepas mutantes principalmente de *T. versicolor* y *P. chrysosporium*, sin embargo, estas cepas presentan un crecimiento limitado (Pommier *et al.*, 1987) y las enzimas obtenidas son poco estables (Martínez, 1992). Los resultados de estos trabajos, han sentado las bases para buscar otros hongos que presenten cualidades

naturales para destintar el papel de desecho y presenten una baja o nula actividad celulolítica.

Un grupo de hongos poco explorado corresponden a los **Agaricales**, estos hongos son comunes en los bosques nativos del sur de Chile y varios de ellos desarrollan sus basidiocarpos en tocones, troncos y ramas de árboles muertos (Valenzuela, 1993; Lazo, 2001), y en los estudios realizados de sus respectivas cepas miceliales se ha determinado que son capaces de producir enzimas lignolíticas (Garnica, 1995; Valenzuela, 1997). Considerando los antecedentes presentados se ha planteado determinar la capacidad que poseen las cepas miceliales UACHMMn-302 y UACHMPs-428 obtenidas respectivamente desde basidiocarpos de *Mycena metuloidifera* Sing., y *Pholiota spumosa* (Fr.) Sing., para destintar y degradar fracciones finas de papel de diario de desecho.

MATERIALES Y METODOS

El trabajo experimental contempló la realización de tres ensayos distintos que se describen a continuación:

1. Primer ensayo: cultivo de cepas miceliales en agares extracto tinta (AET)

Con la tinta usada en la impresión off-set del papel se prepararon tres tipos de agares (AET) al 1.5%: el primer tipo de AET contenía solo tinta, al segundo además de tinta se le adicionó glucosa al 0.5% y al tercero además de tinta se le adicionó NaNO₃ al 0.5%. Los agares fueron esterilizados en un autoclave (110 °C, 0.5 at) por 20 min y luego repartidos en placas Petri de 9 cm de diám. Discos de 0.7 cm de diám de agar con micelio de la cepas miceliales a ensayar UACHMMm-302 de *Mycena metuloidifera* Sing.; UACHMPs-428 de *Pholiota spumosa* (Fr.) Sing.; y de la cepa control de *Trametes versicolor* (L.: Fr.) Pilát, adquirida del Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) de Baarn Holanda, fueron sembrados individualmente y por triplicado en las placas que contenían cada tipo de AET, las placas sembradas se incubaron a 23 °C por un mes. Al cabo de este tiempo se evaluó el diámetro alcanzado por las colonias en los distintos AET.

2. Segundo ensayo: degradación fúngica de los constituyentes del sustrato sólido obtenido de papel de desecho

Partidas de papel de diario de desecho reciclado (37.5 g) de las páginas de los avisos clasificados del diario el Mercurio se mezclaron con 1350 mL de agua destilada. La mezcla obtenida se molió en una licuadora hasta obtener un homogenizado que se separó por filtración a través de un filtro de gasa triple, obteniéndose así, un sustrato sólido (que se ocupó en el presente ensayo) y

un sustrato líquido (filtrado) que fue usado en el tercer ensayo. En cada matraz de 250 mL (30 en total) se depositaron 50 g de sustrato sólido, los matraces conteniendo el sustrato se dividieron en dos set. A cada una de los matraces del primer set (15 en total) se les agregó 0.5% de NaNO_3 y los del segundo set (15 en total) no sufrieron tratamiento. Luego ambos set de matraces se esterilizaron en autoclave (110 °C, 0.5 atm) por 20 min. Tras 24 horas de reposo fueron inoculados asépticamente y en forma individual con las cepas miceliales en estudio y control. La inoculación consistió en depositar cuatro discos de 1.5 cm² de agar con micelio de la cepa micelial correspondiente sobre y bajo el sustrato contenido en los matraces. Cada cepa micelial en estudio y control se inocularon por quintuplicado y por set. Los matraces inoculados se incubaron a 23°C por 3 meses, al cabo del cual se evaluó el área colonizada por los micelios y los porcentajes de celulosa y lignina ácido-soluble de los sustratos según las normas TAPPI (1988). Para determinar la celulosa y lignina ácido-soluble se depositó el contenido total de cada matraz y de cada set en forma individual en sacos de papel filtro de 12 x 8 cm, que posteriormente fueron sometidos a marchas analíticas. También fueron sometidas a marcha analítica muestras control negativo (10 en total), sacos de papel filtro conteniendo sustrato sólido sin inoculación fúngica, pero que fue triturado, filtrado y esterilizado.

3. Tercer ensayo: determinación de la decoloración de sustrato líquido y degradación de algunos constituyentes de la fracción líquida.

En cada matraz de 250 mL (140 en total) se depositaron 100 mL del sustrato líquido obtenido como se señaló en el punto 2 (que contiene tinta y fracciones finas de papel) y se separaron en dos set. A cada uno de los matraces del primer set (60 en total), se les agregó 0.5% de NaNO_3 , mientras que los matraces del segundo (60 en total) no sufrieron tratamiento. Los matraces de ambos set se esterilizaron en autoclave (110 °C, 0.5 atm) por 20 min., tras lo cual fueron inoculados en forma independiente con cada una de las cepas miceliales en estudio y control (20 matraces en total por cada cepa para cada set). La inoculación se hizo colocando en el contenido del matraz respectivo cuatro disco de 0.7 cm de diám. de agar con micelio de la cepa en estudio o control. Una vez inoculados los matraces se incubaron en un agitador termoregulado a 23 °C, 125 rpm por 24 hrs/día, por 21 días. Al día 0, 7, 14 y 21 de incubación se retiraron 5 matraces de la cepa fúngica respectiva y control por cada set y se realizaron evaluaciones mediante métodos espectrofotocolorimétricos para determinar la capacidad que poseían las cepas para decolorar el sustrato líquido. Los azúcares, proteínas, fósforo y nitratos totales del

sustrato líquido y determinar el crecimiento de las cepas. También fueron sometidas a evaluación muestras control negativo (20 matraces en total), conteniendo sustrato líquido esterilizado pero sin inoculación fúngica.

a) Decoloración del residuo líquido: la determinación de la capacidad que poseen las cepas para decolorar el residuo líquido, se realizó por triplicado tomando asépticamente de cada matraz 5 mL de líquido que se leyeron en el rango de longitud de onda de 340 a 580 nm en un espectrofotómetro Shimadzu uv Mini 1240, determinándose la absorbancia (Abs) del residuo líquido de acuerdo a cada longitud de onda leída y como blanco se uso agua destilada. Los resultados fueron graficados, obteniéndose así el espectro de absorción correspondiente.

b) Determinación de azúcares totales: se utilizó el método del ácido p-aminobenzoico. Para determinar la concentración de azúcares totales en las muestras, se procedió a extraer asépticamente de cada matraz 1 mL de muestra, que se depositaron independientemente en tubos, a cada tubo se le agregaron 2 mL de los reactivos ácido p-aminobenzoico - ácido acético glacial y ácido fósfórico - ácido acético glacial, luego los tubos se taparon y calentaron a 100 °C en un baño María, tras lo cual se determino la Abs a 360 nm en el espectrofotómetro.

c) Determinación de proteínas totales: la determinación de proteínas se realizó por el método de Buiet. Para determinar la concentración de proteínas en el residuo líquido se procedió a extraer por triplicado de cada set de matraces 1 mL de muestra, que se depositaron independientemente en cubetas y se le agregaron 4 mL de reactivo de Buiet, se dejó desarrollar el color por 30 min. Luego se leyó la Abs de cada muestra a 540 nm en el espectrofotómetro.

d) Determinación de nitratos: se determino por el método modificado de Anderson & Ingram. Para determinar la concentración de nitratos en el residuo líquido se procedió a extraer asépticamente por triplicado de cada set de matraces 0.25 mL de muestra, que se depositaron independientemente en tubos; a cada tubo se le agregaron 0.5 mL del reactivo ácido salicílico - ácido sulfúrico y tras esperar 30 min, se le agregaron 5 mL de hidróxido de sodio en agua destilada, se homogeneizaron las muestras y se esperó 1 hr hasta el total desarrollo del color. Se determinó la Abs a 410 nm en el espectrofotómetro.

e) Determinación de fósforo total: la determinación de fósforo total se realizó por el método modi-

ficado de Anderson & Ingram. Para determinar esta concentración en las muestras de cada set de matraces por triplicado, se extrajo 1 mL de muestra, que fueron tratadas en forma individual. Las muestras se depositaron en tubos y se les adicionaron 4 mL de ácido ascórbico en agua destilada más 3 mL del reactivo constituido por molibdato de amonio tetrahidratado, tartrato de sodio y potasio tetrahidratado, ácido sulfúrico y agua destilada; se mezclaron bien y se dejó desarrollar el color por 1 hr., al término de ese tiempo se determinó la Abs a 880 nm en el espectrofotómetro.

f) Determinación del índice de crecimiento:

para evaluar el crecimiento de las cepas en el sustrato líquido obtenido de papel se determinó la masa micelial (peso fresco y peso seco) esto se realizó al principio y final del ensayo. Para determinar el peso fresco y seco inicial (PFI y PSI), se extrajo de placas de cultivos que contenían las cepas miceliales en estudio masificadas, discos de 0.7 cm de diám de agar con micelio y se pesaron, obteniéndose el PFI. Una vez pesados los discos se secaron en una estufa a 60°C hasta peso constante y se volvieron a pesar, obteniéndose el PSI. A los PFI y PSI obtenidos se les restó el peso del agar. Tanto el PFI como el PSI se multiplicaron por cuatro, ya que cuatro discos de agar con micelio de cada cepa fueron sembrados individualmente en cada una de los matraces de cada set. Los PFI y PSI obtenidos se dividieron para obtener el índice de "masa celular inicial" (MCI). Al término del experimento (21 días), el sustrato líquido de cada botella se filtró a través de papel filtro quedando el micelio retenido en ellos, el conjunto papel más micelio se pesó obteniéndose el peso fresco final (PFF), tras restar el peso del papel filtro. A continuación los papeles filtros conteniendo los micelios se secaron a 60° C hasta peso constante, obteniéndose el peso seco final (PSF), tras restar el peso del papel filtro. Los valores obtenidos de PFF y PSF se dividieron para obtener el índice de "masa celular final" (MCF). Posteriormente el índice de MCF se dividió por el índice de MCI para obtener el "índice de crecimiento" (IC).

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla 1, se indican los porcentajes promedios del área colonizada por las cepas ensayadas UACHMMm-302, UACHMPs-428 y control de *T. versicolor* sobre agares extracto tinta (AET) a distintos períodos de incubación. En la Tabla 1, se observa que a los 7 días de incubación de los distintos agares sembrados con las cepas fúngicas en estudio y el control, el mayor porcentaje de área colonizada (100%) se registró con la cepa UACHMMm-302 cultivada en AET al 1.5 %

Tabla 1. Area colonizada por las cepas miceliales en agares extracto tinta (AET).

Cepa micelial	Tratamiento	Area colonizada (%)		
		7 ds	14 ds	21 ds
<i>Trametes versicolor</i>	AET al 1.5%	91	100	100
UACHMMm-302	AET al 1.5%	100	100	100
UACHMPs-428	AET al 1.5%	53	87	100
<i>T. versicolor</i>	AET + NaNO ₃ 0.5%	73	100	100
UACHMMm-302	AET + NaNO ₃ 0.5%	69	81	93
UACHMPs-428	AET + NaNO ₃ 0.5%	31	53	76
<i>T. versicolor</i>	AET + D-glucosa 0.5%	81	100	100
UACHMMm-302	AET + D-glucosa 0.5%	76	100	100
UACHMPs-428	AET + D-glucosa 0.5%	58	100	100

y el menor porcentaje de área colonizada (31%) se determinó con la cepa UACHMPs-428 al cultivarla en AET suplementado con NaNO₃. También se observa que a los 21 días la mayoría de las cepas miceliales registraron un 100% de colonización en los distintos agares, solo presentan porcentajes inferiores al 100% las cepas UACHMMm-302 (93%) y UACHMPs-428 (76%) cultivadas en AET suplementado con NaNO₃ al 0.5%. De acuerdo a estos resultados la fuente de carbono adicionada al AET al parecer no tendría mayor incidencia en la capacidad colonizadora, pero si la fuente de nitrógeno, pues las cepas UACHMMm-302 y UACHMPs-428 mostraron una menor colonización del sustrato. Efectos semejantes han sido descritos por Mikes *et al.* (1994), en el hongo *Pleurotus ostreatus*, señalando que las fuentes de nitrógeno como la urea, amonio, nitratos y algunos aminoácidos tienen un efecto represor o derepresor de enzimas como la glutamato sintetasa, glutamina sintetasa, NAD-glutamato deshidrogenasa o sobre algunas permeasas para ciertos aminoácidos, lo que a la postre incide en la síntesis de proteínas por parte del hongo, repercutiendo en su crecimiento. Por su parte Saddler (1993), indica que al agregar una fuente extra de nitrógeno a un sustrato ligno-celulósico o de otra naturaleza, esta puede incidir en la hidrólisis o conversión de ciertos constituyentes del sustrato, los cuales a lo largo del tiempo incrementan en concentración y se hacen tóxicos o actúan como inhibidores enzimáticos, impidiendo la hidrólisis de otros constituyentes más complejos del sustrato, que pudieran ser utilizados para el crecimiento de los microorganismos como fuente de carbono y energía.

En la Tabla 2, se indican el porcentaje del área colonizada por las cepas fúngicas en estudio y la cepa control sobre el sustrato sólido, obtenido de papel de

diario de desecho sin y con adición de NaNO_3 . También se muestran los porcentajes de celulosa y lignina del sustrato sólido obtenido de papel de diario de desecho luego de los tres meses de haber sido tratado con las cepas fúngicas.

En la Tabla 2, se observa que independiente del tratamiento a que fue sometido el sustrato sólido y de la cepa fúngica ensayada, al cabo de los 3 meses en todos se determino un 100% de colonización. En lo que respecta al porcentaje de celulosa, al comparar el sustrato sólido control (75.5% de celulosa) versus el sustrato sólido sin adición de NaNO_3 , se determino que en el sólido tratado con la cepa *T. versicolor* hubo una disminución significativa de la celulosa de 74.5% a 64.1%. Al realizar la misma comparación pero versus el sólido adicionado de

Tabla 2. Area de colonización y biodegradación fúngica de celulosa y lignina del sustrato sólido obtenido de papel de diario de desecho.

Control y cepa micelial	Tratamiento	Area (%)	Celulosa (%)	Lignina (%)
Control	Sustrato sólido sin tratar	—	75.4	22.4
<i>T. versicolor</i>	Sustrato sólido sin NaNO_3	100	64.1	22.3
UACHMMm-302	Sustrato sólido sin NaNO_3	100	75.0	20.7
UACHMPs-428	Sustrato sólido sin NaNO_3	100	74.4	18.5
<i>T. versicolor</i>	Sustrato sólido con NaNO_3	100	66.5	22.4
UACHMMm-302	Sustrato sólido con NaNO_3	100	63.7	24.0
UACHMPs-428	Sustrato sólido con NaNO_3	100	74.0	19.8

NaNO_3 , se determinó una disminución significativa de la celulosa en el sólido tratado con la cepa *T. versicolor* (de 74.5% a 66.5%) y en el tratado con la cepa UACHMMm-302 (de 74.5% a 63.7%). Referente al porcentaje de lignina, la mayor disminución de este constituyente se determino en el sustrato sólido sin NaNO_3 tratado con la cepa UACHMPs-428 (18.5%).

Según Breen & Singleton (1999); Buswell et al., (1991) y Somasundaram et al. (1992), una característica relevante de los microorganismos empleados en los procesos biológicos de la fabricación del papel (donde se usa pasta o papel de desecho reciclado), es que degradan principalmente la lignina y en menor proporción la celulosa del sustrato usado. Los hongos más utilizados en estudios o programas pilotos de biopulpaje, tratamiento de aguas residuales, efluentes de papeleras y blanqueo de pulpa o pasta para fabricación de papeles son *T. versicolor*, *P. chrysosporium* y *Pleurotus* spp., (Behrendt Blanchette., 1997; Brumer et al., 1999; Chandra et al., 1999; Imori et al., 1998; Martínez et al., 1996). De las cepas ensaya-

das, satisfacen lo indicado por los autores antes citados la UACHMPs-428 cultivada en el sustrato con y sin adición de NaNO_3 y la cepa UACHMMm-302 cultivada en el sustrato sin adición NaNO_3 pues los porcentajes de lignina del sustrato empleado para su cultivo disminuyeron en comparación con el control. Esto se debería a que las cepas utilizarían para su crecimiento primero las azúcares simples y nutrientes solubles del sustrato y luego como fuente alternativa la lignina. En estudios semejantes Boominathan et al. (1992), tras cultivar hongos de pudrición blanca como *Pleurotus pulmonarius* y *P. chrysosporium*, determinaron que la concentración de celulosa no fue afectada pero si las concentraciones de lignina y hemicelulosa en los residuos lignocelulosicos empleados (pasta de papel, paja de trigo y papel de desecho). Por el contrario, en el presente estudio la cepa control (cultivada en el sustrato sin adición de NaNO_3) y la cepa UACHMMm-302 (cultivada en el sustrato con adición de NaNO_3) mostraron una tendencia a disminuir los porcentajes de celulosa y una mantención o incremento en la proporción de lignina respectivamente. Lo anterior indicaría que estas cepas utilizarían para su crecimiento en un comienzo las azúcares simples y otros nutrientes solubles del sustrato, al igual como la cepa UACHMPs-428, pero al agregar una fuente extra de nitrógeno como señala Saddler (1993), esta podría actuar como represor o inhibidor de las enzimas relacionadas con la degradación de la lignina. Además Kaal et al. (1995), indican que tras cultivar en un medio de cultivo limitante en nitrógeno hongos de pudrición blanca (*P. chrysosporium* y *Bjerkandera* spp.) se produjo una detectable actividad de la enzima ligninaperoxidasa (LiP) en los medios inoculados con estos hongos. Al agregar al medio de cultivo peptona como fuente de nitrógeno se reprimió o aumentó la actividad de la enzima LiP, lo cual dependió básicamente del pH del medio de cultivo. En cepas de *Lentinula edodes* y *Pleurotus ostreatus*, la actividad de las enzimas lignolíticas fue estimulada al suplementar el medio de cultivo con $\text{NH}_4\text{-N}$, siempre que el pH fuera 7.3. Los autores antes citados concluyen que varios hongos de pudrición blanca producen una alta actividad de las enzimas lignolíticas de acuerdo a la fuente de nitrógeno utilizada y el pH del medio de cultivo.

En las Figuras 1 a la 4 se muestran los gráficos de decoloración del sustrato líquido de papel sin y con adición de NaNO_3 e inoculado independientemente con la cepa UACHMPs-428 y la cepa control (*T. versicolor*), tras ser leído entre el rango de longitud de onda 340-580 nm. Sólo se presentan los gráficos de la cepa UACHMPs-428, pues fue la que registró una mayor decoloración del sustrato.

En primer lugar hay que indicar que independien-

Tabla 3. Azúcares, fósforo, nitratos y proteínas totales determinados en el sustrato líquido obtenido de papel de diario de desecho e índice de crecimiento de las cepas fúngicas ensayadas

CEPAS	Azúcares total (µg/mL)		Fósforo total (µg/mL)		Nitrato total (µg/mL)		Proteínas (mg/mL)		I.C
	0 día	21 días	0 día	21 días	0 día	21 días	0 día	21 días	
<i>Trametes versicolor</i> *	29.2	31.0	1.30	0.78	8.2	7.38	1.6	0.78	2.53
UACHMMm-302 *	29.2	29.2	1.30	1.07	8.2	7.05	1.6	1.07	1.01
UACHMPs-428 *	29.2	25.1	1.30	0.19	8.2	4.26	1.6	0.19	1.61
<i>Trametes versicolor</i> **	29.2	28.3	1.30	0.40	19.220	10.808	1.6	0.9	1.64
UACHMMm-302 **	29.2	29.2	1.30	0.14	19.220	16.870	1.6	1.01	1.24
UACHMPs-428 **	29.2	21.0	1.30	0.00	19.220	16.682	1.6	0.27	1.08

* = Sustrato líquido sin NaNO₃ e inoculado con la cepa fúngica respectiva. ** = Sustrato líquido adicionado de NaNO₃ al 0.5% e inoculado con la cepa fúngica respectiva. I C = índice de crecimiento de las cepas fúngicas.

te del tratamiento a que fue sometido el sustrato líquido, la cepa micelial ensayada y la longitud de onda leída, a partir del séptimo día se determinó un decremento de la Abs. Al comparar las variaciones de la Abs del sustrato líquido sin adición de NaNO₃ e inoculado con la cepa control (Fig. 1), con el sustrato tratado con las cepas fúngicas en ensayo se determinó que, independiente a la longitud de onda utilizada y el tiempo de lectura (días) las menores variaciones de la Abs se registraron en el sustrato inoculado con la cepa UACHMMm-302 (gráfico no mostrado) y el mayor decremento de la Abs se determinó en el sustrato inoculado con la cepa y UACHMPs-428 (Fig. 2). En lo que respecta a la decoloración del sustrato líquido adicionado con NaNO₃, se determinó que independiente de la longitud de onda utilizada para la lectura y el tiempo (días) el menor y mayor decremento de la Abs, se determinó en el sustrato inoculado con la cepa la cepa control (*T. versicolor*) y la cepa UACHMPs-428 respectivamente (Fig. 3 y 4). Por último, si se comparan los gráficos de decoloración del sustrato líquido con y sin adición de NaNO₃ al término del ensayo (21 días), leídos por ejemplo a una longitud de onda de 340 nm, se observa que en el sustrato adicionado con NaNO₃ e inoculado con la cepa UACHMPs-428 (Fig. 4), se registró el mayor decremento de Abs (0.284 nm), por su parte el menor decremento de ésta se registró en el sustrato sin adición de NaNO₃ e inoculado con la cepa UACHMMm-302 (gráfico no mostrado) con un valor de 0.760 nm.

En la Tabla 3, se muestran los promedios de las mediciones de los azúcares, fósforo, nitratos y proteínas totales del sustrato líquido sometido a los diversos tratamientos. Además, se señala el índice de crecimiento (IC) de las cepas fúngicas ensayadas. Se observa además que a los 21 días de incubación, las menores concentraciones de azúcares totales se determinaron en el sustrato líquido no adicionado (25.1 µg/mL) y adicionado (21.0

µg/mL) con NaNO₃ al 0.5% y que fueron tratados con la cepa UACHMPs-428. En lo que respecta a la concentración de fósforo total, se determinó que independiente del tratamiento a que fue sometido el sustrato líquido y la cepa fúngica ensayada, el fósforo total disminuyó y nue-

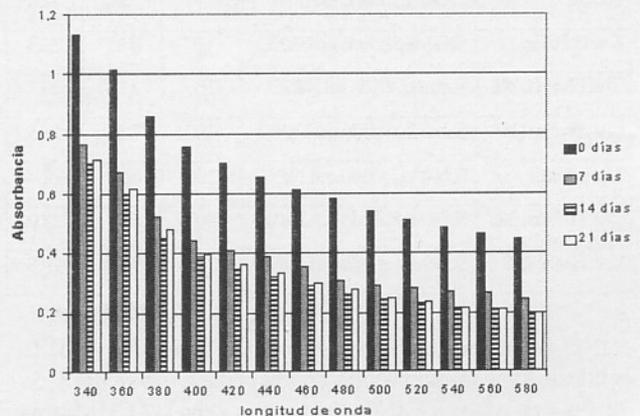


Figura 1. Decoloración de sustrato líquido sin NaNO₃ e inoculada con la cepa *T.versicolor*.

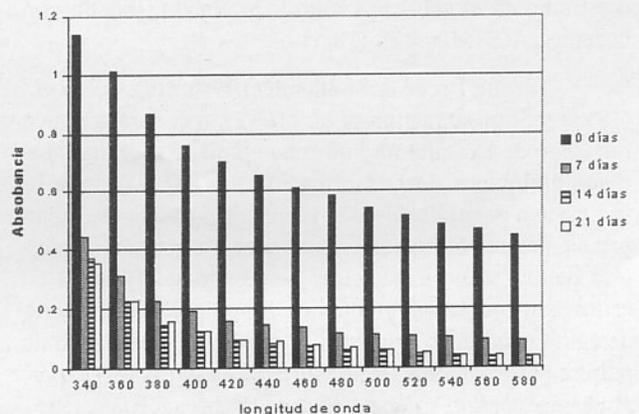


Figura 2. Decoloración de sustrato líquido sin NaNO₃ e inoculada con la cepa UACHMPs-428.

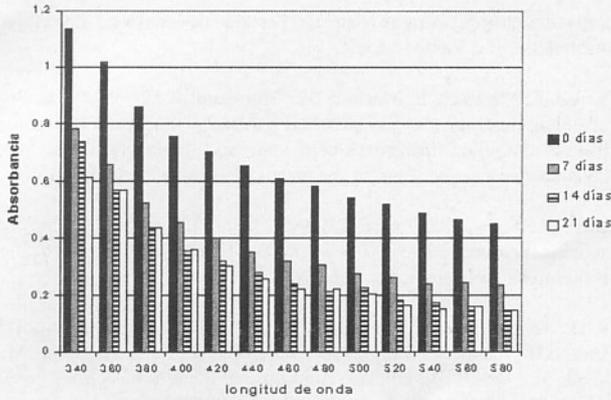


Figura 3. Decoloración de sustrato líquido con NaNO_3 e inoculada con *T. versicolor*.

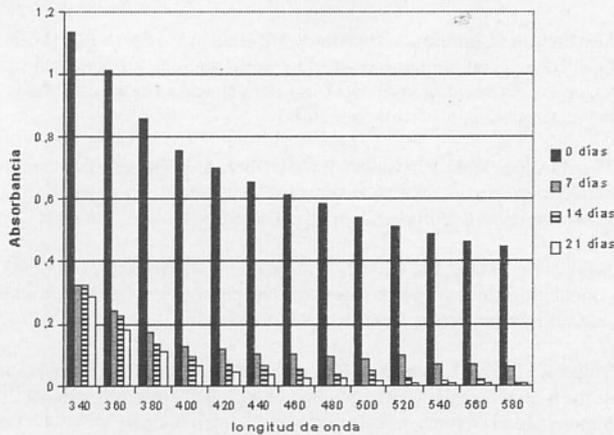


Figura 4. Decoloración de sustrato líquido con NaNO_3 e inoculada con UACHMPs-428

vamente en los sustratos líquidos tratados con la cepa UACHMPs-428 se registraron las menores concentraciones de fósforo total. Referente a la concentración de nitratos totales, independiente del tratamiento a que fue sometido el sustrato líquido y la cepa fúngica ensayada, los nitratos totales disminuyeron, determinándose la mayor disminución de 8.2 a 4.26 $\mu\text{g/mL}$ en el sustrato líquido sin adición de NaNO_3 e inoculado con la cepa UACHMPs-428. Con respecto a las proteínas totales, se determinó que independiente del tratamiento a que fue sometido el sustrato líquido y la cepa fúngica ensayada la concentración de proteínas disminuyeron, la menor concentración de proteínas (0.19 mg/mL) se determinó en el líquido sin adición de NaNO_3 e inoculado con la cepa UACHMPs-428. Por último, el mayor índice de crecimiento (2.53) lo registro la cepa control *T. versicolor* cultivada en el sustrato líquido sin adición de NaNO_3 .

En estudios semejantes Millar *et al.* (1994), han utilizado los hongos *T. versicolor* y *P. chrysosporium* para decolorar y biodegradar residuos orgánicos de alto y bajo peso molecular (HMW) de los efluentes generados de la fabricación de papel, señalando que hubo una reducción

del color del efluente, degradación de HMW y de compuestos alogenados tras el tratamiento con los hongos señalados. Por su parte, Garg *et al.* (1999), han estudiado la capacidad de *T. versicolor* para degradar los constituyentes de efluentes generados en el pulpaje Kraft, indicando que *T. versicolor* fue capaz de remover sobre el 50% del azúcar presente en el efluente, también detectaron una alta concentración de la enzima lacasa implicada en la degradación de lignina, pero lo más importante fue que el hongo presentó una alta capacidad para polimerizar lignosulfonatos, lo que indicaría que esta cepa degradaría lignina, pero al mismo tiempo podría ir repolimerizándola, por lo tanto la concentración de lignina en el efluente se mantendría constante o podrían aumentar. Garg *et al.* (1999), señalan que en la decoloración de efluentes tratados con *T. versicolor*, se logran mejores resultados cuando el efluente es suplementados con una fuente de carbono y nitrógeno a la vez. Así una máxima decoloración (34%) fue observada al tercer día en efluentes suplementados con 1% (w/v) glucosa y 0.2% (w/v) de urea, sin embargo, una menor reducción del color (24%) fue observada en el efluente suplementado sólo con glucosa al 1.5% (w/v). Además Cummings & Stewart (1994), señalan que la capacidad de los microorganismos para biodegradar los constituyentes de papel periódico se ve mermada por: (1) moléculas de alto peso molecular como la lignina que actúa como capa protectora de otras moléculas carbonadas impidiendo la acción enzimática, (2) la tinta usada en la impresión del papel también reduce la tasa de solubilización de la celulosa y otros azúcares, aunque la tinta no es directamente tóxica para los microorganismos, su mecanismo de acción es cubrir las fibras de celulosa y prevenir la adhesión de los microorganismos o sus enzimas al sustrato, (3) la temperatura debe ser la óptima para el desarrollo de los microorganismo empleados y para que sus enzimas actúen.

Por último, en el presente trabajo el tercer ensayo fue complementado mediante la determinación del índice de crecimiento (IC) de las cepas cultivadas en el sustrato líquido. Como se ha indicado en párrafos anteriores las fuentes de nitrógeno y carbono pueden tener un efecto positivo o negativo en el desarrollo de los hongos, pues a veces suplen la carencia de nitrógeno del medio de cultivo o los requerimientos por parte de los microorganismos, aspecto que podría haber acaecido con la cepa UACHMn-302. Otras veces las fuentes nitrogenadas suplementarias pueden unirse a constituyentes del medio de cultivo e impedir la acción de algunas enzimas o facilitar la degradación de algún constituyente del medio cuyos productos son tóxicos para algunos microorganismos, estas podrían ser las razones por las cuales la cepa UACHMPs-428 y control, al ser cultivadas en el sustrato líquido adicionado de NaNO_3 dismi-

nuyeron su índice de crecimiento.

CONCLUSIONES

La cepa fúngica UACHMPs-428 obtenida desde *Pholiota spumosa*, se perfiló como la mejor, tanto para degradar la lignina de la fracción sólida obtenida de papel de desecho y los azúcares, fósforo y proteínas totales de la fracción líquida obtenida del papel de desecho. Además presenta la mejor capacidad para decolorar la fracción líquida y un moderado índice de crecimiento. Los resultados también muestran que los mejores tratamientos de la fracción sólida y líquida se obtuvieron en los tratamientos sin la adición de una fuente de nitrógeno, como el NaNO_3 , empleado en algunos ensayos de la presente investigación.

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección de Investigación y Desarrollo (DID) de la Universidad Austral de Chile y a la Red Iberoamericana sobre Diversidad, Ecología y uso de los hongos Microscópicos (XII. J CYTED-REDEMIC).

REFERENCIAS

- Behrendt, C. & Blanchette, R.** (1997). Biological processing of pine logs for pulp and paper production with *Phlebiopsis gigantea*. Applied and Environmental Microbiology 63: 1995-2000
- Boominathan, K.; Reddy, C.; Adinarayana, R.; Arora, D.; Elander, R.; Mukerji, K.** (1992). Fungal degradation of lignin: biotechnological applications. Handbook-of applied mycology, volumen 4: Fungal biotechnology. 763-822; 235. Ed. Marcel Dekker, Inc.; New York; USA.
- Breen, A. & Singleton, F.** (1999). Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping. Current Opinion in Biotechnology 10: 252-258
- Brumer, H I.; Sims, P. & Sinnott, M.** (1999). Lignocellulose degradation by *Phanerochaete chrysosporium*: purification and characterization of the main alpha-galactosidase. Biochemical Journal London 339: 43-53
- Buswell, J.; Arora, D.; Bharat, R.; Mukerji, K.; Knudsen, G.** (1991). Fungal degradation of lignin. Handbook of applied mycology, vol. 1, Soils and Plants. Ed. Marcel Dekker Inc.; New York; USA, pp. 425-480
- Cummings, S. & Stewart, C.** (1994). Newspaper as a substrate for cellulolytic landfill bacteria. Journal of Applied Bacteriology. 76: 196-202
- Ferguson, L.** (1994). 2° Seminario de papel reciclado 11 -12 de agosto Hotel Hyatt, Santiago, Chile.
- Garg, S.; Harish, C.; Modi, D.; Chandra, H.** (1999). Effect of glucose and urea supplements on decolorization of bagasse and gunny bag-based pulp paper mill effluent by *Trametes versicolor*. Indian Journal of Experimental Biology 37:302-304
- Garnica, S.** (1995). Caracterización morfológica y bioquímica de micelios obtenidos en cultivo puro de basidiocarpos de Agaricales *sensu lato* lignocelulolíticos. Tesis de Magister, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Iimori, T.; Miyawaki, S.; Machida, M.; Murakami, K.** (1998). Biobleaching of unbleached and oxygen-bleached hardwood kraft pulp by culture filtrate containing manganese peroxidase and lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Journal of Wood Science 44:451-456
- Kaal, E.; Field, J. & Joyce, T.** (1995). Increasing ligninolytic enzyme activities in several white-rot basidiomycetes by nitrogen-sufficient media. Bioresource Technology. 53: 133-139
- Kirk, T.; Koning, J.; Burgess, R.; Blanchette, A.A.; Cameron, D.; Cullen, D.; Kersten, P.; Lightfoot, N.; Myers, G.; Sachs, I.; Sykes, M.; Wall, M.** (1993). Biopulping. A glimpse of the future?. USDA Forest Service, Forest Products Laboratory, Madison, USA.
- Lazo, W.** (2001). Hongos de Chile. Atlas Micológico. Salesianos S. A.
- Martínez, A.; González, A.; Martínez, M.; Guillen, F.; Barrasa, J.** (1992). Biotecnología en la industria papelera: utilización de los hongos y sus enzimas en la fabricación de papel y en el tratamiento de efluentes. Revista Iberoamericana de Micología 9:76-80
- Martínez, M.; Ruiz, F.; Guillen, F.; Martínez, A.** (1996). Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. European Journal of Biochemistry 237: 424-432
- Mikes, V.; Zofall, M.; Chytil, M.; Fulnecek, J.; Schanel, L.** (1994). Ammonia-assimilating enzymes in the basidiomycete fungus *Pleurotus ostreatus*. Microbiology Reading 4:977-982
- Millar, K.; Carey, J.; Burnison, B.; Lee, H.; Trevors, J.** (1994). Degradation of the high molecular weight fraction of bleached kraft mill effluent by biological and photochemical processes. 2^{do} International Conference on Environmental Fate and Effects of Bleached Pulp Mill Effluents, Vancouver, British Columbia (Canada), 6-10 Nov.
- Pommier, J.; Fuentes, J. & Goma, G.** (1987). Using enzymes to improve the process and the product quality in the recycled paper industry. TAPPI Journal 72: 187-191.
- Saddler, J.** (1993). Bioconversion of forest and agricultural plant residues. Ed. C.A.B International.
- Somasundaram, R.; Shashireka, M.; Bano, Z.; Rajarathnam, S.** (1992). Biopotentialities of the Basidiomacromycetes. Advances in Applied Microbiology 37: 233-361
- TAPPI.** Test methods tecnology. Park, Atlanta, USA. Vol. I.
- Valenzuela, E.** (1993). Estudio sistemático, corológico y ecológico de los Agaricales *sensu lato* de los bosques autóctonos de la Región de los Lagos en Chile. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad de Alcalá de Henares, España.
- Valenzuela, E.; Ramírez, C. & Garnica, S.** (1997). Macro-microscopic and qualitative enzymatic characterization of mycelial strains obtained from basidiocarps of *Mycena* species (Agaricales) in Chile. Revista Chilena de Historia Natural 70: 521-530.