



Remoción del colorante trifenilmetano cristal violeta empleando hongos de la podredumbre blanca en cultivos líquidos y sólidos

Juliana Guzmán Pizano
Yuliana Gaviria Bedoya

Trabajo de grado presentado para optar al título de Microbiólogo Industrial y Ambiental

Asesora
Lida Marín Arias, Doctor (PhD) en Microbiología Ambiental y Biotecnología

Universidad de Antioquia
Escuela de Microbiología
Microbiología Industrial y Ambiental
Medellín, Antioquia, Colombia
2023

Cita	Guzmán Pizano y Gaviria Bedoya (1)
Referencia Estilo Vancouver/ICMJE (2018)	(1) Guzmán Pizano J y Gaviria Bedoya Y. Remoción del colorante trifenilmetano cristal violeta empleando hongos de la podredumbre blanca en cultivos líquidos y sólidos (2023) [Trabajo de grado profesional]. Medellín, Colombia. Universidad de Antioquia; 2023.



Biblioteca Carlos Gaviria Díaz

Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

RESUMEN

La implementación de metodologías biotecnológicas para la remoción de colorantes sintéticos, como el cristal violeta, son fundamentales como mecanismos para disminuir los riesgos biológicos y ambientales generados por la descarga y disposición de estos compuestos. Los hongos de la podredumbre blanca poseen la capacidad para remover colorantes sintéticos, mediante la producción de enzimas extracelulares que actúan degradando o transformando la molécula de colorante, configurándose así en una alternativa frente a los métodos físicos y químicos, utilizados frecuentemente en la remoción de colorantes. En el presente trabajo se evaluó la remoción de diferentes concentraciones (20ppm, 40ppm y 60ppm) del colorante cristal violeta, empleando los hongos de la podredumbre blanca *Pycnoporus* sp., *Trametes* sp. y *Lentinus* sp., en medios sólidos y líquidos. De los tres géneros de hongos evaluados, *Pycnoporus* sp. presentó la mayor eficiencia alcanzando porcentajes de remoción del 93% en medio sólido y 94% en medio líquido con una concentración de colorante de 60ppm. Adicionalmente, se evaluó la actividad de las enzimas Lacasa y Manganese peroxidasa durante el proceso de decoloración, encontrándose una alta concentración de la enzima Lacasa en los tratamientos con colorante e inoculados con *Pycnoporus* sp., y una alta concentración de la enzima Manganese peroxidasa en los tratamientos con colorante e inoculados con *Trametes* sp.

PALABRAS CLAVES: *Biorremediación, colorantes, cristal violeta, hongos de la podredumbre blanca, Lacasa, Manganese peroxidasa.*

ABSTRACT

The implementation of biotechnological methodologies for the removal of synthetic dyes, such as crystal violet, are fundamental as mechanisms to reduce the biological and environmental risks generated by the discharge of such compounds into water bodies. White rot fungi have the ability to remove synthetic dyes by producing extracellular enzymes that degrade or transform the dye molecule, which is an alternative to the physical and chemical methods frequently used for dye removal. In this work, the removal of different concentrations (20ppm, 40ppm and 60ppm) of the crystal violet dye was evaluated using the white rot fungi *Pycnoporus* sp., *Trametes* sp. and *Lentinus* sp. in solid and liquid media. Of the three genera of fungi evaluated, *Pycnoporus* sp. presented a higher efficiency, reaching removal

percentages of 93% at 60ppm in solid medium and 94% in liquid medium. Additionally, the activity of Lacase and Manganese peroxidase enzymes was evaluated during the decolorization process, finding a high concentration of Lacase in the dye treatments inoculated with *Pycnoporus* sp. and a high concentration of the enzyme Manganese peroxidase in the dye treatments inoculated with *Trametes* sp.

KEY WORDS: *Bioremediation, crystal violet, dyes, laccase, manganese peroxidase, white rot fungi.*

1. INTRODUCCIÓN

Los colorantes sintéticos constituyen un insumo de gran importancia para la producción a nivel industrial de textiles y productos alimenticios, principalmente. Los datos reportados en la literatura indican que a nivel mundial la descarga de colorantes sintéticos en los cuerpos de agua alcanza unas 8000 toneladas al año (Nworie et al., 2019), representando así un riesgo biológico y ambiental debido a su estructura química, que les confiere un alto grado de estabilidad y persistencia (Kumar et al., 2016; Jin et al., 2007). Un ejemplo de ello es el colorante cristal violeta el cual es frecuentemente utilizado en laboratorios clínicos y analíticos para la tinción de membranas y tejidos celulares, también se encuentra en compuestos dermatológicos y medicamentos veterinarios, es utilizado como aditivo para alimentación de aves de corral y es empleado como colorante de tejidos en la industria textil (Li et al., 2017). El cristal violeta (Tris(4-(dimethylamino)phenyl) methylum chloride) es un colorante monomérico, catiónico e hidrosoluble con grupos arilo terminales (Figura 1) (Morales et al., 2018); su compleja estructura favorece su permanencia en el ambiente por largos periodos de tiempo, llegando a ser tóxico para los organismos que hacen parte de los ecosistemas acuáticos, interfiere con el paso de la luz y afecta la actividad de los organismos fotosintéticos, alterando así las condiciones normales del ecosistema acuático y de la microbiota presente (Pan Y., et al., 2017; Ajaz et al., 2020).

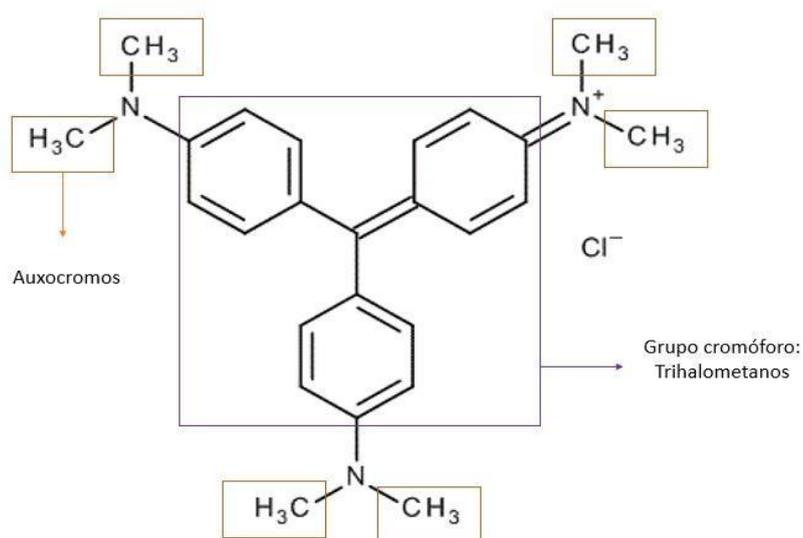


Figura 1. Modificado de Morales et al., 2018

Los tratamientos frecuentemente utilizados en la remoción de colorantes se basan en el empleo de métodos físicos y químicos, que en la mayoría de los casos producen

principalmente compuestos aromáticos, aminas libres, y otros compuestos intermediarios resultantes del proceso de transformación de la sustancia colorante (Mani y Bharagava, 2016). Como alternativa a estas metodologías se ha probado también la utilización de las capacidades metabólicas que tienen algunos microorganismos para transformar o degradar diferentes moléculas químicas, como los colorantes; siendo los hongos de la podredumbre blanca los más utilizados en este caso, debido a que presentan una gran flexibilidad metabólica, tienen la capacidad para colonizar grandes superficies, son tolerantes a los cambios fisicoquímicos y degradan compuestos orgánicos e inorgánicos complejos mediante la producción de enzimas extracelulares: Lacasa, Manganese Peroxidasa y Lignina Peroxidasa (López y Fernández, 2019).

En este trabajo se evaluó la remoción del colorante cristal violeta a diferentes concentraciones empleando tres cepas de hongos de la podredumbre blanca *Trametes* sp., *Lentinus* sp. y *Pycnoporus* sp., en medios líquidos y sólidos. Adicionalmente, en el medio líquido se evaluó el efecto que tiene la presencia de una matriz de soporte para el crecimiento de la biomasa fúngica, sobre la remoción del colorante; y se determinó la actividad de las enzimas extracelulares Lacasa y Manganese peroxidasa en presencia y ausencia del colorante cristal violeta.

2. METODOLOGÍA

2.1 Selección de microorganismos

Las cepas de hongos empleadas provienen de la colección de cepas del grupo Bioprocesos Microbianos (BioMicro) de la Escuela de Microbiología de la Universidad de Antioquia. Las cepas de hongos se reactivaron en agar extracto de malta y se incubaron a 28°C por 8 días.

2.2 Preparación de las concentraciones de trabajo del colorante

Se empleó el colorante cristal violeta grado analítico de la marca MERCK®, a partir del cual se preparó una solución de trabajo a una concentración de 1000ppm. La determinación de la desaparición del colorante se realizó empleando medidas de absorbancia en un espectrofotómetro (longitud de onda 590nm), para lo cual se tuvo en cuenta el límite de cuantificación del colorante y la realización de una curva de calibración para hallar la concentración del colorante, aplicando la ecuación de la recta. A partir de la solución de trabajo (1000ppm) se adicionó a los medios de cultivo la cantidad de colorante necesaria para obtener las concentraciones de 20ppm, 40ppm y 60ppm, en cada uno de los tratamientos.

2.3 Remoción de colorante en medio sólido

La capacidad de remoción del colorante en medio sólido se evaluó empleando agar extracto de malta adicionando el colorante hasta obtener las concentraciones 20, 40 y 60ppm. Los medios con el colorante se inocularon con cada una de las cepas de hongos (*Trametes* sp., *Pycnoporus* sp. y *Lentinus* sp.), tomando un disco de micelio de 5mm de diámetro que se colocó en el centro de la caja de petri. Los controles empleados incluyeron agar extracto de malta con colorante sin inocular, y agar extracto de malta inoculado sin colorante. Se realizaron 4 repeticiones por cada experimento. Los cultivos se incubaron a 28°C durante 3 semanas. Al final de cada semana se determinó el crecimiento radial de los hongos y el diámetro de la decoloración.

La capacidad de decoloración se expresó cómo:

$$\frac{\text{Halo decoloración cm}}{\text{Diámetro caja de petri cm}} * 100$$

2.4 Remoción de colorante en medio líquido

Para evaluar la remoción del colorante en medios líquidos se utilizó el medio extracto de malta que contenía las tres concentraciones de colorante definidas (20,40 y 60ppm). Los cultivos se inocularon a partir del crecimiento en medio sólido de la biomasa de las cepas de hongos seleccionados (*Trametes* sp., *Pycnoporus* sp., *Lentinus* sp.). Como controles se emplearon medio extracto de malta líquido con colorante sin inocular, y medio extracto de malta líquido inoculado con las diferentes cepas de hongos y sin colorante (control de crecimiento). Adicionalmente, se incluyeron cultivos en medio líquido en las mismas condiciones mencionadas y a los cuales se les adicionó una matriz de *Luffa* sp., como matriz de soporte para favorecer el crecimiento del hongo. Los tratamientos se realizaron por triplicado y los cultivos se incubaron durante 3 semanas a 30°C y 100 rpm.

Para determinar el porcentaje de desaparición del colorante, cada semana se tomaron 2mL de muestra de cultivos líquidos. La muestra se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se analizó en un espectrofotómetro Vernier Spectral Analysis® a una longitud de onda de 590nm. De esta forma se calculó el porcentaje de remoción (Jadhav et al. 2008):

$$\% \text{ remoción de color} = \frac{C_i - C_t}{C_1} * 100$$

Donde:

C_i: concentración inicial de colorante

C_t: concentración de colorante en el tiempo (t)

En los tratamientos que contenían matriz de soporte el porcentaje de remoción se calculó teniendo en cuenta la cantidad de colorante absorbido a la matriz de soporte.

2.5 Determinación de la actividad de las enzimas Manganese Peroxidasa y Lacasa

La actividad de la enzima Manganese peroxidasa, se determinó siguiendo la metodología descrita por Vares et al., 1995. La mezcla de reacción contenía lactato 25 mM, MnSO₄ 0,1 mM, 1 mg de albúmina de suero bovino, 0,1 mg de rojo fenol y 0,5 ml de filtrado de cultivo en tampón de succinato de sodio 20 mM (pH 4,5), en un volumen total de 1 ml. La reacción se inició mediante la adición de H₂O₂ a una concentración final de 0,1 mM y se detuvo después de 5 min con 100uL de NaOH al 10%, al cabo de los cuales se analizó la muestra en el espectrofotómetro (Vernier Spectral Analysis®) a una longitud de onda de 610 nm. La actividad enzimática se determinó por la absorbancia sobre el tiempo de reacción (5 minutos), reportando los datos en U/minL.

$$\frac{U}{\text{min L}} = \frac{ABS}{\text{Tiempo (min)} * Vm(L)}$$

La actividad de la enzima Lacasa, se evaluó utilizando la metodología descrita por Cupul et al., 2016, que se basa en la oxidación de ABTS (2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico]-sal de diamonio) a una concentración de 5 mM (100 uL) con buffer acetato de sodio

pH 4,5 (800 uL) y extracto enzimático (100uL) en un volumen final de 1 mL. La mezcla de reacción se analizó en el espectrofotómetro (Vernier Spectral Analysis®) a una longitud de onda de 420nm.

La actividad enzimática se determinó por la absorbancia de la reacción en el tiempo (5min), los datos se reportaron en U/minL. La actividad enzimática se calculó utilizando la ecuación:

$$\frac{U}{\text{min L}} = \frac{\Delta ABS}{\Delta t} * \frac{FD}{\epsilon Vm}$$

Donde:

ABS: Absorbancia

FD: Factor de dilución

Vm: Volumen de muestra

t: Tiempo de reacción

ε: Coeficiente de extinción molar

2.6 Análisis estadístico

Utilizando el software estadístico R-studio, se emplearon pruebas paramétricas (análisis de varianza- ANOVA, análisis de medias prueba de Tukey) y no paramétricas (Kruskal Wallis y prueba de comparaciones no paramétricas de Dunn), ambas con un nivel de confianza del 95%. Adicionalmente, los datos mostrados en los resultados corresponden a los valores medios de las réplicas de un diseño en bloque completamente aleatorizado, al cual se le aplicó la prueba de Shapiro Wilk y el test de homogeneidad de varianza.

Para los análisis paramétricos y no paramétricos se tomó la siguiente premisa:

H0: No hay diferencias significativas

Hi: Existen diferencias significativas

3. RESULTADOS

3.1 Remoción de colorante cristal violeta en medio sólido

En la tabla 1, se muestran los porcentajes de remoción del colorante cristal violeta durante tres (3) semanas de cultivo en medios sólidos con colorante. En los tratamientos inoculados con el hongo *Pycnoporus* sp. se obtuvo un porcentaje de decoloración superior al 90%, un porcentaje superior al 80% en los tratamientos inoculados con *Lentinus* sp. y entre el 70 y el 85% en los tratamientos inoculados con *Trametes* sp., en las tres concentraciones evaluadas.

Tabla 1. Porcentajes de remoción del colorante cristal violeta en medio sólido extracto de malta inoculado con las cepas de hongos con diferentes concentraciones de colorante.

Tratamientos	<i>Pycnoporus</i> sp.			<i>Trametes</i> sp.			<i>Lentinus</i> sp.		
	Semana 1 (%)	Semana 2 (%)	Semana 3 (%)	Semana 1 (%)	Semana 2 (%)	Semana 3 (%)	Semana 1 (%)	Semana 2 (%)	Semana 3 (%)
20 ppm	25	75	99	13	31	85	25	47	84
40 ppm	5	38	93	11	24	77	0	27	86

60 ppm	0	38	93	13	26	76	27	36	86
--------	---	----	----	----	----	----	----	----	----

*Los porcentajes presentados en la tabla corresponden a valores promedio de los datos.

En la figura 2., se observa la dinámica de remoción del colorante cristal violeta en los medios sólidos con colorante.

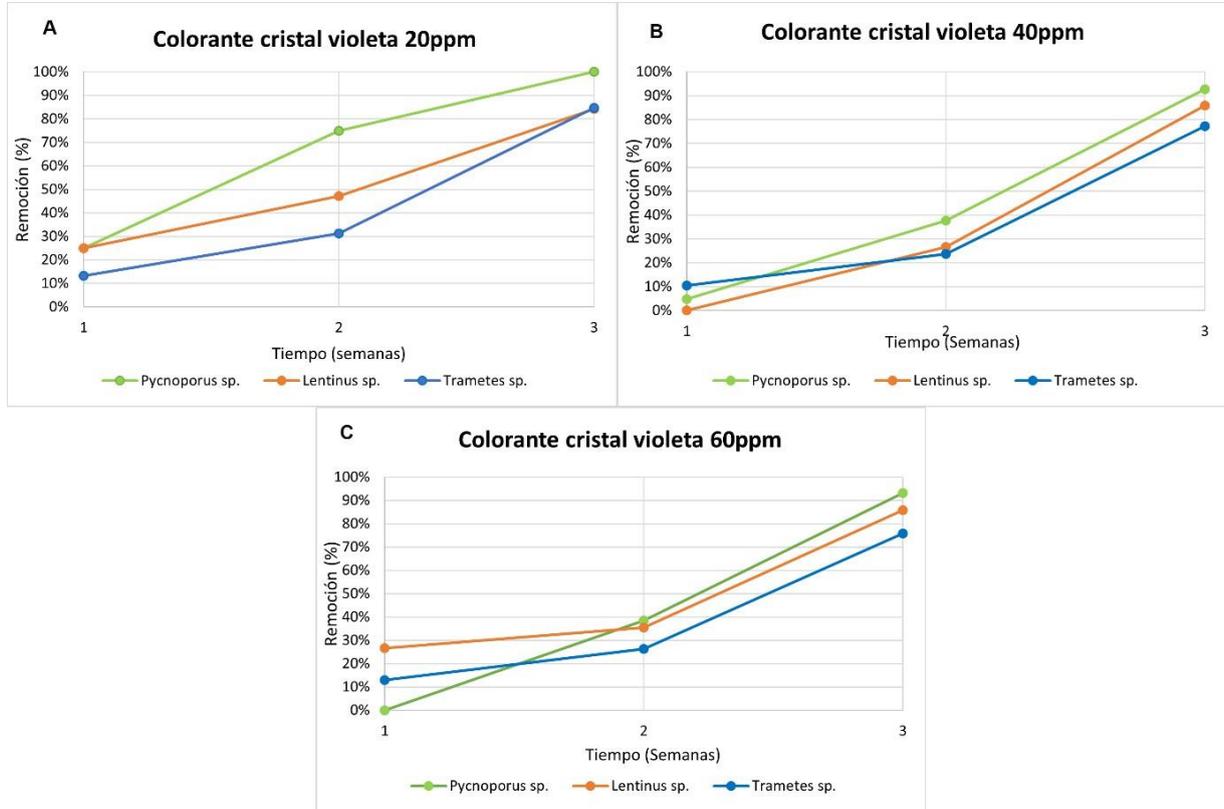


Figura 2. Porcentaje de remoción de diferentes concentraciones de colorante cristal violeta en medios sólidos inoculados con *Pycnoporus sp.*, *Lentinus sp.*, y *Trametes sp.* **A.** Concentración colorante 20ppm. **B.** Concentración colorante 40ppm **C.** Concentración colorante 60ppm.

3.2 Remoción de colorante cristal violeta en medio líquido sin matriz de soporte.

El porcentaje de remoción del colorante se determinó al cabo de tres semanas de cultivo, los tratamientos inoculados con los hongos *Pycnoporus sp.* y *Trametes sp.* presentaron altos porcentajes de remoción del colorante en 20ppm y 60ppm en comparación con los tratamientos inoculados con el hongo *Lentinus sp.* (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentajes de remoción de colorante cristal violeta en medio líquido extracto de malta inoculado con las cepas de hongos y sin matriz de soporte.

Tratamientos	<i>Pycnoporus sp.</i>			<i>Trametes sp.</i>			<i>Lentinus sp.</i>		
	Semana 1(%)	Semana 2(%)	Semana 3(%)	Semana 1(%)	Semana 2(%)	Semana 3(%)	Semana 1(%)	Semana 2(%)	Semana 3(%)
20 ppm	77	91	95	66	78	89	57	60	60
40 ppm	47	51	54	13	24	29	18	20	21
60 ppm	79	87	94	63	97	98	13	14	48

*Los porcentajes presentados en la tabla corresponden a valores promedio de los datos.

En la figura 3., se observa la dinámica de la concentración del colorante cristal violeta en el tiempo en medios líquidos sin matriz de soporte e inoculados con los hongos seleccionados.

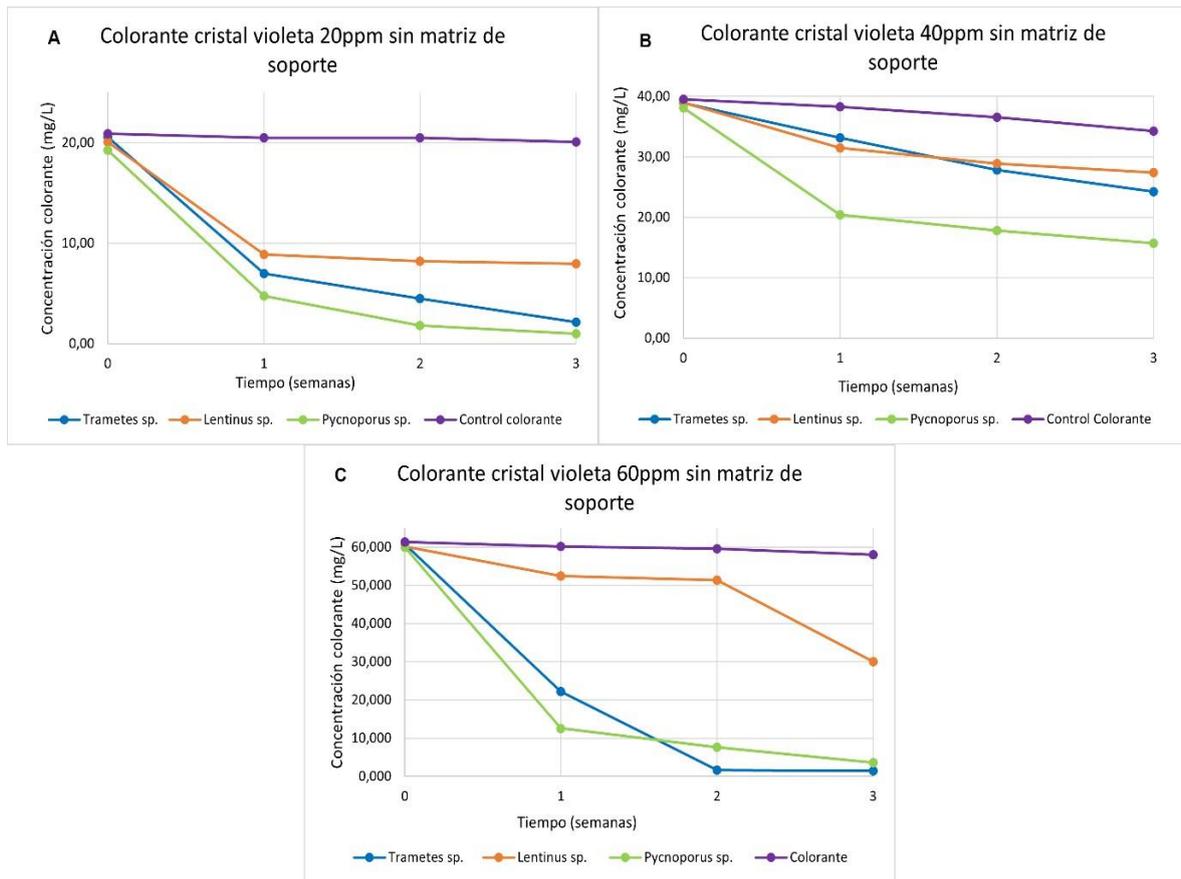


Figura 3. Concentración del colorante cristal violeta en medio líquido sin matriz de soporte e inoculado con *Pycnoporus sp.*, *Lentinus sp.*, y *Trametes sp.* con respecto al tiempo. **A.** Concentración colorante 20ppm. **B.** Concentración colorante 40ppm. **C.** Concentración colorante 60ppm.

3.3 Remoción de colorante cristal violeta en medio líquido incluyendo una matriz de soporte.

Los tratamientos se incubaron durante dos semanas, momento a partir del cual no se observaron variaciones en los valores de remoción del colorante. Se incluyó en este caso un tratamiento adicional para determinar el porcentaje de absorción del colorante a la matriz vegetal usada como soporte para el crecimiento de la biomasa, durante el tiempo de incubación.

Los porcentajes de remoción del colorante a partir de los tratamientos inoculados con los hongos se calcularon ponderando la absorción del colorante a la matriz vegetal, y el porcentaje de remoción de la matriz de soporte se calculó teniendo en cuenta la cantidad de colorante absorbida a la matriz comparado con control sin matriz. En la concentración de colorante 20 ppm el porcentaje de absorción del colorante a la matriz vegetal es superior al 80%, mientras que en la concentración de 40ppm el porcentaje de absorción del colorante a la matriz vegetal se incrementa con el tiempo de incubación alcanzando un porcentaje de absorción del 40% al cabo de dos semanas (Tabla 3). De forma general los datos obtenidos indican una disminución de la actividad de hongos evaluados sobre el colorante, que se ve influenciada probablemente por la cantidad de colorante adherida a la matriz de soporte y por una baja cantidad de biomasa.

Tabla 3. Porcentaje de remoción de colorante cristal violeta en medio líquido extracto de malta inoculado con las cepas de hongos y con matriz de soporte.

Tratamientos	<i>Pycnoporus sp.</i>		<i>Trametes sp.</i>		<i>Lentinus sp.</i>		Matriz de soporte	
	Semana 1(%)	Semana 2(%)	Semana 1(%)	Semana 2(%)	Semana 1(%)	Semana 2(%)	Semana 1(%)	Semana 2(%)
20 ppm	4	6	6	9	4	7	85	86
40 ppm	55	54	48	59	48	52	25	40

*Los porcentajes presentados en la tabla corresponden a valores promedio de los datos.

En la figura 4, se observa la dinámica de la concentración del colorante cristal violeta en el tiempo en medios líquidos inoculados con los hongos seleccionados, adicionando una matriz vegetal de soporte (*Luffa sp.*)

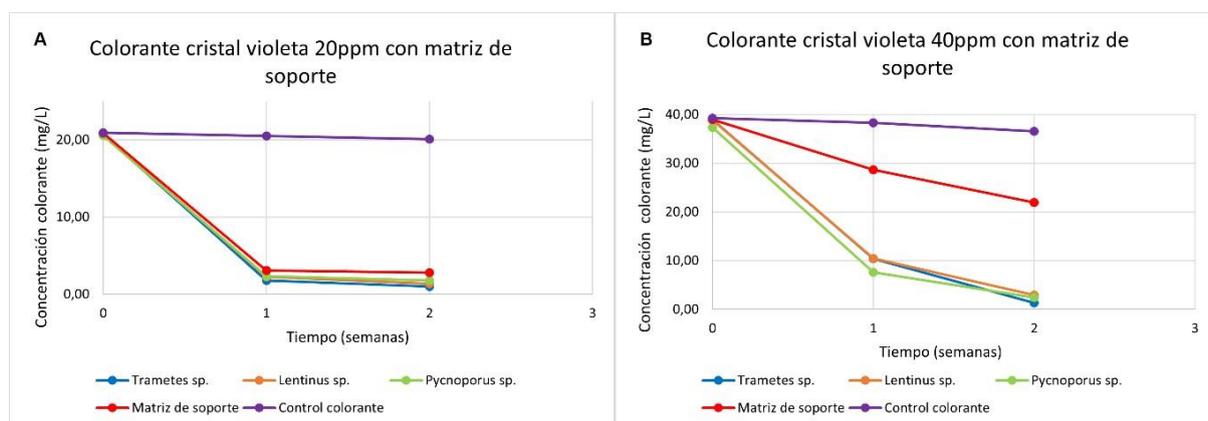


Figura 4. Concentración del colorante cristal violeta en medios líquidos incluyendo una matriz de soporte, e inoculados con *Pycnoporus sp.*, *Lentinus sp.*, y *Trametes sp.* con respecto al tiempo **A.** Concentración colorante 20ppm **B.** Concentración colorante 40ppm.

Los resultados encontrados en los tratamientos con colorante 40ppm muestran porcentajes de remoción del colorante del 45% a partir de la primera semana de incubación, alcanzando un 59% al cabo de la segunda semana. En los tratamientos con colorante 20ppm los porcentajes de remoción estuvieron por debajo del 10% en todos los tratamientos inoculados con las diferentes cepas de hongos, debido posiblemente alta tasa de absorción del colorante a la matriz vegetal.

Una dinámica similar se observó en los cultivos con concentración de colorante 60ppm en estos cultivos el colorante cristal violeta se absorbió rápidamente y en su totalidad a la matriz de soporte durante el tiempo de incubación, limitando así la determinación del porcentaje de remoción referido a la actividad de los hongos evaluados. Por esta razón, no se incluyeron en este análisis los porcentajes de remoción biológica calculados.

3.4 Determinación de la actividad de las enzimas extracelulares Lacasa y Manganeso Peroxidasa.

A continuación, se presentan los valores de concentración obtenidos para las enzimas extracelulares Lacasa y Manganeso Peroxidasa, detectadas en los cultivos líquidos inoculados con *Pycnoporus sp.*, *Lentinus sp.* y *Trametes sp.* en las concentraciones de colorante evaluadas.

3.4.1. Enzima Manganese Peroxidasa (MnP):

En los tratamientos con colorante 60ppm, con y sin matriz de soporte, se determinó la concentración de la enzima MnP cada 8 días durante todo el tiempo de incubación (3 semanas). En los tratamientos sin matriz de soporte, para el tratamiento de *Trametes* sp. se detectó la enzima MnP en el tiempo cero, tanto para el control de crecimiento como para el tratamiento con colorante e inoculado con el hongo. Cabe anotar que en los tratamientos inoculados con el hongo *Lentinus* sp. se detectó concentración de la enzima MnP durante todo el tiempo de cultivo, en el caso del control de crecimiento la enzima se detectó a partir de la semana 1 y hasta el final del cultivo.

Tabla 4. Detección de la enzima Manganese Peroxidasa en los tratamientos con y sin matriz de soporte con colorante 60ppm.

Actividad Manganese Peroxidasa (U/minL)						
Tiempo	<i>Pycnoporus</i> sp.		<i>Trametes</i> sp.		<i>Lentinus</i> sp.	
	Cristal violeta**	Control*	Cristal violeta**	Control*	Cristal violeta**	Control*
60 ppm sin matriz de soporte						
Semana 0	33,3	0	41,3	10	22,3	0
Semana 1	7,4	0	0	0	19,6	11,2
Semana 2	9,7	6,8	11,9	21	16,9	3,1
Semana 3	0	0	0	0	3,6	10
60 ppm con matriz de soporte						
Semana 0	0	0	0	0	0	0
Semana 1	0	20,9	0	7,9	0	0
Semana 2	0	0	0	0	0	0
Semana 3	0	0	0	0	0	0

*Control de crecimiento: medio líquido extracto de malta inoculado con hongo y sin adición de colorante

**Cristal violeta: medio líquido extracto de malta inoculado con hongo y con adición de colorante cristal violeta

En los tratamientos con matriz de soporte y 60ppm de colorante, no se detectó la enzima MnP. Mientras que en los controles de crecimiento de *Pycnopours* sp. y *Trametes* sp., se detectó la enzima MnP al cabo de la semana 1 de incubación.

En la Figura 5., se presenta la dinámica de producción de la enzima MnP en los cultivos con colorante 60ppm. Los cultivos sin matriz de soporte muestran una tendencia estable en la dinámica de la producción de la enzima es decir no se perciben cambios abruptos en la producción, contrario a lo observado en los cultivos con matriz de soporte donde se detectó en la semana 1 un incremento en la cantidad del enzima seguido de un descenso pronunciado que se extiende hasta el final del tiempo de incubación.

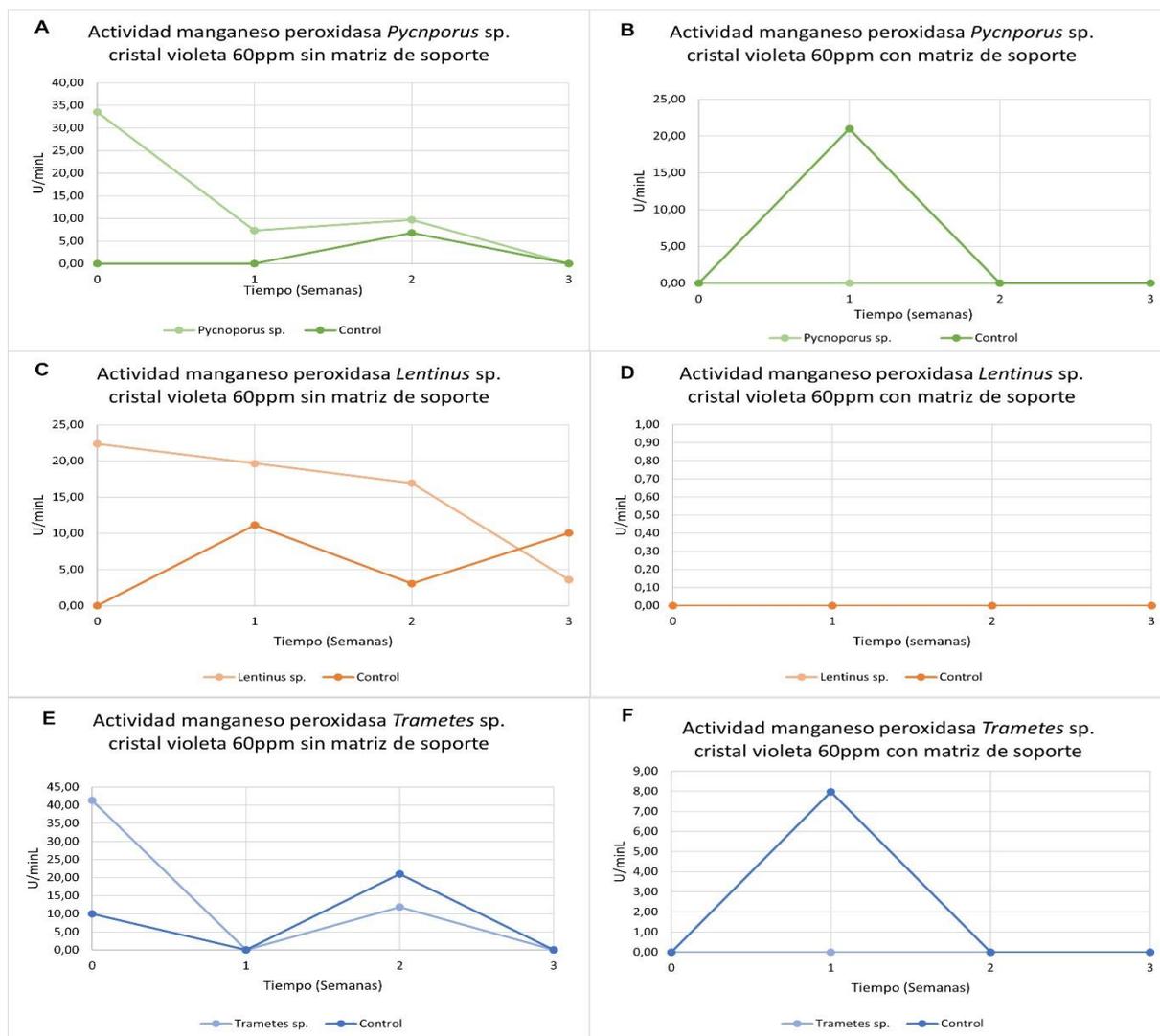


Figura 5. Determinación de la actividad de la enzima Manganeso Peroxidasa (MnP) en los cultivos líquidos con colorante cristal violeta 60ppm, inoculados con los hongos evaluados; con y sin matriz de soporte. **A.** Actividad MnP de *Pycnoporus* sp., concentración 60ppm sin matriz de soporte. **B.** Actividad MnP de *Pycnoporus* sp., con matriz de soporte. **C.** Actividad MnP de *Lentinus* sp., sin matriz de soporte. **D.** Actividad MnP de *Lentinus* sp., con matriz de soporte. **E.** Actividad MnP de *Trametes* sp., sin matriz de soporte. **F.** Actividad MnP de *Trametes* sp., con matriz de soporte.

En los tratamientos con concentraciones de colorante 20 y 40ppm, con y sin matriz de soporte, se determinó la concentración de la enzima MnP al final del tiempo de incubación (Tabla 5). De forma general en ambos tratamientos, con y sin matriz de soporte, para las concentraciones mencionadas (20 y 40 ppm) se detectó la enzima MnP tanto en los tratamientos con colorante como en los controles de crecimiento, a excepción de lo observado en el cultivo con colorante 20 ppm con matriz de soporte para *Trametes* sp., donde no se detecta la enzima en el tratamiento con colorante y el control.

Los datos en 40 ppm sin matriz de soporte muestran una concentración similar de la enzima MnP en los cultivos inoculados con las tres cepas de hongos, tanto en los tratamientos con colorante como en los controles de crecimiento. Asimismo, en los tratamientos con matriz de soporte y los controles se detectó la enzima MnP, con excepción del control de *Trametes* sp. donde no fue detectada (Tabla 5).

Tabla 5. Detección de la actividad de la enzima Manganeso peroxidasa en los tratamientos con y sin matriz de soporte con concentración de colorante de 20 y 40ppm.

Actividad Manganeso Peroxidasa (U/minL)						
Tratamientos	<i>Pycnoporus</i> sp.		<i>Trametes</i> sp.		<i>Lentinus</i> sp.	
	Cristal violeta**	Control*	Cristal violeta**	Control*	Cristal violeta**	Control*
20 ppm sin matriz de soporte	108,9	266	271	1,5	33,3	303,8
40 ppm sin matriz de soporte	321,6	1,7	355,2	1,4	346,2	1,3
20 ppm con matriz de soporte	22,9	47,0	0	0	13,6	16,2
40 ppm con matriz de soporte	158,5	47,0	85,2	0	232	16,2

*Control de crecimiento: medio líquido extracto de malta inoculado con hongo y sin adición de colorante

**Cristal violeta: medio líquido extracto de malta inoculado con hongo y con adición de colorante cristal violeta

Los datos en 20 ppm sin matriz de soporte muestran una alta concentración de la enzima MnP en el tratamiento inoculado con *Trametes* sp. en comparación con los tratamientos inoculados con *Pycnoporus* sp. y *Lentinus* sp., en los que también se detectó la enzima. En los tratamientos con matriz de soporte inoculados con *Pycnoporus* sp. y *Lentinus* sp. se observó una alta concentración de la enzima en el control de crecimiento, con una particularidad y es que para *Lentinus* sp. se detectaron valores similares de la enzima en ambos, tratamientos con colorante y control de crecimiento.

3.4.2 Enzima Lacasa (Lac):

En los tratamientos con colorante 60 ppm, con y sin matriz de soporte, se determinó la concentración de la enzima Lac cada 8 días durante todo el tiempo de incubación (3 semanas).

Tabla 6. Detección de la enzima Lacasa en los tratamientos con y sin matriz de soporte con concentración de colorante 60 ppm.

Actividad Lacasa (U/minL)						
Tiempo	<i>Pycnoporus</i> sp.		<i>Trametes</i> sp.		<i>Lentinus</i> sp.	
	Cristal violeta**	Control*	Cristal violeta**	Control*	Cristal violeta**	Control*
60 ppm sin matriz de soporte						
Semana 0	114,4	73,9	10,4	57,1	1,6	8,7
Semana 1	128	249,9	58,7	27,3	1,9	8,3
Semana 2	153,8	259,9	108,1	38,5	0,8	4,2
Semana 3	15,2	93,8	81,3	27	1,5	17,5
60 ppm con matriz de soporte						
Semana 0	1,3	47,6	0,5	2,7	3,7	0,8
Semana 1	14,7	31,7	9,5	0	11,3	80,7
Semana 2	3,2	108,8	0	9,8	2,2	5,1
Semana 3	1,3	67,9	0,4	44,1	1,1	1,6

*Control de crecimiento: medio líquido extracto de malta inoculado con hongo y sin adición de colorante

**Cristal violeta: medio líquido extracto de malta inoculado con hongo y con adición de colorante cristal violeta

De forma general, en los tratamientos inoculados con las tres cepas de hongos, con y sin matriz de soporte, la concentración más alta de enzima Lac se detectó en los controles de crecimiento del tratamiento inoculado con *Pycnoporus* sp. (Figura 6). En los tratamientos con colorante sin matriz de soporte se observó una variación de la concentración de la enzima durante el tiempo de incubación, en los tratamientos inoculados con *Pycnoporus* sp, tanto el control cómo para el tratamiento exhiben una dinámica similar, mientras que para *Trametes* sp. se observa un comportamiento similar hasta semana 2, y posteriormente se da un incremento en la concentración de la enzima en el control, en comparación con el tratamiento donde la cantidad disminuye. En el tratamiento inoculado con *Lentinus* sp. se detectó una alta concentración de la enzima en la semana 3 con respecto al control de crecimiento fue menor.

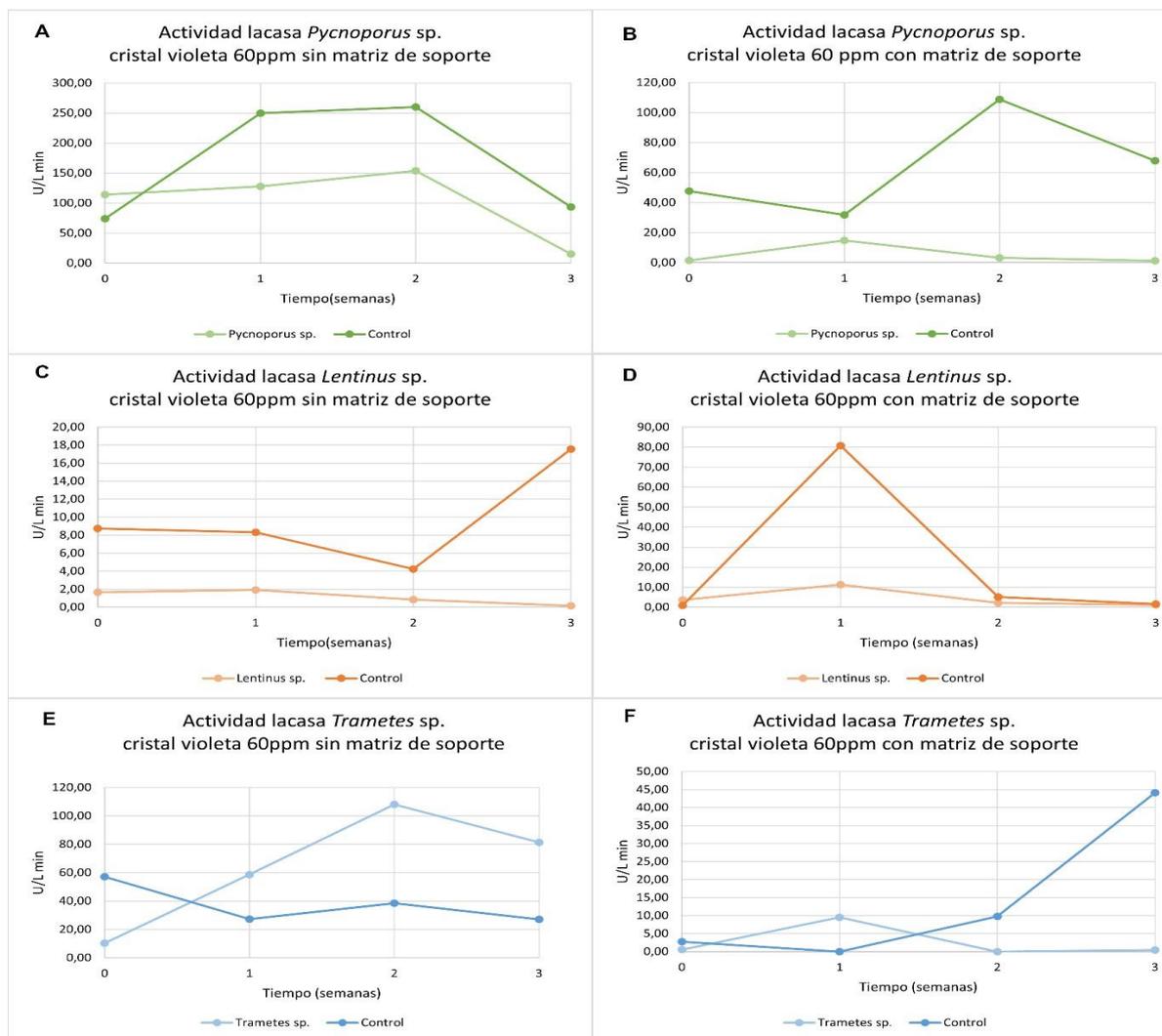


Figura 6. Determinación de la actividad de la enzima Lacasa (Lac) en los cultivos líquidos con colorante cristal violeta 60ppm, inoculados con los hongos evaluados; con y sin matriz de soporte. **A.** Actividad Lac de *Pycnoporus* sp., sin matriz de soporte. **B.** Actividad Lac de *Pycnoporus* sp., con matriz de soporte. **C.** Actividad Lac de *Lentinus* sp., sin matriz de soporte. **D.** Actividad Lac de *Lentinus* sp., con soporte. **E.** Actividad Lac de *Trametes* sp., sin matriz de soporte. **F.** Actividad Lac de *Trametes* sp., con matriz de soporte.

En los tratamientos inoculados con *Trametes* sp. y con matriz de soporte, se detectó una baja cantidad de la enzima durante todo el tiempo de incubación, mientras que en el control de crecimiento se observó un incremento a partir de la semana 2 y hasta el final del tiempo de incubación. En los tratamientos inoculados con *Lentinus* sp. y su respectivo control de crecimiento se detectó la enzima Lac al cabo de la semana 1 de incubación, siendo más alta la concentración de la enzima en el control. En cuanto a los tratamientos inoculados con *Pycnoporus* sp. también se detectó la enzima Lac en la semana 1 de incubación, siendo más significativa la cantidad detectada en el control comparado con el tratamiento inoculado en el cual la cantidad de enzima tiende a disminuir hacia el final del experimento (Figura 6).

En los tratamientos con las concentraciones de colorante 40 y 20ppm, con y sin matriz de soporte, se determinó la concentración de la enzima Lac al final del tiempo de incubación. En todos los cultivos, tratamiento y control, con ambas concentraciones de colorante se detectó la enzima Lac, siendo mayor la cantidad de enzima detectada en los controles que en los

tratamientos, con excepción del tratamiento inoculado con *Lentinus* sp. y con matriz de (Tabla 7).

Tabla 7. Detección de la actividad de la enzima Lacasa en los tratamientos con y sin matriz de soporte con concentración de colorante de 20 y 40ppm.

Actividad Lacasa (U/minL)						
Tratamientos	<i>Pycnoporus</i> sp.		<i>Trametes</i> sp.		<i>Lentinus</i> sp.	
	Cristal violeta**	Control*	Cristal violeta**	Control*	Cristal violeta**	Control*
20 ppm sin matriz de soporte	38,4	43,7	7,6	46,4	0,1	2,8
40 ppm sin matriz de soporte	25,4	7,5	2,9	2,3	0,5	7,6
20 ppm con matriz de soporte	25,6	37,8	0,3	0,62	13,6	4,1
40 ppm con matriz de soporte	4,2	37,8	0,4	0,6	6,7	4,1

*Control de crecimiento: medio líquido extracto de malta inoculado con hongo y sin adición de colorante

**Cristal violeta: medio líquido extracto de malta inoculado con hongo y con adición de colorante cristal violeta

En los cultivos con colorante 20 ppm sin matriz de soporte, se observó una alta cantidad de la enzima Lac en el tratamiento y control con *Pycnoporus* sp., mientras que en el caso de *Lentinus* sp. el control y el tratamiento presentaron bajas cantidades de la enzima.

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos presentados corresponden al análisis de varianza, partiendo de la exploración de datos utilizando la prueba de normalidad Shapiro Wilk y una prueba de homogeneidad de varianza. Los análisis paramétricos se realizaron con una prueba Anova y la comparación de medias utilizando la prueba de Tukey. Los análisis no paramétricos se realizaron utilizando la prueba de Kruskal Wallis y la prueba de comparaciones no paramétricas de Dunn todos con un nivel de significancia de 95%.

En los cultivos en medio sólido, con concentración de colorante 20 ppm (Figura 7A) se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos inoculados con las tres cepas de hongos, en la semana 1 y 3. Asimismo, en los tratamientos con 40 ppm (Figura 7B), solo se observan diferencias significativas en la semana 1 en los tratamientos inoculados con *Lentinus* sp. y *Pycnoporus* sp. con respecto a los inoculados con *Trametes* sp. En los tratamientos con concentración de 60 ppm e inoculados con *Lentinus* sp. y *Pycnoporus* sp. no se encontraron diferencias significativas durante las semanas 2 y 3 (Figura 7C).

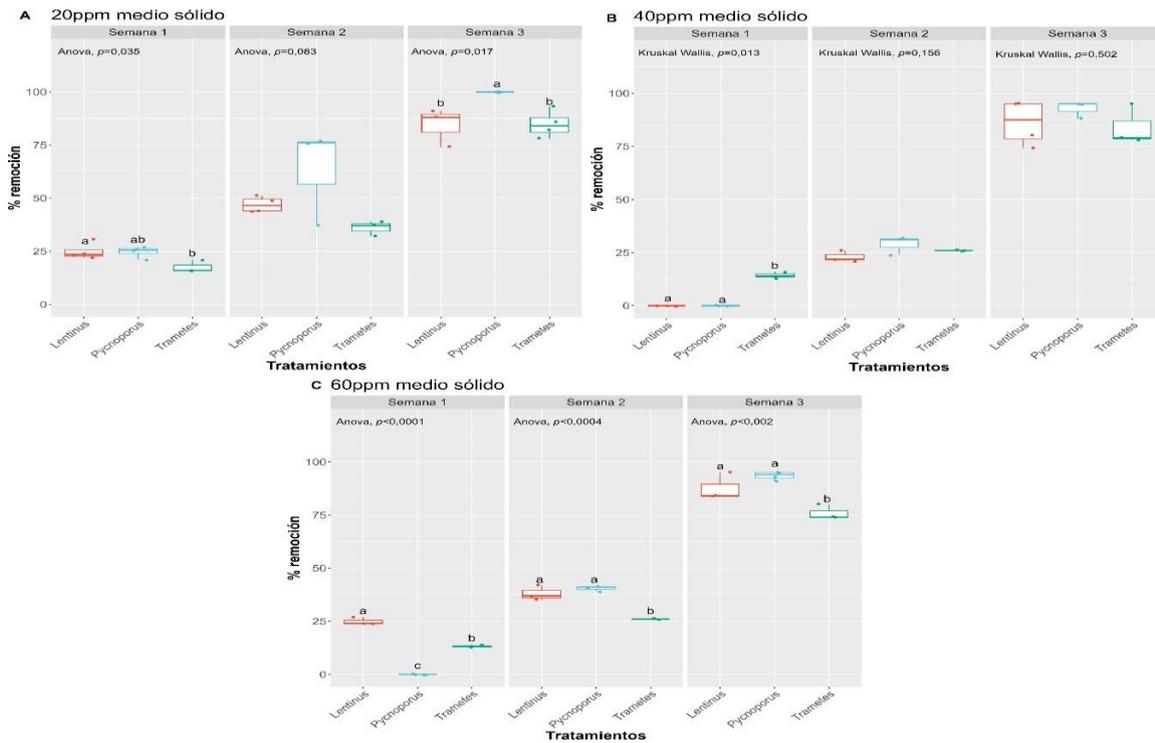


Figura 7. Análisis estadístico de la remoción de colorante en medio de cultivo sólido con una significancia del 95% **A.** Colorante 20 ppm **B.** Colorante 40 ppm **C.** Colorante 60 ppm

En los tratamientos con colorante 20 ppm sin matriz de soporte (Figura 8A), se observan diferencias significativas en todos los tiempos evaluados, y a partir de la semana 2 se observaron diferencias entre los tratamientos. En los cultivos con colorante 20 ppm con matriz de soporte (Figura 8B), solo se observan diferencias significativas en la semana 1 y 2; en la semana 3 los tratamientos inoculados con *Lentinus* sp. y *Trametes* sp. no presentaron diferencias entre sí.

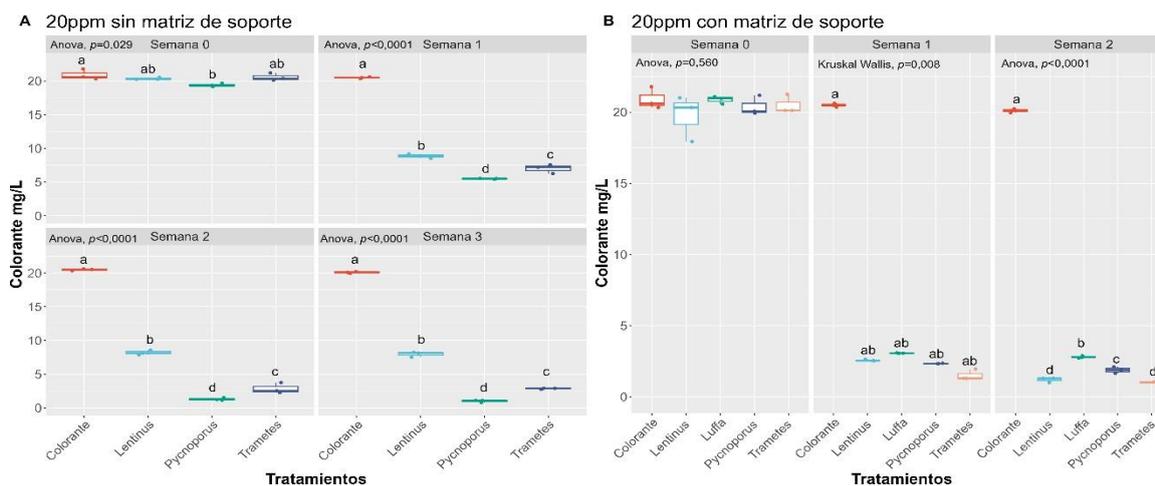


Figura 8. Análisis estadístico de la remoción de colorante en medio de cultivo líquido con y sin matriz de soporte para la concentración de 20 ppm con una significancia del 95% **A.** sin matriz de soporte **B.** con matriz de soporte.

En los tratamientos con 40 ppm sin matriz de soporte (Figura 9A), se observan diferencias significativas a partir de la semana 1, en la semana 3 el control de colorante y el tratamiento inoculado con *Lentinus* sp. no presentaron diferencias entre sí. Asimismo, los tratamientos inoculados con *Pycnoporus* sp. y *Trametes* sp. no presentaron diferencias significativas entre

sí. En el experimento 40 ppm con matriz de soporte (Figura 9B), se observaron diferencias significativas en todos los tiempos evaluados, en la semana 2 se hallaron diferencias entre el control de colorante y el cultivo con la matriz de soporte; los tratamientos con colorante e inoculados con los hongos no tuvieron diferencias entre sí.

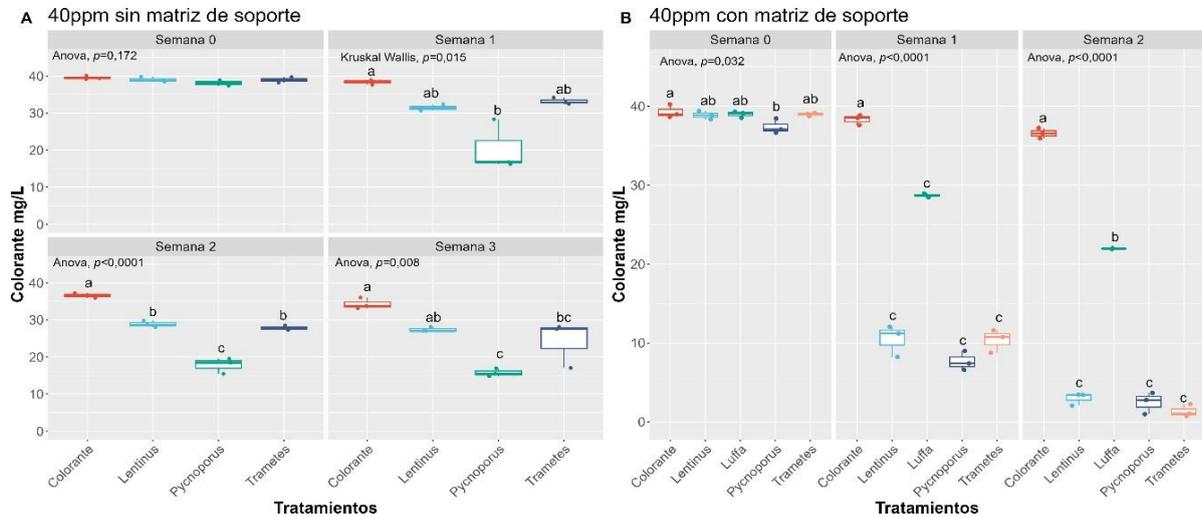


Figura 9. Análisis estadístico de la remoción de colorante en medio de cultivo líquido con y sin matriz de soporte para la concentración de 40 ppm con una significancia del 95% **A.** sin matriz de soporte **B.** con matriz de soporte.

En los tratamientos con una concentración de 60 ppm, con y sin matriz de soporte (Figura 10A y B), se observaron diferencias significativas a partir de la semana 1.

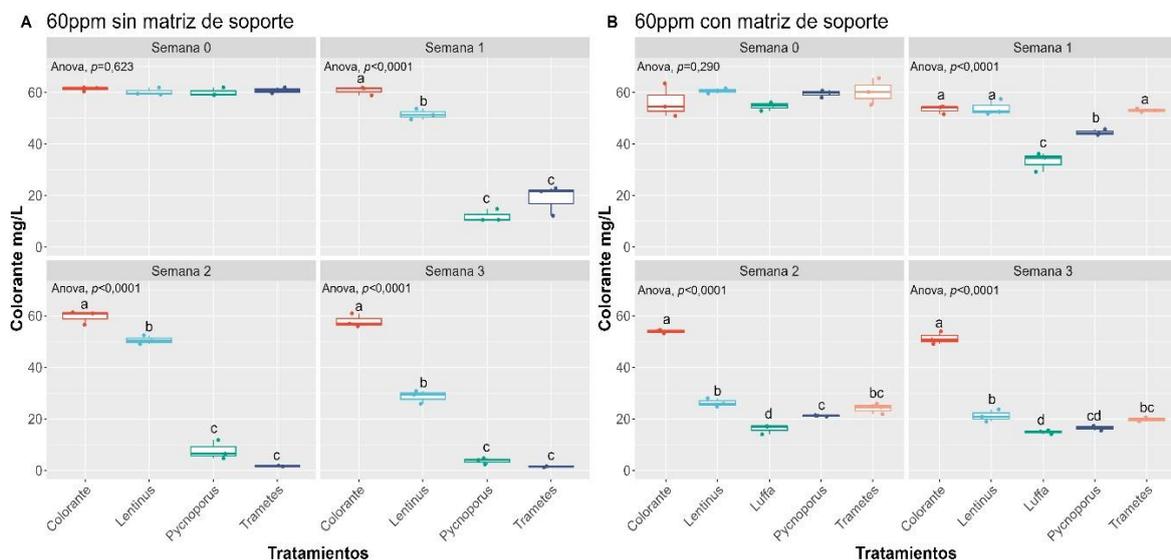


Figura 10. Análisis estadístico de la remoción de colorante en medio de cultivo líquido con y sin matriz de soporte para la concentración de 60ppm con una significancia del 95% **A.** sin matriz de soporte **B.** con matriz de soporte.

Los tratamientos sin matriz de soporte e inoculados con *Pycnoporus* sp. y *Trametes* sp. no presentaron diferencias significativas entre sí. En contraste, los tratamientos con matriz de soporte e inoculados con *Lentinus* sp. y *Trametes* sp. presentaron diferencias significativas en la semana 3.

4. DISCUSIÓN

Para la evaluación de la transformación o degradación de colorantes se emplean métodos dependientes de cultivo, sólido y líquido; a partir de los cuales es posible elucidar la dinámica de crecimiento del microorganismo en presencia del colorante, así como aspectos relacionados con fenómenos de disolución, absorción y desorción de la molécula colorante y por supuesto la eficiencia de remoción. Cabe anotar que la efectividad y la eficiencia de la transformación o remoción de la molécula contaminante está influenciada entre otros, por sus características químicas y grado de toxicidad, además de la capacidad metabólica del microorganismo utilizado para el proceso (Gao et al., 2018; Dong et al., 2019; Sunita V et al., 2020). Frente a los fenómenos de absorción y desorción algunos autores sugieren que la biodisponibilidad de la molécula se ve favorecida por la mezcla continua que se da en los medios líquidos en agitación, en comparación con la dinámica que se tiene en los medios sólidos donde la homogenización de la molécula contaminante en el medio dependerá de las propiedades hidrofílicas de la molécula. Sin embargo, cabe anotar que en comparación con los medios líquidos en los medios sólidos la tasa de asimilación de nutrientes por parte del microorganismo es más alta lo que genera un incremento rápido de la biomasa, seguido del agotamiento de los nutrientes y favoreciendo así la expresión de las enzimas ligninolíticas y la rápida transformación del colorante (González y Herrera, 2011).

Los hongos empleados en este trabajo para evaluar la remoción del colorante cristal violeta, hacen parte del grupo de hongos de la podredumbre blanca, que son frecuentemente utilizados por su versatilidad metabólica en la degradación o transformación de una gran variedad de moléculas químicas contaminantes (Kathiravan y Gnanadoss, 2021). Los resultados encontrados en el presente estudio indican que de los hongos evaluados, los pertenecientes a los género *Trametes* sp. y *Pycnoporus* sp. tienen la capacidad de remover en mayor porcentaje el colorante cristal violeta en ambos medios de cultivo, sólido y líquido (Tabla 1 y 2), en comparación con los tratamientos inoculados con *Lentinus* sp., un alto porcentaje de remoción se da en el medio sólido comparado con el medio líquido, coincidiendo estos resultados con datos previamente reportados para este género en particular y que sugieren además, de forma similar a lo observado respecto al porcentaje de remoción, que se produce una mayor cantidad de enzimas extracelulares en medios sólidos en comparación con los medios líquidos (Tripathi, 2012).

De forma general, se asume que el mecanismo de remoción del colorante utilizando hongos de la podredumbre blanca suele dividirse en dos partes, inicialmente tiene lugar un fenómeno de sorción del colorante a la biomasa fúngica, seguido de la transformación de la molécula colorante por acción de las enzimas extracelulares producidas por el hongo: Lacasa, Lignina peroxidasa y Manganese peroxidasa, las cuales tienen poca especificidad y por tanto pueden degradar o transformar una variedad de compuestos xenobióticos, incluidos los colorantes (Periasam et al., 2019; Riegas et al., 2020). La enzima Lacasa es una enzima polifenólica que cataliza la oxidación de diferentes compuestos aromáticos utilizando el oxígeno como aceptor de electrones (Duarte et al., 2018) y la enzima Manganese peroxidasa es una hemoperoxidasa que cataliza la reacción de oxidación de Mn^{2+} a Mn^{3+} utilizando peróxido de hidrógeno y oxidando compuestos como la lignina, y otras moléculas químicas (Hildén y Mäkelä, 2018). Cabe anotar que la actividad de estas enzimas extracelulares es un aspecto importante dentro del metabolismo de los hongos de la podredumbre blanca, hasta el punto

que se ha considerado una relación directa entre la producción de tales enzimas y la transformación de moléculas químicas como los colorantes (Wang et al., 2022).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran una alta concentración de la enzima Lac en los cultivos inoculados con los hongos de los géneros *Pycnoporus* sp. y *Trametes* sp. en comparación con la concentración para la misma enzima detectada en los tratamientos inoculados con *Lentinus* sp. Coincidiendo en este caso con lo reportado por González et al (2019) durante la transformación del colorante antraquinónico Blue19 en presencia de *Trametes* sp., donde se detectaron 15,36 U/g de la enzima Lac, y los datos reportados por lo Dauda y Erkurt (2020) durante la transformación de los colorantes antraquinónicos Azul ácido 62 y Azul reactivo 19 en cultivos inoculados con el hongo *Pycnoporus* sp., que reportaron una concentración de 143000 UI⁻¹ para la misma enzima (González et al.,2019; Dauda y Erkurt, 2020).

Los porcentajes de remoción del colorante cristal violeta detectados para el género *Pycnoporus* sp. en el presente trabajo están alrededor del 95% acompañado de un incremento en la producción de las enzimas extracelulares, Lac y MnP, a partir de la segunda semana de incubación, siendo mayor la concentración de la enzima Lac. Este aspecto en particular relacionado con la producción de enzimas extracelulares ha sido previamente indicado, sugiriendo una menor producción de enzimas tipo peroxidasas en los procesos de transformación en los que participa el hongo *Pycnoporus* sp. (Soto et al.,2017).

Respecto a la dinámica observada en los tratamientos inoculados con el género *Trametes* sp., en el presente estudio se evidenció la producción de ambas enzimas Lac y MnP después de la primera semana de incubación y un porcentaje de remoción de colorante del 98%, coincidiendo también con datos previos que reportan valores máximos de estas enzimas al cabo de 7 días de incubación (Piyangkun et al.2018). Cabe anotar que comúnmente en los procesos de degradación o transformación de los colorantes, azoicos y trifenilmetanos, por hongos de la podredumbre blanca se ha indicado que la enzima Lac es la responsable de oxidar los grupos cromóforos de estos dos grupos de colorantes, generando intermediarios con bajo potencial redox y que no catalizados por las enzimas tipo peroxidasas; observándose en consecuencia un incremento en la producción de la enzima Lac respecto a la enzima MnP (Hernández et al. 2020).

De forma general, se ha asociado la producción de las enzimas extracelulares en los hongos de la podredumbre blanca a la composición del medio de cultivo utilizado, sugiriendo que algunos componentes del medio (glucosa y nitrógeno) tienen un papel fundamental como promotores de la producción de una u otra enzima (Kameshwar y Qin ,2017). La glucosa presente en el medio es una fuente alternativa de carbono para el hongo, que promueve la activación de su maquinaria metabólica y por tanto la producción de enzimas (Kumar et al. 2016); el nitrógeno por su parte, es un nutriente esencial para que se lleve a cabo el crecimiento micelial y también la producción de enzimas, algunos estudios sugieren por ejemplo que un aumento en la concentración de nitrógeno al 0,5% en el medio de cultivo produce un incremento en la tasa de decoloración (Munera et al.,2017). Así las cosas, la evaluación de diferentes proporciones de glucosa y nitrógeno en el medio de cultivo y su impacto sobre las tasas de producción de las enzimas extracelulares y los porcentajes de remoción del colorante, se plantean como una proyección de este trabajo con miras a

establecer las mejores condiciones para incrementar la eficiencia del proceso de decoloración.

Sumado a la composición de los medios de cultivo, también se sugiere la utilización de superficies de soporte para favorecer el crecimiento de la biomasa del hongo al proveer una superficie que permita la expansión del micelio. En este trabajo se evaluó la utilización de un material vegetal (*Luffa* sp.) como superficie de soporte para el crecimiento del hongo. La *Luffa* sp. está compuesta principalmente de celulosa (62,34%), hemicelulosa (84,84%) y lignina (14,04%) y presenta una estructura similar a un sistema vascular fibroso que funciona generalmente como superficie bio-adsorbente debido a la interacción de sus fibras protonadas con radicales químicos libres (Akgul et al, 2013; Peluffo y Pereira, 2017; Chaparro y Gómez, 2018). Este material particularmente se ha empleado para inmovilizar diferentes géneros de hongos con potencial biotecnológico para recuperar ambientes contaminados con metales tóxicos, sustancias colorantes y otros compuestos xenobióticos presentes en matrices acuosas (Laraib et al., 2020).

Los resultados obtenidos en los tratamientos en medio líquido con colorante, con matriz de soporte e inoculados con las cepas de hongo evaluadas, mostraron la ocurrencia de fenómenos de absorción del colorante a las fibras vegetales de la matriz de soporte, limitando la adherencia del hongo a la matriz y disminuyendo la producción de suficiente biomasa fúngica. Adicionalmente, la unión del colorante a la matriz afectó la eficiencia de su remoción biológica, pues al contrario de lo que se esperaba ninguno de los hongos empleados para inocular los tratamientos tuvo la capacidad para colonizar adecuadamente las fibras vegetales coloreadas, limitando el crecimiento de la biomasa y la actividad metabólica del hongo sobre la molécula de colorante. Esta hipótesis se refuerza con los resultados observados en cuanto a la baja producción de enzimas extracelulares, MnP y Lac, en los tratamientos que contenían la matriz de soporte, pues cómo se mencionó anteriormente una característica importante de este material es su capacidad de absorción, que se hizo evidente en los cultivos donde se observó la ocurrencia de este fenómeno, disminuyendo a su vez la posibilidad de que las células fúngicas presentes en el medio puedan transformar o degradar el colorante (Bhagwat y Jaspal, 2022).

5. CONCLUSIONES

Los hongos de la podredumbre blanca de los géneros *Pycnoporus* sp., *Trametes* sp. y *Lentinus* sp., tienen la capacidad para remover el colorante cristal violeta, tanto en medios sólidos como en medios líquidos, siendo los géneros *Pycnoporus* sp. y *Trametes* sp. los que exhibieron una mayor eficiencia en la remoción del colorante con porcentajes de remoción del 95% y 98% respectivamente. Esta dinámica se relaciona a su vez con la detección de una alta concentración de enzimas extracelulares, particularmente de la enzima Lac responsable de la transformación de una variedad de moléculas colorantes, estos hallazgos ponen de manifiesto el potencial biotecnológico principalmente del género *Pycnoporus* sp. como una alternativa para la realización de procesos similares a mayor escala.

Adicionalmente, se encontró que el empleo de la matriz de soporte, *Luffa* sp., no tuvo un efecto significativo sobre la eficiencia del proceso de remoción del colorante y tampoco favoreció la producción de una mayor cantidad de enzimas extracelulares, por el contrario, tuvo un efecto limitante en la acción de los hongos sobre colorante cristal violeta.

6. BIBLIOGRAFÍA

Akgül, M., Korkut, S., Çamlıbel, O., and Ayata, Ü. (2013). "Some chemical properties of *Luffa* and its suitability for medium density fiberboard (MDF) production," *BioRes.* 8(2), 1709-171

Bhagwat, SB, Jaspal, D. (2022). Aplicaciones de biomateriales a base de *Luffa* sp. en aguas residuales textiles. En: Muthu, SS, Khadir, A. (eds) *Textile Wastewater Treatment. Textiles sostenibles: producción, procesamiento, fabricación y química*. Springer, Singapur. https://doi.org/10.1007/978-981-19-2852-9_5

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.

Chaparro, P. D. (2018). Evaluación de la inmovilización de *Trametes versicolor* DSM 3086 en estropajo común (*Luffa Cylindrica*). Recuperado de: <http://hdl.handle.net/20.500.12495/3306>.

Duarte Trujillo, Astrid & Jiménez F., Javier & Pineda Insuasti, Julio & Mora Muñoz, Elsa. (2018). Degradación de índigo carmín por hongos de pudrición blanca / Indigo carmine degradation by white rot fungi. 1. 2018.

Fernández, J. A., Henao, L. M., Pedroza-Rodríguez, A. M. y Quevedo-Hidalgo, B. (2009). Inmovilización de hongos ligninolíticos para la remoción del colorante negro reactivo 5. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(1), 59–72. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/10322>

Gao, Y., Yang, B., & Wang, Q. (2018, August). Biodegradation and decolorization of dye wastewater: A review. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 178, No. 1, p. 012013). IOP Publishing

Gonzales- Rueda, V., Herrera-Rodriguez, C., 2011. Determinación de parámetros cinéticos y pruebas preliminares de tratabilidad para colorantes y metales empleando una cepa de *Ganoderma lucidum*. Trabajo de grado. Facultad de ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

H. Dong, T. Guo, W. Zhang, H. Ying, P. Wang, Y. Wang, Y. Chen Biochemical characterization of a novel azoreductase from *Streptomyces* sp.: application in eco-friendly decolorization of azo dye wastewater *Int. J. Biol. Macromolecules*, 140 (2019), pp. 1037-1046.

Hernanández-Sáenz, D., Puentes-Morales, C. S., Mateus-Maldonado, J. F., Pedroza-Camacho, L. D., Ramírez-Rodríguez, J., Rivera-Hoyos, C. M., & Pedroza-Rodríguez, A. M. (2020). Evaluación del consorcio entre *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* y bacterias aeróbicas para remoción de colorantes sintéticos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 22(1), 45–59. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v22n1.82735>

JA Bumpus , BJ Brock. Biodegradación del cristal violeta por el hongo de la pudrición blanca *Phanerochaete chrysosporium* aplicación Reinar. *Microbiol.* , 54 (1988) , págs. 1143 - 1150

Jin XC, Liu GQ, Xu ZH, Tao WY. Decolorization of a dye industry effluent by *Aspergillus fumigatus* XC6. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007;74(1):239–43.

Kameshwar, AKS, Qin, W. (2017) El análisis de metadatos de expresión génica revela los mecanismos moleculares empleados por *Phanerochaete chrysosporium* durante la degradación de la lignina y la desintoxicación de extractos de plantas. *Curr Genet* 63 , 877–894. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0686-7>

Kathiravan, A. y Joel Gnanadoss, J. (2021). Biorremediación mediada por hongos de pudrición blanca como método sostenible para la degradación de xenobióticos. *Biología ambiental y experimental*, 19 (3), 103–119. <https://doi.org/10.22364/eeb.19.11>

Kristiina Hildén, Miia R. Mäkelä, Role of Fungi in Wood Decay, Reference Module in Life Sciences, Elsevier, 2018, , ISBN 9780128096338, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.12424-0>.

Kumar, S., Raut, S., Bandyopadhyay, P., y Raut, S. (2016). Fungal decolouration and degradation of azo dyes : a review. *Fungal Biology Reviews*, 30(3), 112–133. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.06.003>

Laraib, Q., Shafique, M., Jabeen, N., Naz, SA, Nawaz, HR, Solangi, B., ... & Sohail, M. (2020). *Luffa cylindrica* inmovilizada con *aspergillus terreus* QMS-1: una estrategia eficiente y rentable para la eliminación de rojo congo utilizando un reactor de tanque agitado. *Revista polaca de microbiología* , 69 (2), 193

Li X, Jin X, Zhao N, Angelidaki I, Zhang Y. Novel bio-electro-Fenton technology for azo dye wastewater treatment using microbial reverse-electrodialysis electrolysis cell. *Bioresour Technol* [Internet]. 2017;228:322–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.114>

López DJR, Fernández DCP. Degradación de cristal violeta por CWPO usando catalizadores de CuMn: Efecto de la carga de la fase activa y promotor [Internet]. Fundación Universidad de América; 2019. Disponible en: <https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/7401/1/6132180-2019-1-IQ.pdf>

Lueangjaroenkit, P., Teerapatsakul, C., & Chitradon, L. (2018). Morphological characteristic regulation of ligninolytic enzyme produced by *Trametes polyzona*. *Mycobiology*, 46(4), 396-406.

M. Ajaz , S. Shakeel , A. Rehman Uso microbiano para la degradación de colorantes azoicos: una estrategia para la biorremediación de colorantes En t. *Microbiol. , 23 (2) (2020)* , págs. 149 - 159

Mani S, Bharagava RN. (2016) Exposure to Crystal Violet, Its Toxic, Genotoxic and Carcinogenic Effects on Environment and Its Degradation and Detoxification for Environmental Safety. *Rev Environ Contam Toxicol*. 2016;237:71-104. doi: 10.1007/978-3-319-23573-8_4. PMID: 26613989.

Merck. (n.d.). Violeta cristal (C.I. 42555). https://www.merckmillipore.com/CO/es/product/Crystal-violet-C.I.-42555,MDA_CHEM-101408

Morales-Álvarez, ED, Rivera-Hoyos, CM, Poveda-Cuevas, SA et al. Decoloración de verde malaquita y violeta cristal por *Ganoderma lucidum* y *Pleurotus ostreatus* sobrenadante y por concentrados rGILCC1 y rPOXA 1B: análisis de acoplamiento molecular. *Appl Biochem Biotechnol* 184 , 794–805 (2018). <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2560-y>

More, S. S., PS, R., Malini, S., & SM, V. (2011). Isolation, purification, and characterization of fungal laccase from *Pleurotus* sp. *Enzyme Research*, disponible en: <https://downloads.hindawi.com/archive/2011/248735.pdf>; consultado; 03/2022.

Múnera, John & Oquendo, Andrey & Rodríguez, Rocío & Marín, Gloria. (2017). Remoción de colorantes reactivos empleando el hongo *Bjerkandera adusta*. Informador Técnico. 81. 142. 10.23850/22565035.877.

Mustapha Yakubu Dauda, Emrah Ahmet Erkurt, Investigation of reactive Blue 19 biodegradation and byproducts toxicity assessment using crude laccase extract from *Trametes versicolor*, Journal of Hazardous Materials, Volume 393, 2020, 121555, ISSN 0304-3894, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121555>.

Nworie, F.S., Nwabue, F.I., Oti, W., Mbam, E., Nwali, B.U., 2019. Removal of methylene blue from aqueous solution using activated rice husk biochar: Adsorption isotherms, kinetics and error analysis. Journal of the Chilean Chemical Society 64(1), 4365-4376.

Osorio, Juliana, & Quintero, Juan Carlos. (2018). Decoloración del colorante industrial Turquesa Erionyl con el hongo de la pudrición blanca de la madera *Bjerkandera* sp. R1. Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia, 41(1), 32-40. Recuperado en 03 de octubre de 2022, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0254-07702018000100005&lng=es&tlng=es.

Pan, Y.; Wang, Y.; Zhou, A.; Wang, A.; Wu, Z.; Lv, L.; Li, X.; Zhang, K.; Zhu, T. Removal of azo dye in an up-flow membrane-less bioelectrochemical system integrated with bio-contact oxidation reactor. Chem. Eng. J. 2017, 326, 454–461.

Peluffo, Diego & Pereira, Ricardo. (2017). Empleo del estropajo común (*Luffa cylindrica*) en la remoción de contaminantes. Revista de Investigación Agraria y Ambiental. 8. 10.22490/21456453.1850.

Periasamy, D., Mani, S., Ambikapathi, R. (2019). Hongos de pudrición blanca y sus enzimas para el tratamiento de efluentes de tintes industriales. En: Yadav, A., Singh, S., Mishra, S., Gupta, A. (eds) Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi. Biología fúngica. Springer, Cham. https://doi-org.udea.lookproxy.com/10.1007/978-3-030-25506-0_4

Riegas-Villalobos A, Martínez-Morales F, Tinoco-Valencia R, Serrano-Carreón L, Bertrand B, Trejo-Hernández MR. Efficient removal of azo-dye Orange II by fungal biomass absorption and laccase enzymatic treatment. 3 Biotech. 2020 Apr;10(4):146. doi: 10.1007/s13205-020-2150-5. Epub 2020 Mar 2. PMID: 32181108; PMCID: PMC7052085.

Robinson T, McMullan G, Marchant R, Nigam P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. Bioresour Technol. 2001 May;77(3):247-55. doi: 10.1016/s0960-8524(00)00080-8. PMID: 11272011.

Salas-Veizaga, Daniel & Morales Belpaire, Isabel & Terrazas-Siles, E.. (2012). Capacidad decolorativa de *Corioloopsis polyzona*, *Pycnoporus* sp. y *Penicillium* sp. sobre Reactive Black 5 a diferentes condiciones de cultivo. BIOFARBO. 20. 41-48.

Sen SK, Raut S, Bandyopadhyay P, Raut S. Fungal decolouration and degradation of azo dyes: A review. Fungal Biol Rev [Internet]. 2016;30(3):112–33. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2016.06.003>

Soto-Arroyave, Claudia Patricia , & Gómez-Andrade, William Edisson , & Pineda-Soto, Camilo Alejandro , & Duarte-Trujillo, Astrid Stefanía , & Mora-Muñoz, Elsa Sulay , & Fierro-Ramos, Fernando Javier , & Álvarez-Ramos, Sandra Elizabeth , & Pineda-Insuasti, Julio Amilcar (2017). Producción de *Pycnoporus spp.* y sus metabolitos secundarios: Una revisión. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, 51(2),60-69.[fecha de Consulta 7 de

Septiembre de 2022]. ISSN: 0138-6204. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223154251010>

Sunita Varjani, Parita Rakholiya, How Yong Ng, Siming You, Jose A. Teixeira, Microbial degradation of dyes: An overview, *Bioresource Technology*, Volume 314, 2020, 123728, ISSN 0960-8524, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123728>.

Tripathi, A., Upadhyay, R.C. & Singh, S. Extracellular Ligninolytic Enzymes in *Bjerkandera adusta* and *Lentinus squarrosulus*. *Indian J Microbiol* 52, 381–387 (2012). <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0232-0>

Vares T, Kalsi M, Hatakka A. Lignin Peroxidases, Manganese Peroxidases, and Other Ligninolytic Enzymes Produced by *Phlebia radiata* during Solid-State Fermentation of Wheat Straw. *Appl Environ Microbiol*. 1995 Oct;61(10):3515-20. doi: 10.1128/aem.61.10.3515-3520.1995. PMID: 16535139; PMCID: PMC1388701.

Wang, S., Li, W., Liu, L., Qi, H. y You, H. (2022). Biodegradación de decabromodifenil etano (DBDPE) por el hongo de la podredumbre blanca *Pleurotus ostreatus*: características, mecanismos y respuesta toxicológica. *Diario de materiales peligrosos*, 424, 127716.

Zuleta-Correa, A., (2013). Evaluación del proceso de degradación de un colorante sintético tipo azo mediante un sistema de fermentación en estado sólido. Tesis. Facultad de Minas, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.