

**Producción de microesferas de *Pleurotus ostreatus* en medios de cultivos modificados
para la remoción de cobre en aguas sintéticas**

Autores:

Reyes gamarra aldair José

Vargas vaca valentina de los ángeles

**FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA
UNIVERSIDAD POPULAR DEL CESAR**

VALLEDUPAR – 20224

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	6
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	8
1. PROBLEMA EN ESTUDIO	19
1.1. Título del estudio	11
1.2. Planteamiento del problema	11
1.3. Justificación	13
1.4. Objetivos	14
2. MARCO TEÓRICO	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
2.1 Marco conceptual	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
2.2 Antecedentes.....	¡Error! Marcador no definido.
2.3 Bases teóricas.....	¡Error! Marcador no definido.
2.3.1 Características biológicas del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> en fase micelial.	¡Error! Marcador no definido.
2.3.2 Taxonomía.....	¡Error! Marcador no definido.
2.3.3 Distribución geográfica	27
2.3.4 Remoción de metales pesados a partir de especies fungicas	28
2.3.5 El cobre como inductor de enzimas lacasas.....	28
2.3.6 Formación de microesferas por parte de <i>Pleurotus ostreatus</i>	29
2.4 Bases legales.....	29
3. METODOLOGÍA	15
3.1. Tipo de estudio, línea de investigación.....	15
3.2. Hipótesis nula, hipótesis alterna	15
3.3. Variables y operacionalización	15
3.4 Diseño metodologico	32
3.4.1 Obtención de la cepa, condiciones de cultivo y diseño de los medios de cultivo	33

3.4.2	Tolerancia del cobre por medio de <i>P. ostreatus</i> en tres medios de cultivo comerciales	33
3.4.3	Determinación de la composición del medio de cultivo modificado para la producción de las microesferas de <i>P. ostreatus</i>	33
3.4.4	Medida de la actividad lacasa.....	34
3.4.5	Producción de biomasa	34
3.4.6	Determinación de la remoción de cobre en aguas sintéticas por microesferas de <i>P. ostreatus</i>	34
3.4.7	Cuantificación espectrofotométrica de cobre	35
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
4.1	Evaluación de tolerancia de <i>Pleurotus ostreatus</i> en tres medios de cultivos comerciales	20
4.2	Determinación de la composición del medio de cultivo para la producción de microesferas de <i>Pleurotus ostreatus</i>	38
4.3	Actividad lacasa en el tiempo	39
4.4	Actividad lacasa máxima	40
4.5	Producción de biomasa en medios de cultivo líquidos	41
4.6	Liberación de cobre por la biomasa producida en diferentes medios de cultivos tratadas con cobre 1.0 mM	42
5	CONCLUSIONES	27
6	RECOMENDACIONES.....	28
7	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tolerancia de <i>Pleurotus ostreatus</i> a diferentes concentraciones de cobre en medios de cultivo comerciales.	36
Figura 2. Actividad lacasa en diferentes concentraciones del medio de cultivo MGY (Glucosa; Extracto de levadura).	38
Figura 3. Actividad lacasa presentada en el día 6, 9 y 12.	38
Figura 4. Grafica de contorno de Log AL(UL) vs extracto de levadura y glucosa.	40
Figura 5. Grafica de contorno de biomasa seca vs extracto de levadura y glucosa.	41
Figura 6. Grafica de contorno de concentración de cobre vs extracto de levadura y glucosa.	42

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Pleurotus ostreatus</i>	27
Tabla 2. Medios de cultivos con glucosa y extracto de levadura	33

ANEXOS

Anexo 1. Tolerancia de cobre de <i>Pleurotus ostreatus</i> en 3 medios de cultivo comerciales. _____	50
Anexo 2. Montaje experimental #1 y montaje experimental #2 _____	51
Anexo 3. Análisis estadístico _____	55

RESUMEN

Se planteó la búsqueda in vitro de condiciones que favorecieron la remoción de cobre por *Pleurotus ostreatus*, ya que se conoce que es utilizado como biorremediador de metales pesados, sin embargo, poco se ha estudiado de esta capacidad relacionada con los medios de cultivos en los que se cultiva el hongo. Es un hongo de podredumbre blanca que produce microesferas en cultivos sumergidos. A partir de esto se plantea la siguiente pregunta de investigación ¿La remoción de cobre por las microesferas de *Pleurotus ostreatus* está determinada por la composición del medio de cultivo? Para el estudio se utilizó una cepa comercial del hongo y se evaluó la tolerancia en tres medios de cultivo comerciales (OGYE, SABOURAUD y PDA), se planteó un diseño central compuesto con dos variables, (glucosa, extracto de levadura) en presencia de cobre para encontrar la composición que permitiera la producción de microesferas y que tuviera la máxima actividad lacasa, que se usó como un marcador del ingreso del cobre al interior del hongo. La medida de la actividad lacasa se hizo espectrofotométricamente al igual que la medida de la remoción de cobre. La medida de la producción de biomasa se determinó por gravimetría. Los resultados mostraron que el medio de cultivo afectó la actividad lacasa inducida por cobre y se encontró la composición con el mayor potencial para la remoción de cobre que fue de composición de 23,8 g/L de glucosa y 15 g/L de extracto de levadura, mostrando un pico de actividad lacasa de aproximadamente 26.000 U/L a los nueve días de incubación. Por otro lado, se evidenció una mayor producción de biomasa en el punto central que correspondió a 45 g/L de glucosa y 15 g/L extracto de levadura. Lo que permite concluir que la remoción de cobre está determinada por la composición del medio de cultivo.

Palabras clave: Biorremediación, biotransformación, lacasa.

ABSTRACT

In vitro search for conditions that favored the removal of copper by *Pleurotus ostreatus* was proposed, since it is known that this fungus is used as a bioremediator of heavy metals, however, little has been studied of this capacity related to the culture media in which the fungus is grown. *P. ostreatus* is a white rot fungus that produces microspheres in submerged cultures. From this, the following research question is posed Is the removal of copper by the microspheres of *Pleurotus ostreatus* is determined by the composition of the culture medium? A commercial strain of the fungus was used for the study and evaluated tolerance in three commercial culture media (OGYE, SABOURAUD and PDA), a central design was proposed compound with two variables, (glucose, yeast extract) in the presence of to find the composition that would allow the production of microspheres and that had maximum laccase activity, which was used as a was composed of 23.8 g/L of glucose and 15 g/L of yeast extract, showing a peak of laccase activity of approximately 26,000 U/L at nine days of incubation. On the other hand, a higher production of biomass was evidenced in the central point that corresponded to 45 g/L of glucose and 15 g/L extract of yeast. This allows us to conclude that the removal of copper is determined by the composition of the culture medium.

Keywords: Bioremediation, biotransformation, laccase.

INTRODUCCIÓN

La contaminación por metales pesados es uno de los problemas ambientales con mayor extensión en el mundo. Los metales pesados como el cadmio, el cobre, el plomo y el mercurio, se caracterizan por su densidad superior a 5 g/cm³. La minería, fundición y otras actividades económicas son la principal fuente de contaminación por metales pesados que pueden generar riesgos si entran en la atmósfera, el suelo o el agua. Para eliminar la amenaza de los metales pesados se han aplicado varios enfoques, incluida la remediación física, la remediación química y la remediación biológica. La remediación física incluye el intercambio iónico, adsorción entre otros métodos, la química métodos electroquímicos y precipitación con procesos redox. A diferencia de los métodos físicos y químicos, la remediación biológica o biorremediación encabezada por la remediación microbiana es una opción eficaz y amigable con el medio ambiente que han utilizado y han obtenido buenos resultados (Zhuo y Fan, 2021).

La vocación del uso del suelo en el Cesar a dado un giro inesperado llevándolo de un suelo destinado a actividades agropecuarias a una explotación por la industria de la minería de carbón en los últimos años según los datos del Departamento administrativo Nacional de estadística - DANE (2021). La presión que ejerce la industria al recurso hídrico del departamento va en aumento. Dicha presión se ve manifestada de dos maneras, por un lado, la actividad minera requiere grandes cantidades de agua provenientes de fuentes superficiales o subterráneas y por otro lado estas actividades incrementan el riesgo de contaminación por el lavado de metales pesados en los efluentes generados por la industria. De acuerdo al estudio Nacional del agua (ENA-2020), este escenario tiene un impacto negativo en la calidad del agua, limitando su uso para el consumo humano corriente abajo del

efluente industrial además que se han encontrado aumentos en el depósito de metales pesados en los sedimentos del lecho de los ríos (Hernández, 2020). El departamento del Cesar está en una alerta ambiental por la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales (ANLA) la cual por medio del informe “Actualización Reporte de Análisis Regional de la Zona Minera del Cesar de diciembre de 2021” advierte sobre el aumento en la concentración de metales pesados por efluentes de la industria minera en la zona en el arroyo para luz ubicado a 6km de la mina el descanso y 10 km de la mina calenturitas (ANLA, 2021). Si bien el reporte no indica las concentraciones de metales pesados en el cuerpo hídrico nacionalmente se ha evidenciado que los vertimientos y lavados de metales pesados generados por las unidades productivas mineras (UPM) de carbón, superan los límites permisibles de varios metales pesados, según la Resolución 631 de 2015, entre estos el cobre con reportes alarmantes de concentraciones en vertimientos que alcanzan las 9 ppm según informes de las autoridades ambientales de la zona (ANM y UNC, 2015) Además en sedimentos hay reportes de 46 g de Cu/Kg (Argumedo C, 2021). La información anterior muestra el alto riesgo al que están expuestas las personas que se abastecen del recurso hídrico contaminado por metales pesados por efluentes de la industria minera. Además, la transición del modelo energético proveniente de combustibles fósiles a energías alternativas como batería y fuentes eléctricas incrementa la demanda de minerales como el cobre (Semana, 2022). Por estas demandas, en el departamento, la Agencia Nacional de Minería (ANM) ha concedido unos contratos con permisos para la exploración y explotación de minas de cobre (ANM, 2022), lo cual aumenta el riesgo de contaminación de fuentes hídricas, cabe mencionar que el cobre se bioacumula y se biomagnifica en fuentes proteicas como los peces que son alimento para gran parte de la población del Departamento del Cesar.

1. PROBLEMA EN ESTUDIO

1.1. Título del estudio

Producción de microesferas de *Pleurotus ostreatus* en medios de cultivos modificados para la remoción de cobre en aguas sintéticas.

1.2. Planteamiento del problema

El cobre (Cu) a bajas concentraciones es esencial para la dieta de los organismos, sin embargo, a altas concentraciones es peligroso debido a su bioacumulación en la cadena trófica, llevando a un problema de salud pública. (Espejo, 2014).

Estos metales, sin embargo, son ampliamente utilizados en diferentes procesos tecnológicos y llegan a diferentes fuentes de agua como resultado de aguas residuales deficientemente tratadas, del escurrimiento de la ciudad y del resultado de procesos mineros o ya sea por fuentes naturales (Roca Guzmán et al, 2021). Estudios en el Departamento del Cesar han logrado establecer una alarma sobre el riesgo, por parte de la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales (ANLA), por lo cual advierte sobre el expediente “LAM0027 Explotación Carbonífera Mina La Loma” ordenando que se deben analizar con prioridad la calidad del agua en el arroyo Paraluz, por creerse que existe un aumento en la concentración de Arsénico, Cobre, Mercurio y plomo, debido a la descarga de agua residual de dicha explotación LAM0027 (Antunes C et al, 2021)

Por consiguiente, reportes a nivel nacional vienen demostrando que las concentraciones de metales pesados encontradas en aguas de cuerpos receptores de vertimientos mineros, alcanzan concentraciones altas de algunos metales pesados con base al reglamento en la Resolución 631 de 2015. En el estudio Nacional de Agua (ENA, 2020)

dichas concentraciones fueron más altas para el cadmio con 2.9 y el cobre con 8.5 mg/L (Doria et al, 2018). Siendo el cobre uno de los metales con mayor concentración en las aguas contaminadas. Lo anterior demuestra un riesgo para la salud siempre y cuando no se busquen alternativas para la remoción de este metal en las fuentes de agua. El problema se podría agudizar, porque, aunque se esté optando por alternativas que ayuden a un desarrollo sostenible, podemos evidenciar que para la producción de energías alternativas a los combustibles fósiles es necesario la producción de materiales formados por metales pesados conductores como el cobre a nivel mundial (Semana, 2022). De acuerdo al aumento en la demanda del metal en el Departamento del Cesar, la Agencia Nacional de Minería, ANM, ha realizado contratos para la exploración y explotación de minas de cobre, lo que a su vez indica aumento en el riesgo de la contaminación de fuentes hídricas. En el siguiente estudio se planteó la búsqueda in vitro de condiciones que favorezcan la remoción de cobre por parte de *Pleurotus ostreatus*, ya que se conoce que este hongo es utilizado como biorremediador de metales pesados gracias a la producción de enzimas lacasas; Sin embargo, no se había estudiado esta capacidad relacionada con la composición del medio de cultivo en los que se coloca a crecer el hongo. A partir de esta problemática, se planteó la siguiente pregunta de investigación: ¿La remoción de cobre por microesferas de *Pleurotus ostreatus* está determinada por la actividad de enzimas lacasa inducida por cobre y cambios en la composición del medio de cultivo?

1.3. Justificación

El agua es esencial para la vida y puede contener sustancias tóxicas debido a la contaminación natural o actividades humanas como la explotación de minerales. Los metales como el mercurio, el cadmio y el plomo, son algunos de los contaminantes más tóxicos presentes en el agua. Aunque otros metales son esenciales como el zinc, el cobalto, el cobre, el hierro y el selenio (Zaynab Madiha et al, 2022).

El consumo de agua contaminada a altas concentraciones con cobre puede tener efectos negativos en la salud humana, como lo menciona Mitra Saikat et al, 2022 en su artículo denominado “Impacto de los metales pesados en el medio ambiente y la salud humana: nuevos conocimientos terapéuticos para contrarrestar la toxicidad” tales efectos como daños hepáticos y renales, o problemas neurotóxicos, efectos cancerígenos, daños en la piel, el sistema inmunológico, a nivel reproductivo, así como teratogenicidad y genotoxicidad. Por consiguiente, un estudio que busque formas eficientes de remover cobre del agua es pertinente para mejorar la seguridad del agua y proteger la salud de las comunidades.

Para obtener resultados viables en cuanto a la razón costo/beneficio se realizaron ensayos in vitro con aguas sintéticas correspondientes a sales minerales con una adición de sal de cobre en concentraciones conocidas donde se determinaron los modelos cinéticos y dilucidar los mecanismos de remoción asociados a la biosorción, bioacumulación o

biotransformación. Además, se logró establecer que la capacidad de remoción de cobre del hongo *P. ostreatus* está ligada a los transportadores de cobre asociados a la membrana, la cual fue medida indirectamente por el incremento de la actividad lacasa del hongo.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Determinar la formulación del medio de cultivo para producir microesferas de *Pleurotus ostreatus* con la mayor actividad lacasa para la remoción de cobre en aguas sintéticas.

1.4.2. Objetivos específicos

- Evaluar la tolerancia al cobre por parte de *Pleurotus ostreatus* en medios de cultivo micológicos con diferentes formulaciones de carbono y nitrógeno.
- Determinar la composición y concentración del medio sintético que incremente la actividad de lacasas inducidas por cobre mediante la metodología de superficie respuesta.
- Establecer la composición del medio de cultivo sintético donde ocurre la mayor remoción de cobre por parte de *Pleurotus ostreatus*.

2. METODOLOGÍA

3.1. Tipo de estudio, línea de investigación

La investigación es de tipo “experimental” ya que, una variable es manipulada para determinar su efecto sobre una variable dependiente.

La presente investigación será de nivel “aplicado” puesto que, se emplean instrumentos de medición para registrar los procesos que se generen al manipular una de las variables.

Diseño de investigación: la investigación tiene un diseño experimental.

Esta investigación se encuentra en el campo de la biotecnología en la línea de investigación Bioprospección del programa de Microbiología.

Localización: Los procedimientos experimentales fueron realizados en los laboratorios de Microbiología del grupo de investigación Biotecnología y genotoxicidad (Biotecgen) de la Universidad Popular del Cesar.

3.2. Hipótesis nula, hipótesis alterna

Hipótesis nula. La composición del medio de cultivo no afecta la actividad lacasa que promueve la remoción de cobre en agua sintética.

Hipótesis alternativa. La composición del medio de cultivo afecta la actividad lacasa que promueve la remoción de cobre en agua sintética.

3.3. Variables y operacionalización

Variable independiente: Glucosa y extracto de levadura.

Variable dependiente: Biomasa, actividad lacasa y remoción de cobre.

3.4 Diseño Metodológico

El desarrollo de esta investigación se realizó a partir de las siguientes etapas; primera etapa: la activación de la cepa y la evaluación de la tolerancia del cobre en tres medios de cultivos comerciales. Se realizó un diseño central compuesto basándonos en los resultados de la tolerancia de cobre en diferentes medios. Segunda etapa: montaje #1 experimental correspondiente a 13 medios de cultivos con diferentes concentraciones como se muestra en la **Tabla 2** e ilustrado en el **Anexo 2** basándonos en el DCC para determinar la producción de enzimas lacasas en los medios de cultivo. Tercera etapa: montaje #2 experimental ilustrado en el **Anexo 2** donde se inocularon 13 medios de cultivos con la razón 1:5 de biomasa fúngica en solución de cobre a 30 mM donde se evaluó la capacidad de las microesferas de remover cobre del medio, para conocer la remoción de cobre se hizo de manera indirecta por espectrofotometría UV-VIS.

3.4.1 Obtención de la cepa, condiciones del cultivo y diseño de los medios de cultivo.

Se usó una cepa comercial de *Pleurotus ostreatus* adquirida en Setas Merlí, una réplica de esta cepa fue mantenida en agar extracto de malta a 4°C antes de cada experimento, la cepa fue replicada en el mismo agar, incubada a 25°C en oscuridad durante 8 días. Los inóculos consistieron en discos de agar de 4 mm de diámetro tomado del área de crecimiento periférico del hongo incubado a 25°C durante ocho días en agar extracto de malta, cada disco de agar con micelio fue usado para inocular 20 mL de medio de cultivo líquido.

3.4.2 Tolerancia del cobre por medio de *P. ostreatus* en tres medios de cultivos comerciales.

Se sembraron discos de 4 mm de la cepa de *P. ostreatus* en agar Sabouraud, OGYE y PDA con una solución de cobre en concentraciones de 0 mM, 3 mM, 5 mM y 10 mM por duplicado, incubada a 37 °C durante 7 días donde se midió el diámetro los días 0, 3 y 7.

3.4.3 Determinación de la composición del medio de cultivo modificado para la producción de las microesferas de *P. ostreatus*.

La determinación de la composición que incremente la actividad lacasa por cobre fue establecida a partir de los análisis estadísticos de los datos evaluados de las composiciones presentadas en la siguiente **Tabla 2**, según lo establecido por Durán Sequeda et al., (2021) a través de un Diseño de superficie respuesta, Diseño Central Compuesto.

Nombre del medio de cultivo	Glucosa (gL ⁻¹)	Extracto de levadura (gL ⁻¹)
GY 3008	30.0	7.5
GY 6008	60.0	7.5
GY 3023	30.0	22.5
GY 6023	60.0	22.5
GY 2415	23.8	15.0
GY 6215	66.2	15.0
GY 4504	45.0	4.4
GY 4526	45.0	25.6
GY 4515	45.0	15.0
GY 4515	45.0	15.0
GY 4515	45.0	15.0
GY 4515	45.0	15.0
GY 4515	45.0	15.0

Tabla 2. Medios de cultivos con glucosa y extracto de levadura.

Los cultivos se prepararon con 60 mL de medio estéril de la composición mostrada en la **Tabla 2** en Erlenmeyer de 125 mL. Para la inducción de lacasas por cobre, a cada medio se le adiciono sulfato de cobre pentahidratado para que la concentración de cobre sea 1 mM. Todos los medios de cultivo fueron inoculados con 3 discos de agar que contienen micelio de *P. ostreatus* e incubados a 25°C, 150 rpm durante 12 días. Cada tres días se tomó una muestra de la fase líquida del medio de cultivo de forma estéril para determinar la actividad de

lacasa.

3.4.4 Medida de la actividad lacasa

La medición de esta variable respuesta es una medida indirecta de la capacidad que tiene el hongo del transporte intracelular del cobre. Una unidad lacasa transforma 1 μmol de sustrato por minuto por unidad de volumen, y se expresa como UL^{-1} (Wang L, 2021).

Conociendo esto la actividad lacasa se determinó espectrofotométricamente usando ABTS (2,2-azinobis [3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid]) 1 mM como sustrato de la enzima en buffer de acetato de sodio pH 5.0 de acuerdo con el estudio de González J et al., (2013).

3.4.5 Producción de biomasa

La biomasa se midió por métodos gravimétricos, para esto se tomó un volumen específico de la muestra y se filtraron usando papel filtro secado y pesado previamente. El papel con el retenido fue secado a 80°C durante 24h (Saúl Tlecuítl Beristain, 2008).

3.4.6 Determinación de la remoción de cobre en aguas sintéticas por microesferas de

P. ostreatus

Para determinar la capacidad de remoción de cobre en aguas sintéticas por microesferas de *P. ostreatus*, cada experimento con un volumen en razón 1:5 mL del agua sintética consistió en agua destilada desionizada con una sal divalente de cobre (sulfato de cobre pentahidratado) a una concentración de 30 mM, que serán tratadas con la razón equivalente en gramos de biomasa por ml de solución de cobre a 30 mM de 1:5 e incubadas a 25°C, en condiciones de agitación 150 rpm durante 72 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, las esferas fueron separadas de la solución por filtración y se midió la concentración de cobre en la fase líquida espectrofotométricamente.

3.4.7 Cuantificación espectrofotométrica de cobre

La cuantificación espectrofotométrica del cobre en aguas sintéticas tratadas con *P. ostreatus* y soluciones de referencia se realizó utilizando espectrofotometría UV/vis con una longitud de onda a 670 nm según la técnica utilizada por Acevedo L. (2023). Conociendo esto la concentración de cobre se cuantificó por medio de una curva de calibración con concentraciones de 10 a 100 mM. Se extrajeron alícuotas de 1 ml de cada solución y se midió por medio de espectrofotometría UV/vis en la hora 0, 24, 48 y 72 de la exposición de las microesferas a concentraciones de 30 mM de cobre.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Evaluación de tolerancia de *Pleurotus ostreatus* en tres medios de cultivos comerciales

Al evaluar la tolerancia de *Pleurotus ostreatus* a diferentes concentraciones de cobre en tres medios de cultivos micológicos comerciales (OGYE, Sabouraud, PDA), se encontró que dicha tolerancia del hongo al cobre depende directamente de la composición del medio de cultivo (Figura 1.)

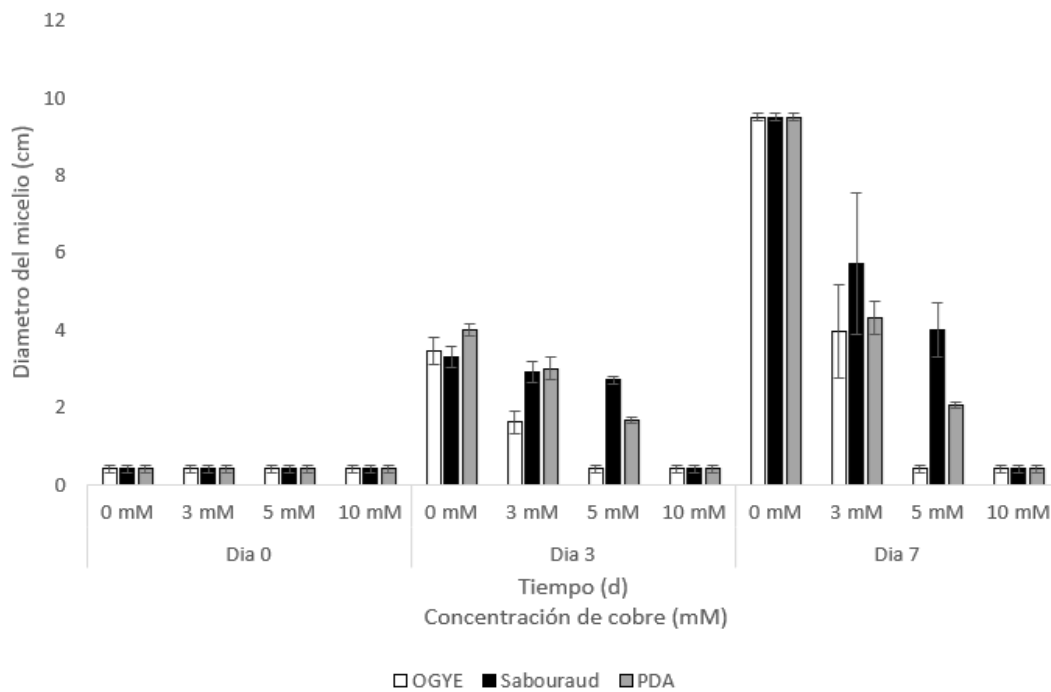


Figura 1. Tolerancia de *Pleurotus ostreatus* a diferentes concentraciones de cobre en medios de cultivos comerciales.

En la gráfica se observa la tolerancia del hongo *Pleurotus ostreatus* a diferentes

concentraciones de cobre en los medios OGYE, PDA y Sabouraud en los días 0, 3, y 7 de cultivo. En el día 3 se observa que el hongo en el medio OGYE no fue capaz de tolerar concentraciones de 5 mM de cobre, sin embargo en el medio PDA y Sabouraud hubo crecimiento micelial, en el medio Sabouraud se comportó de manera similar en los cultivos con 0, 3 y 5 mM, a diferencia del crecimiento en el medio PDA donde se vio más afectado el crecimiento, en los medios sometidos a una concentración de 10 mM no hubo crecimiento micelial suponiendo que el hongo no es capaz de tolerar dicha concentración de cobre. En el día 7 de cultivo el hongo tuvo un crecimiento de 5,7 cm en el medio Sabouraud expuesto a concentraciones de 3 mM a diferencia del medio PDA que a la misma exposición tuvo un crecimiento micelial de 4,3 cm y el medio OGYE con un crecimiento menor de 3,9 cm, sin embargo, el medio Sabouraud tuvo un crecimiento de 4 cm en una exposición de 5 mM demostrando una tolerancia significativa al cobre a dicha concentración. En comparación al estudio realizado por Gao X. et al (2024) donde la cepa GEMB-PO1 de *Pleurotus ostreatus* registró resultados de tolerancia a concentraciones de cobre a 6 mM utilizando un medio GYP a diferencia del MGY utilizado en el estudio que tiene una fuente de nitrógeno (extracto de levadura) el GYP tiene dos fuentes de nitrógeno (Peptona, Extracto de levadura). De igual manera el umbral de tolerancia a metales pesados es diferente depende del género, la especie e incluso la cepa del hongo (Carrillo et al, 2012).

4.2. Determinación de la composición del medio de cultivo para la producción de microesferas de *Pleurotus ostreatus* y su actividad lacasa

Los resultados obtenidos de la actividad enzimática de los 13 medios de cultivo demuestran que el medio MGY 2415 (Medio glucosa – extracto de levadura, 23,8 g y 15 g respectivamente) presentó la actividad lacasa máxima en el día 9, (**Figura 2**) siendo así la composición óptima para la producción de microesferas ya que requiere una menor cantidad de sustratos y obtiene mejores resultados en menor tiempo que los otros sistemas.

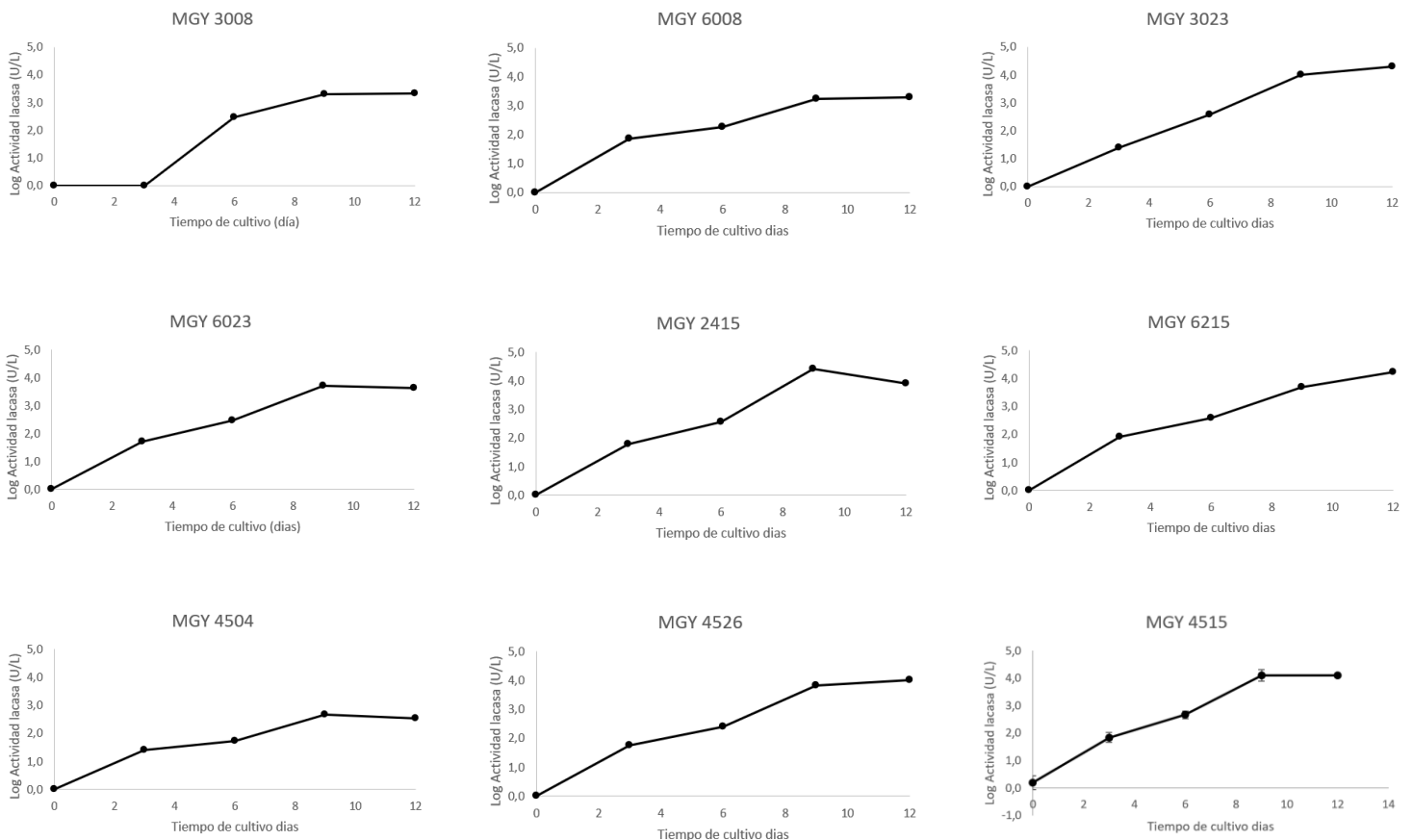
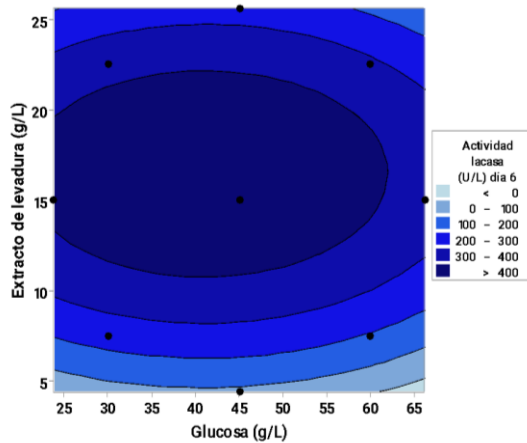


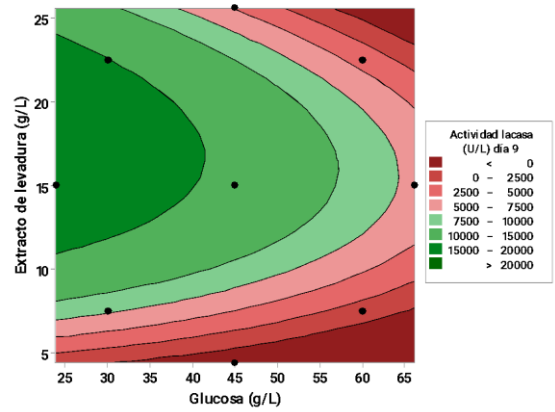
Figura 2. Actividad lacasa en diferentes concentraciones del medio de cultivo MGY (Glucosa; Extracto de levadura).

4.3. Actividad lacasa en el tiempo.

Gráfica de contorno de Actividad lacasa día 6 vs. Extracto de levadura (g/L); GI



Gráfica de contorno de Actividad lacasa día 9 vs. Extracto de levadura (g/L); GI



Gráfica de contorno de Actividad lacasa día 12 vs. Extracto de levadura (g/L); GI

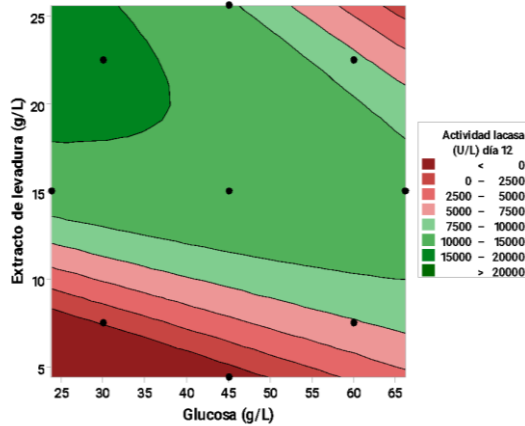


Figura 3: Actividad lacasa presentada en los días 6, 9 y 12.

La **Figura 3** presenta la actividad de enzimas lacasas del hongo en el tiempo. En el día 6 no se nota diferencia en el contorno puesto que la actividad no ha llegado a su pico y registra valores entre 50 UL^{-1} hasta 750 UL^{-1} siendo esta la actividad máxima en el día 6. En el día 9 se observó la actividad lacasa máxima en medio MGY 2415 teniendo una actividad de 25709 UL^{-1} . En el día 12 hubo un desplome en la producción de enzimas en comparación al día 9 sin embargo en estudios como el de Perez Montiel y colaboradores (2021), demuestran que la cinética de la curva de producción de enzimas lacasas por parte del hongo *Pleurotus*

ostreatus tiene varios picos en diferentes momentos del cultivo.

4.4. Actividad lacasa máxima

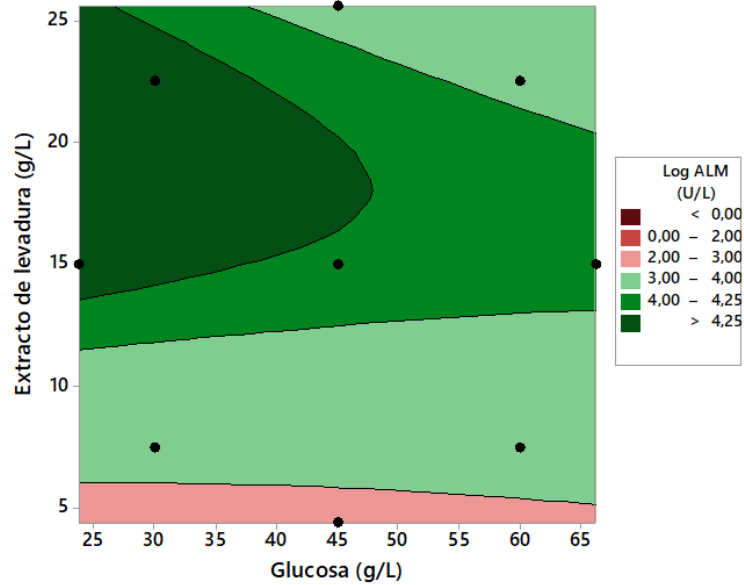


Figura 4. Gráfica de contorno de Log AL(UL) vs extracto de levadura y glucosa.

La gráfica muestra que la máxima expresión de enzimas lacasas se da en una relación se dio en los medios MGY 2415 y en el medio MGY 3023.

4.5. Producción de biomasa en medios de cultivo líquidos.

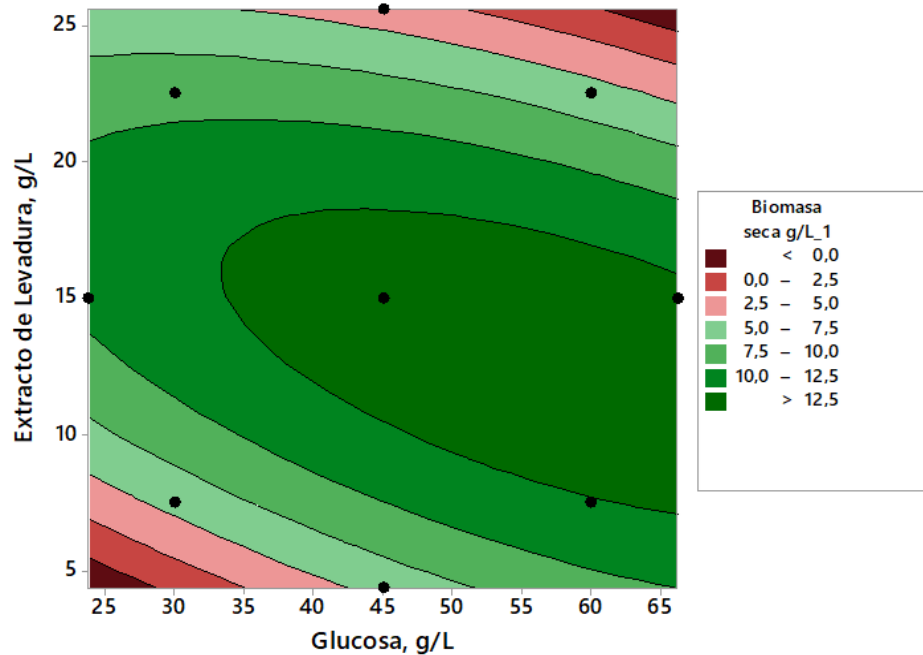


Figura 5. Gráfica de contorno de biomasa seca vs extracto de levadura y glucosa.

En la gráfica se evidencia el cambio de la biomasa, mientras la glucosa tiene poco efecto, el extracto de levadura es más influyente. El punto central siendo el medio MGY 4515 sería el óptimo para la producción de biomasa

4.6. Liberación de cobre por la biomasa producida en diferentes medios de cultivos tratadas con cobre 1.0 mM

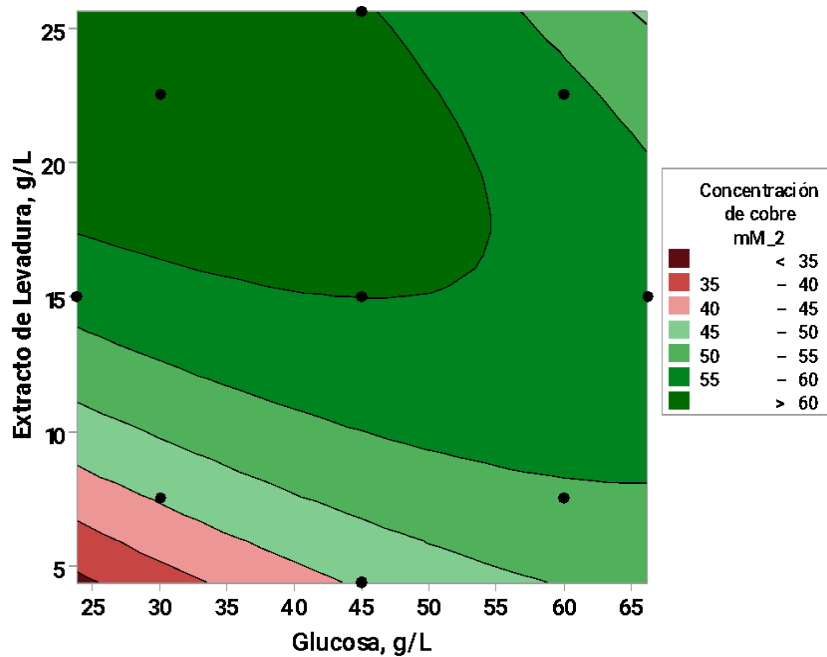


Figura 6. Gráfica de contorno de concentración de cobre vs extracto de levadura y glucosa para concentración de cobre.

En la gráfica se observa un aumento en la concentración de cobre en los sistemas que tienen mayor concentración de extracto de levadura, específicamente en el medio MGY 3023.

Sin embargo, el objetivo del análisis es demostrar la remoción de cobre de manera indirecta por medio de la desorción del cobre extraído en el montaje 1 (**Tabla 2**) mostrando un aumento en la concentración de cobre de 30 mM hasta 60 mM. Relacionando el resultado de la **Figura 4** con el de la **Figura 3** nos muestra que a mayor actividad lacasa mayor la desorción de cobre por parte del hongo, denotando indirectamente que a mayor actividad lacasa es mayor la remoción de cobre en el medio.

4. CONCLUSIONES

Pleurotus ostreatus es tolerante a concentraciones de hasta 5 mM de cobre, lo que indica que el hongo es apto para remediación de cuerpos hídricos contaminados con metales pesados por efluentes de la industria minera.

La composición del medio de cultivo define la capacidad de remoción de cobre del hongo *Pleurotus ostreatus*.

El extracto de levadura tiene un efecto significativo en la producción de enzimas lacasas, biomasa y remoción de cobre por parte del hongo *Pleurotus ostreatus*, a diferencia de la glucosa.

La actividad de enzimas lacasas y la desorción de cobre en soluciones concentradas son métodos indirectos para determinar la remoción de cobre por parte del hongo *Pleurotus ostreatus*.

5. RECOMENDACIONES

Se recomienda considerar la evaluación de remoción de cobre con otras cepas de *Pleurotus* sp ya que se ha evidenciado otros estudios donde los medios de cultivo varían en la composición que necesita el hongo para alcanzar la actividad lacasa máxima.

Dada la biología del hongo al crecer en ambientes húmedos y temperaturas moderadas se recomienda que si se trabaja en climas cálidos a temperaturas generalmente altas se debe repicar para poder adaptarlo.

Para obtener resultados más precisos y confiables se recomienda medir la concentración de cobre por medios directos como la Espectroscopía de Absorción Atómica (AA).

6. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Acevedo-León, D., Ossa-Orozco, C. P., & Torres-López, A. M. (2023). Evaluación de protocolos de síntesis de nanopartículas de cobre u óxidos de cobre. *Ingeniería*, 28(2).
- Agencia Nacional de Minería. (2022). ANM adjudicó cuatro nuevas Áreas Estratégicas Mineras de Cobre y Polimetálicos a la empresa Colombia Gold S.A.S. Agencia Nacional de Minería ANM.
- ANLA. (2021). Actualización Reporte de Análisis Regional de la Zona Minera del Cesar.
- Antunes, C., Alves, R., Talaia, G., Casal, M., Gerós, H., Mans, R., & Paiva, S. (2021). Actualización Reporte de Análisis Regional de la Zona Minera del Cesar. ANLA.
- Argumedo, C. D. (2021). Bioconcentración de metales pesados (Zn, Hg, Pb) en tejidos de *Ariopsis felis* y *Diplodus annularis* en el río Ranchería, norte de Colombia. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 68(2), 124-136.
- Bermúdez-Savón, R. C., García-Oduardo, N., Aguilera-Rodríguez, I. A., & Mendoza-Montero, Y. (2023). Biodegradación de residuos lignocelulósicos secundarios por *Pleurotus* spp. *Tecnología Química*, 43(1), 157-172. Epub 25 de enero de 2023.
- Careaga, M. G. J. (2014). Superficies de respuesta mediante un diseño central compuesto. *Revista Varianza*, 31-36.
- Carrillo-González, R., & González-Chávez, M. D. C. A. (2012). Tolerancia y acumulación de cadmio por el micelio de los hongos *Scleroderma citrinum* y *Pisolithus tinctorius*. *Biological Trace Element Research*, 146, 388-395.
- Departamento Administrativo Nacional de Estadística - DANE. (2021). Cuentas nacionales departamentales: PIB por departamento. <https://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/cuentas-nacionales/cuentas-nacionales-departamentales>
- Doria Argumedo, J. Gómez Sierra, and J. Marrugo Negrete, (2018)“Metales en sedimento del río Ranchería, La Guajira,” *Bistua Rev. La Fac. Ciencias Basicas*, vol. 16, no. 2, pp. 64–68.
- Durán-Sequeda, D., Suspes, D., Maestre, E., Alfaro, M., Pérez, G., Ramírez, L., ... & Sierra, R. (2021). Effect of nutritional factors and copper on the regulation of laccase enzyme production

in *Pleurotus ostreatus*. Journal of Fungi, 8(1), 7.

- Dusengemungu, L., Kasali, G., Gwanama, C. y Ouma, KO (2020). Avances recientes en la biosorción de cobre y cobalto por hongos filamentosos. *Frontiers in Microbiology*, 11, 58, 2016.
- Espejo, M. R. R. (2014). Bioacumulación de cobre en *Chondracanthus chamissoi* de la zona intermareal de Salaverry, Trujillo-Perú. *REBIOL*, 34(2), 13-20.
- Gao, X., Wei, M., Zhang, X., Xun, Y., Duan, M., Yang, Z., ... & Zhuo, R. (2024). Copper removal from aqueous solutions by white rot fungus *Pleurotus ostreatus* GEMB-PO1 and its potential in co-remediation of copper and organic pollutants. *Bioresource Technology*, 395, 130337.
- García-Oduardo, N., Bermúdez-Savón, R. C., Téllez-Suarez, I., Chávez-Toledano, M., & Perraud-Gaime, I. (2017). Enzimas lacasa en inóculos de *Pleurotus spp.* *Tecnología Química*, 37(1), 33-39.
- Gómez Delgado, N. M., & Sánchez Cuesta, T. C. (2020). Revisión de eficiencia de hongos ligninolíticos en la biodegradación y adsorción de los metales pesados en aguas residuales textiles.
- González, J. A., López, C. L., & Martínez, R. D. (2021). Distribution and ecological roles of *Pleurotus ostreatus* in the Andean region of Colombia. *Journal of Mycology*, 40(3), 215-228.
- Guzmán, G., Rivas, M., & García, I. (2021). Mycelial growth and enzymatic activity of *Pleurotus ostreatus* under various environmental conditions. *Journal of Fungal Biology*, 30(6), 512-525.
- Haritash, A. K., & Kaushik, C. P. (2009). Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of Hazardous Materials*, 169(1-3), 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.137>.
- Hernández Angulo, L. R. (2020). Modelación de metales pesados en ríos: caso de estudio: cuenca baja del río Cesar.
- Kardos, J., Héja, L., Simon, Á., Jablonkai, I., Kovács, R., & Jemnitz, K. (2018). Copper signalling: causes and consequences. *Cell Communication and Signaling*, 16, 1-22.
- Kumar, R., Singh, A., & Tripathi, S. (2023). Role of *Pleurotus ostreatus* in sustainable agriculture and environmental management. *Bioresource Technology*, 377, 128-138.

- Li, X., La, G., Cheng, Q., Wang, F., Feng, F., Zhang, B., & Zhang, Z. (2014). Profile of natural redox mediators production of laccase-producing fungus *Pleurotus ostreatus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 93, 478-482.
- Lima, J., Souza, M., & Fernandes, F. (2022). Ecological distribution of *Pleurotus ostreatus* in South America: A review. *Brazilian Journal of Mycology*, 28(4), 234-245.
- Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. (2015). *Resolución 0631 de 2015*. Diario Oficial No. 49.
http://www.minambiente.gov.co/images/normativa/app/resoluciones/d1res_631_marz_2015.pdf
- Ministerio de minas y energía y Universidad de Córdoba, (2015). Incidencia Real de la Minería del Carbón, del oro y del Uso del Mercurio en la Calidad Ambiental con Énfasis Especial en el Recurso Hídrico-Diseño de Herramientas para la Planeación Sectorial.
- Muthuvelu, K. S., Rajarathinam, R., Kanagaraj, L. P., Ranganathan, R. V., Dhanasekaran, K., & Manickam, N. K. (2019). Evaluación y caracterización de nuevas fuentes de residuos lignocelulósicos sostenibles para la producción de bioetanol mediante pretratamiento alcalino asistido por ultrasonido. *Waste Management*, 87, 368-374.
- Mitra, S., Chakraborty, A. J., Tareq, A. M., Emran, T. B., Nainu, F., Khusro, A., ... & Simal-Gandara, J. (2022). Impact of heavy metals on the environment and human health: Novel therapeutic insights to counter the toxicity. *Journal of King Saud University-Science*, 101865.
- Mohamadhasani, F., & Rahimi, M. (2022). Growth response and mycoremediation of heavy metals by fungus *Pleurotus sp.* *Scientific Reports*, 12, 19947. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24349-5>
- Muse, J. O., Carducci, C. N., Stripeikis, J. D., Tudino, M. B., & Fernandez, F. M. (2006). A between lead and cadmium kinetic speciation in seawater and accumulation by the green alga *Ulva lactuca*. *Environmental Pollution*, 141(1), 126-130. ar&xid=0c634956. Accessed 23 July 2024.
- Pérez Higuera, M. V. (2013). Estudio de la producción de lacasa por un aislado nativo de *pleurotus ostreatus* en cultivo sólido mediante el uso de cartón, cascara de café y cascarilla de arroz bajo diversas concentraciones de cobre.

- Pérez-Montiel, G., Torres-García, J. L., Juárez-Santacruz, L., Cortés-Espinosa, D. V., Rubio-Piña, J., & Ahuactzin-Pérez, M. (2021). Crecimiento y producción de enzimas lacasas de *Pleurotus ostreatus* durante el proceso de degradación de bisfenol a. *Biotecnia*, 23(2), 39-46.
- Quintero, J. C., Gumersindo, F. C., & Lema, J. M. (2006). Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos. *Vitae*, 13(2), 61-67.
- Roca Guzmán, A. A., & Guerrero Padilla, A. M. (2021). Efecto citotóxico por cobre en *Allium cepa* (Amaryllidaceae). *Arnaldoa*, 28(3), 727-746.
- Román, R., Torres-Duarte, C., Ayala, M., & Vázquez-Duhalt, R. (2010). Producción a escala piloto de lacasa de *Coriolopsis galilea*. *Revista*.
- Sánchez, C. (2010). Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(5), 1321-1337.
- Sang, H., Zhang, Y., & Liu, L. (2021). Distribution and ecological importance of *Pleurotus ostreatus* in Asia. *Asian Journal of Mycology*, 29(2), 190-205.
- Santos, M. P. O., Santos, M. V. N., Matos, R. S., Van Der Maas, A. S., Faria, M. C. S., Batista, B. L., ... & Bomfeti, C. A. (2022). *Pleurotus* p strains with remediation potential to remove toxic metals from Doce River contaminated by Samarco dam mine. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 19(7), 6625-6638. doi:10.1007/s13762-021-03597-4
- Semana. (2022) "Industria del cobre: con el foco puesto en la transición energética y la reforestación," Accessed: Jul. 26, 2022. [Online]. Available:<https://www.semana.com/mejor-colombia/articulo/industria-del-cobre-con-elfoco-puesto-en-la-transicion-energetica-y-la-reforestacion/202200/>
- Sharma, P., Kumar, S., & Pandey, A. (2021). Bioremediated techniques for remediation of metal pollutants using metagenomics approaches: a review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(4), 105684.
- Tlecuítl Beristain, S., Sánchez, C., Loera, O., Robson, G. D., & Díaz-Godínez, G. (2008). Laccases of *Pleurotus ostreatus* observed at different phases of its growth in submerged fermentation: production of a novel laccase isoform. *Mycological Research*, 112(9), 1080-1084.
- Tumolo, M., Ancona, V., De Paola, D., Losacco, D., Campanale, C., Massarelli, C., & Uricchio, V.

- F. (2020). Chromium pollution in European water, sources, health risk, and remediation strategies: An overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(15), 5438.
- Vaidyanathan, V. K., Venkataraman, S., Senthil Kumar, P., George, J., Rajendran, D. S., Shaji, A., Lawrence, N., Saikia, K., & Rathankumar, A. K. (2022). Laccase production by *Pleurotus ostreatus* using cassava waste and its application in remediation of phenolic and polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated lignocellulosic biorefinery wastewater. *Environmental Pollution*, 309, 119729. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119729>
- Wasser, S. P. (2010). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(3), 258-274.
- Wang, L., Tan, L., Hu, L., Wang, X., Koppolu, R., Tirri, T., ... & Xu, C. (2021). On laccase-catalyzed polymerization of biorefinery lignin fractions and alignment of lignin nanoparticles on the nanocellulose surface via one-pot water-phase synthesis. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 9(26), 8770-8782.
- Zaynab, M., Al-Yahyai, R., Ameen, A., Sharif, Y., Ali, L., Fatima, M., ... & Li, S. (2022). Health and environmental effects of heavy metals. *Journal of King Saud University-Science*, 34(1), 101653.

