

Artículo original de investigación

Decoloración del Azul brillante de Remazol R (RBBR) en presencia de sulfato de cobre por dos nuevas cepas de *Trametes* sp.

Guadalupe Rojas Verde¹, María del Socorro Flores González¹, Claudia Patricia Larralde Corona², Katiushka Arévalo Niño^{1*}

¹Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. Av. Pedro de Alba Esq. Manuel L. Barragán S/N, Cd. Universitaria C.P. 66450 San Nicolás de los Garza, N.L. México.

²Instituto de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional. Blvd. del Maestro Esq. Elías Piña, Col. Narciso Mendoza, Cd. Reynosa, Tamaulipas, México.

*Autor de correspondencia: karevalo01@hotmail.com

Resumen

Dos hongos de la pudrición blanca aislados de troncos de madera en descomposición en el Noreste de México (Nuevo León), identificados como *Trametes* sp. RVAN2 y RVAN12, fueron seleccionados a partir de un análisis primario en placa, debido a la habilidad que presentaron para degradar colorantes sintéticos, la cual fue superior a la observada por hongos de referencia, *Bjerkandera adusta* y *Pleurotus ostreatus*. En el medio líquido denominado mineral-glucosa (GMM), solo fue detectada la actividad lignolítica de lacasa. Por otro lado, de los cuatro compuestos utilizados como inductores, el sulfato de cobre presentó la mayor actividad de lacasa con 3.0 U/mL para RVAN2 y 6.9 U/mL para RVAN12, un incremento de 640-770 veces, respectivamente, con respecto al control. Finalmente, RVAN2 y RVAN12, fueron capaces de decolorar de forma eficiente el colorante, azul brillante de remazol (RBBR), por sus siglas en inglés, independientemente de la presencia del sulfato de cobre. Aunque el sulfato de cobre presenta un efecto inductor en la síntesis de lacasa, su presencia no necesariamente incrementará la velocidad de decoloración, pues esta decoloración fue similar en presencia y ausencia del mismo. Adicional a esto, se observó que el RBBR por si solo presentó un efecto inductor. Estos resultados abren la posibilidad de implementar procesos que permitan abatir algunos contaminantes liberados al ambiente, entre ellos colorantes textiles, mediante el uso de dos hongos de la pudrición blanca aislados en Nuevo León, del género *Trametes*.

Palabras clave: *Lacasa*, basidiomicetos nativos, *Trametes*, inducción, decoloración

Abstract

Two strains of white-rot fungi isolated from decomposing tree trunks in the Northeastern state of Nuevo Leon, Mexico, identified as *Trametes* sp. RVAN2 and RVAN12, were selected through a primary plate screening due to their ability for degrading synthetic colorants, which was superior to that exhibited by reference strains, such as *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus ostreatus*. In the

liquid medium, denominated as mineral-glucose (GMM), only the ligninolytic activity for laccase was detected. On the other hand, of the four compounds used as inducers, copper sulfate showed the highest laccase activity with 3.0 U/mL, for RVAN2, and 6.9 U/mL, for RVAN12, a 640 to 770-fold increase, respectively, with respect to the control strain. Finally, independently of the copper sulfate presence, RVAN2 and RVAN12 were capable of efficiently decolorizing the reactive Remazol Brilliant Blue-R (RBBR). Although copper sulfate had an inducing effect on laccase synthesis, its presence did not necessarily increase the rate of discoloration, since it was similar in the presence and absence of the inductor.

In addition to this, it was observed that RBBR alone had an inductor effect. These results open the possibility of implementing processes that could help to degrade textile dyes, using two white rot fungi isolated in Nuevo Leon of the genus *Trametes*.

Key words: *Laccase, Basidiomycetes, Trametes, induction, decolorization*

1. Introducción

La rápida industrialización y urbanización ha generado un sinnúmero de problemas al ambiente, siendo uno de los más graves la descarga de efluentes derivados de la industria textil. No solo este tipo de industria utiliza los colorantes, también otras como la de alimentos, de papel, cosmética y de plásticos. Los colorantes son clasificados en base a su disociación en solución acuosa en ácidos, colorantes reactivos directos (aniónicos), básicos (catiónicos) y dispersos (no iónicos) (Kuhad, *et al.* 2004). Los métodos aplicados para su remoción suelen ser físico-químicos, tales como la precipitación o la adsorción o alternativamente, se utiliza degradación química. Estos métodos presentan limitantes en cuanto a costo y aplicación (Fu and Viraraghavan, 2001). A partir de la década de los 70's, se observó que los hongos de la pudrición blanca presentan un sistema lignolítico que les permite degradar no sólo la lignina hasta una total mineralización, sino también compuestos altamente tóxicos, transformando dioxinas, pesticidas y compuestos organoclorados, entre otros. Las principales enzimas implicadas en la degradación de lignina son la lacasa, la Lignino Peroxidasa (LiP) y la Manganese

Peroxidasa (MnP) (Kornilowicz-Kowalska, *et al.* 2006).

La lacasa, una benzenediol: oxígeno oxidorreductasa, es una polifenol oxidasa glicosilada. La enzima cataliza la oxidación de una amplia variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos, reduciendo el oxígeno a agua. Además, puede catalizar oxidaciones indirectas de químicos que no son fenoles o aminas (Thurston, 1994).

El hongo más estudiado por décadas fue *Phanerochaete chrysosporium*, el cual bajo ciertas condiciones de cultivo es capaz de sintetizar lacasa (Rodríguez, *et al.* 1997; Gnanamani, *et al.* 2006); sin embargo las principales enzimas producidas por este microorganismo son la LiP y la MnP, bajo condiciones limitantes de nitrógeno y carbono. Por tal razón, la mayoría de los estudios se han encaminado a utilizar medios de cultivo que cumplan con esas condiciones. En la actualidad, se continúa la búsqueda de nuevos microorganismos capaces de degradar un amplio espectro de compuestos contaminantes, destacando *Bjerkandera adusta*, *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes hirsuta*, diversas especies de *Pleurotus* y *Trametes versicolor* (Tekere, *et al.*, 2001; Toh, *et al.*, 2003). Así, los objetivos del presente trabajo fueron evaluar la capacidad decolorante de dos

hongos de la pudrición blanca aislados en Nuevo León, del género *Trametes*, tanto en placas de agar como en cultivo líquido, así como evaluar el efecto del cobre en la síntesis de lacasa, LiP y MnP y en la decoloración del RBBR.

2. Material y Métodos

2.1 Microorganismos

Los hongos utilizados, fueron aislados de troncos en descomposición, localizados en los municipios de Arteaga y Linares, N. L. Los hongos se conservan en Agar Extracto de Malta-Extracto de Levadura (YMA) a 4° C y son sembrados de forma periódica. Los hongos utilizados pertenecen a los géneros de *Trametes* sp. (RVAN2, RVAN12, RVAN18), *Pycnoporus* sp. (RVAN3, RVAN5, RVAN6 y RVAN8), *Schizophyllum commune* (RVAN19), las cepas no identificadas (RVAN4, RVAN7, RVAN9, RVAN10, RVAN11, RVAN13, RVAN15 y RVAN15). Se utilizaron dos cepas de referencia, *Bjerkandera adusta* y *Pleurotus ostreatus* ATCC 58053.

2.2 Selección primaria

Se llevó a cabo una selección primaria en placas de agar adicionadas con 200 mg/L de RBBR. El medio de cultivo utilizado fue mineral-glucosa (GMM). El medio contiene por litro: extracto de levadura, 1.0 g; glucosa, 10 g; KH_2PO_4 , 2g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g; KCl, 0.5 g; solución mineral, 1.0 mL ($\text{B}_4\text{O}_7\text{Na}_2 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 100 mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 10 mg; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 10 mg; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 10 mg; por litro). El pH se ajustó a 5.5 y 20 g de agar bacteriológico. Se esterilizó el medio a 121 °C por 15 min, se adicionó el colorante previamente esterilizado por filtración, hasta una concentración final de 200 mg/L y se vertió en placas Petri de 90X15 mm. Posterior a su solidificación, el medio se inoculó con un fragmento de micelio de cada

uno de los diferentes hongos. Se incubó a 30 °C por ocho días. Se revisaron cada 24 h para evaluar la decoloración.

2.3 Condiciones de Cultivo

Los ensayos se llevaron a cabo en matraces ErlenMeyer de 250 mL con 150 mL de medio mineral, la composición fue la misma a la utilizada en la selección primaria, sin la adición de agar bacteriológico. Cada matraz se inoculó con 5 fragmentos de micelio. Se llevaron a cabo fermentaciones independientes unas para seleccionar el inductor y, otras para medir la capacidad de decoloración en presencia de inductor seleccionado.

2.4 Selección del Inductor

Se utilizaron cuatro compuestos a dos concentraciones diferentes: alcohol etílico (30 y 35 g/L), sulfato de cobre (0.5 y 1.0 mM), sulfato de manganeso (11 y 40 mg/L) y siringaldazina (0.116 y 1.16 μM). Cada solución fue estilizada por filtración y añadida a los matraces a las 24 h de inoculados.

2.5 Actividad enzimática

2.5.1 Lacasa

Cada 48 h se tomaron alícuotas de 1.5 mL, se centrifugaron a 3500 rpm por 20 min. La actividad enzimática de lacasa se determinó mediante la oxidación del ABTS [ácido (2,2'-azino-bis(etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico))]. La mezcla de reacción, a un volumen final de 3 mL, estaba formada por ABTS 2 mM en buffer de acetato de sodio 200 mM pH 5.0 y 100 μL de sobrenadante. La formación del catión se determinó espectrofotométricamente a 405 nm ($\epsilon_{405} = 3.6 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

2.5.2 Lignino Peroxidasa (LiP)

La LiP se determinó por la dimerización oxidativa dependiente del peróxido del 2,4-diclorofenol y 4-aminoantipirina, a 25 C. La mezcla de reacción consistió de 2 mM de 4-aminoantipirina, 30 mM de 2,4-diclorofenol

y 3 mM de 3mM de H₂O₂ en buffer de 20 mM de succinato de sodio a pH 4.5 (Niladevi and Prema, 2005). El cambio en absorbancia se determinó espectrofotométricamente a 510 nm ($\epsilon_{510}=1.85 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

2.5.3 Manganese Peroxidasa (MnP)

La actividad de MnP se llevó a cabo a 25°C mediante la formación dependiente del peróxido de hidrógeno del complejo malonato-ión mangánico a 270 nm ($\epsilon_{270}=11590 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La mezcla de reacción consistió de 1.0 mM sulfato manganeso en 50 mM de buffer de malonato de sodio (pH 4.5) y 100 μL de sobrenadante, la reacción se inició al adicionar H₂O₂ a una concentración final de 1.0 mM (Warishii, *et. al.*, 1992).

Todas las medidas espectrofotométricas se realizaron en un Espectrofotómetro Beckman MODELO DU 400. Las actividades enzimáticas se expresaron en unidades. Una unidad se define como la formación de 1 μM de sustrato por minuto a 25° C.

2.6 Decoloración en cultivo sumergido

Después de 24 h, a cada uno de los matraces inoculados se adicionó el colorante a una concentración final de 200 mg/L y el mejor inductor previamente seleccionado. La degradación abiótica del colorante se determinó en el medio adicionado de colorante sin inocular.

El colorante remanente se determinó cada 48 h. Se tomaron alícuotas de 1.5 mL, se centrifugaron a 3500 rpm por 15 min, para separar el micelio del sobrenadante. Los resultados representan el promedio de tres ensayos independientes. Por otro lado, para observar con mayor detalle la transformación del colorante, las muestras tomadas al día ocho y el control abiótico, fueron sometidas a un análisis espectrofotométrico en un rango de 250 a 800 nm.

2.7 Zimogramas

Las muestras de los extractos crudos extracelulares de cada uno de las diferentes condiciones probadas se colectaron en el transcurso de la fermentación.

2.8 Electroforesis

La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) fue realizada a pH alcalino bajo condiciones no desnaturizantes, utilizando una cámara de electroforesis Hoeffer. La concentración final del gel separador fue de 12% de acrilamida y la solución buffer de 375 mM de Tris-HCl (pH 8.8). El gel concentrador contenía 5% de acrilamida y la solución buffer una concentración final de 125 mM de Tris-HCl (pH 6.8). La solución buffer de corrida estuvo conformada por 25 mM de Tris-HCl y 122 mM de glicina (pH 8.8). El gel se equilibró previamente en buffer de acetato de sodio 100 mM (pH 5.0) por 15 min a temperatura ambiente. Se lavó con el mismo buffer y se tiñó usando una solución de ABTS al 0.3% en buffer de acetato de sodio 100 mM (pH 5.0) como sustrato.

2.9 Análisis de Datos

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. A los datos obtenidos se les sometió a un Análisis de Varianza (ANOVA), así como una prueba de Dunnett, ambos con un nivel de significancia del 0.05.

3. Resultados

3.1 Decoloración en placa

Los hongos probados mostraron un patrón diferente en la decoloración del RBBR. La mayor decoloración la presentaron las dos cepas de *Trametes* sp. RVAN2 y RVAN12, a los ocho días, seguidos por *Pycnoporus* sp. RVAN3 y RVAN6; *Pleurotus ostreatus* ATCC 58053 y finalmente, *Bjerkandera adusta* (Figura 1).

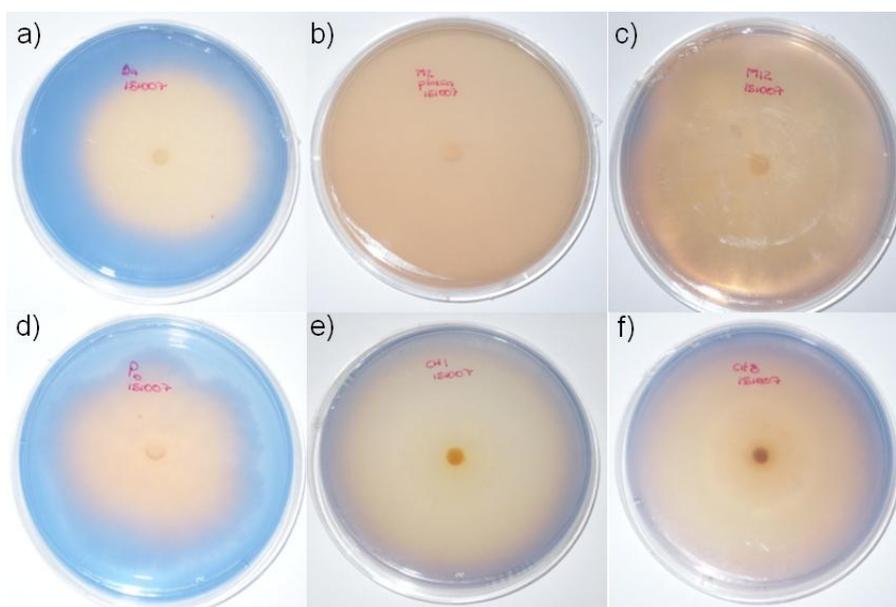


Figura 1. Degradación del RBBR en placa después de 8 días.

a) *Bjerkandera adusta*, b) *Trametes* sp. RVAN2, c) *Trametes* sp. RVAN12, d) *Pleurotus ostreatus*, e) *Pycnoporus* sp. RVAN3, f) *Pycnoporus* sp. RVAN6

Estos resultados preliminares permitieron seleccionar a las dos especies de *Trametes* sp. RVAN2 y RVAN12 para los estudios posteriores de decoloración y medir el efecto del sulfato de cobre en dicho proceso.

3.2 Inductores

Las dos cepas de *Trametes* sp. RVAN2 y RVAN12, presentaron una respuesta variable para cada inductor, en ambas cepas se observó una diferencia altamente significativa ($p \leq 0.0000$) entre los diferentes tratamientos (tipo y concentración del inductores). En RVAN 2 el sulfato de cobre a 0.5 mM fue el inductor que presentó una diferencia altamente significativa con respecto al control ($p \leq 0.000041$), con una actividad enzimática máxima de lacasa de 2,942 U/L (Figura 2a). De forma similar en la cepa RVAN12, el sulfato de cobre a una concentración de 0.5 mM presentó una diferencia altamente significativa ($p \leq 0.000015$) alcanzando una actividad máxima de 6,868 U/L (Figura 2b); esto significó para ambas cepas, un incremento

de 640 y 770 veces en la actividad, con respecto al control, respectivamente.

El resto de compuestos añadidos presentaron una inducción mínima en la actividad enzimática. Durante el transcurso del ensayo no se detectó LiP y MnP. El sulfato de cobre a una concentración de 0.5 mM fue seleccionado para las pruebas de decoloración en medio líquido.

3.3 Decoloración en cultivo sumergido

Se utilizó una concentración final de colorante de 200 mg/L. La transformación del colorante comenzó al día dos. La cepa RVAN2 transformó más rápido al RBBR que la cepa RVAN12, a pesar de presentar esta última la mayor actividad enzimática (Figura 2). Por otro lado, el medio suplementado con sulfato de cobre, presentó una decoloración inicial más rápida que en el medio sin éste compuesto; al día dos, la decoloración fue superior al 90% en RVAN2, mientras que con RVAN12, se alcanzó hasta el día 4 y 6 (Figura 3).

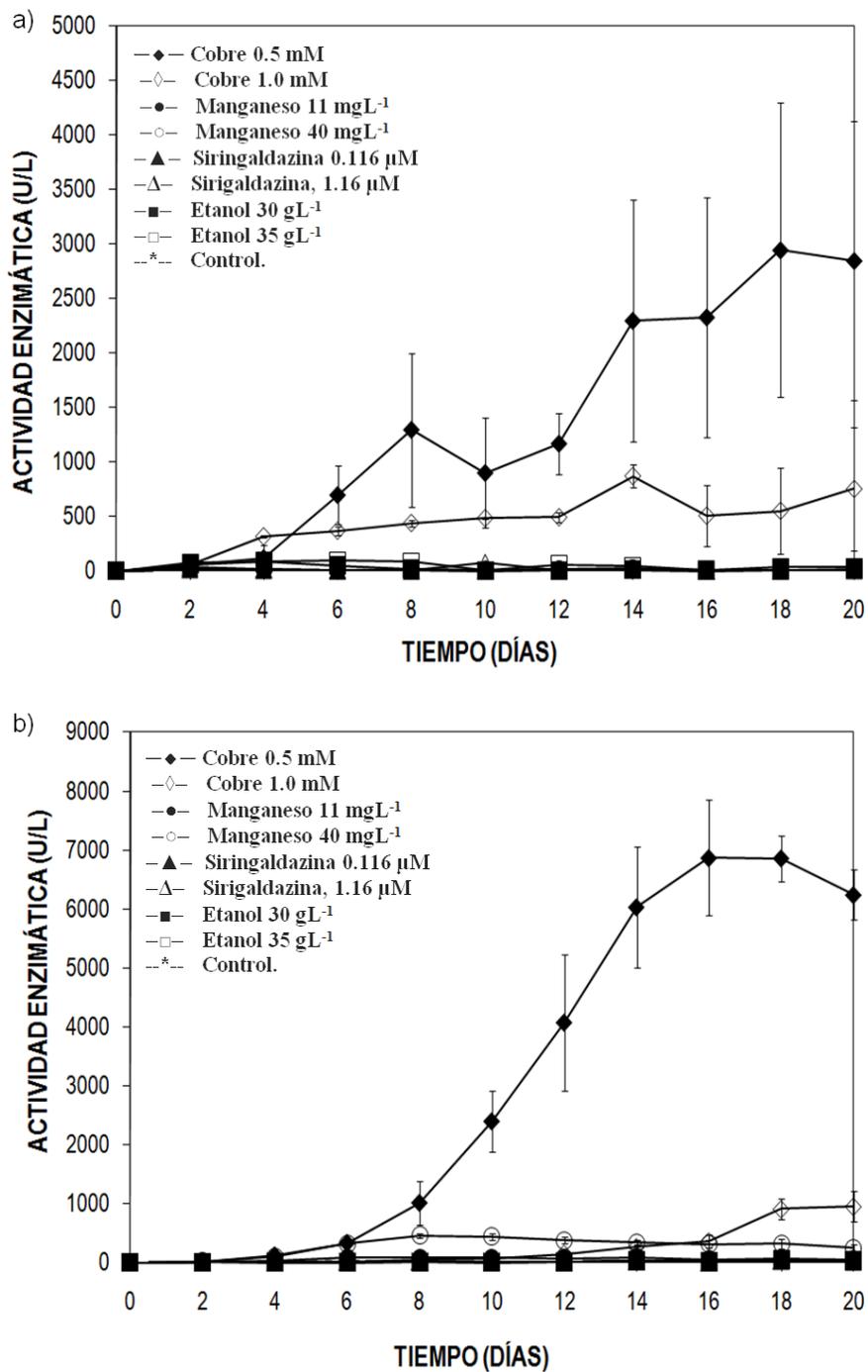


Figura 2. Producción de lacasa (U/L), en función del tiempo en la presencia de diferentes compuestos, en GMM. **a)** RVAN2; **b)** RVAN12.

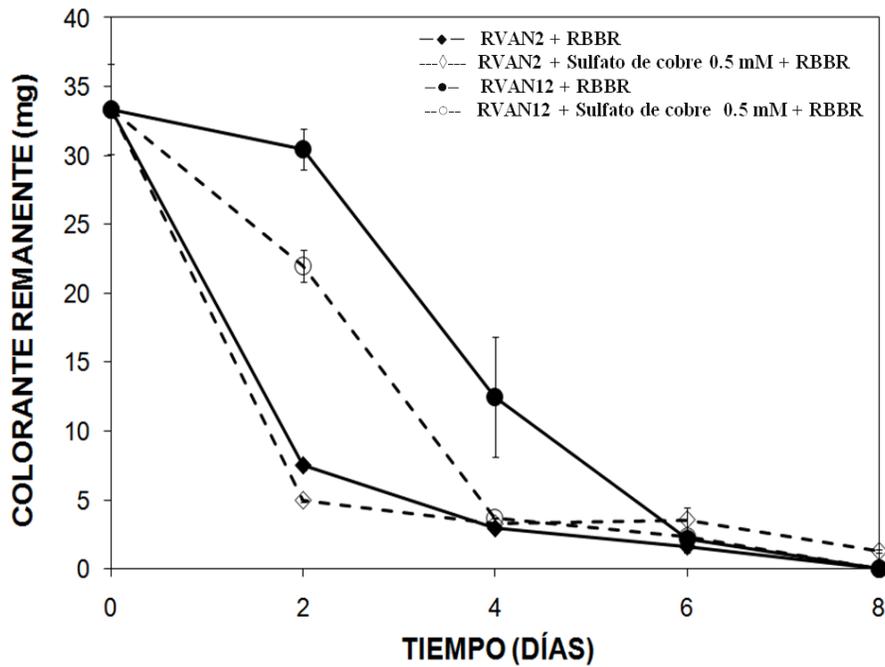


Figura 3. Biotransformación del colorante RBBR por RVAN2 y RVAN12 en GMM.

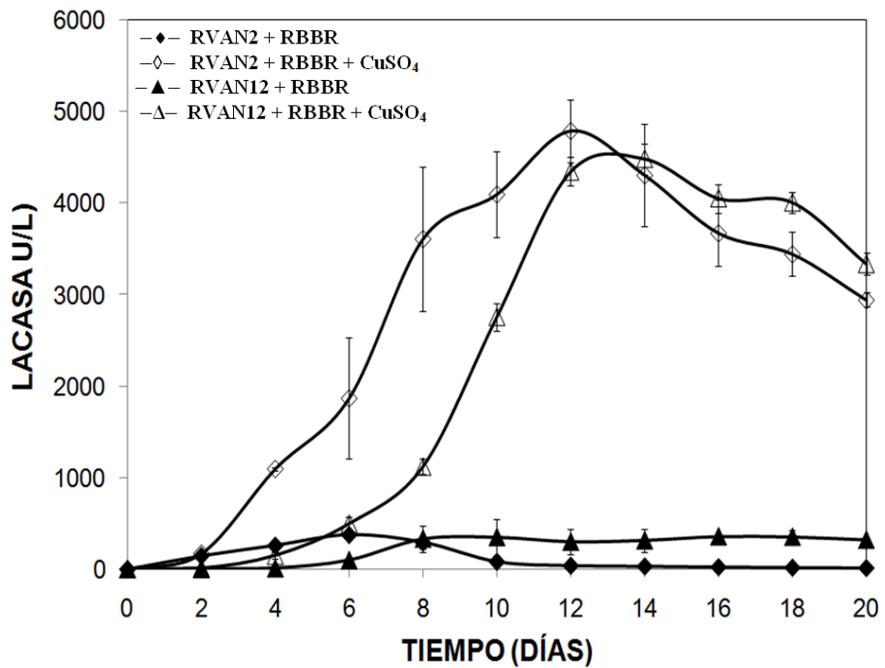


Figura 4. Producción de lacasa (U/L) bajo la presencia de RBBR con y sin sulfato de cobre.

Al día ocho, la decoloración fue superior al 95% en ambos hongos, independientemente de la presencia del cobre. La actividad de lacasa determinada en el medio adicionado con RBBR mostró un incremento en la actividad menor a la presentada con el sulfato de cobre en RVAN2 y RVAN12, con 350 y 370 U/L, respectivamente. Sin embargo cuando el sulfato de cobre y el colorante estuvieron presentes, se observó un incremento en la actividad, con 4500 U/L para RVAN2 y 4,800 U/L para RVAN12 (Figura 4). Finalmente, se determinó que existieron diferencias significativas entre las dos cepas ($p \leq 0.0021$), la presencia-ausencia

del sulfato de cobre ($p \leq 0.00000$) y la interacción de ambos factores ($p \leq 0.0040$). Para evaluar en detalle la biontransformación en el medio de cultivo, se realizó un análisis espectrofotométrico en el rango de 250 a 800 nm. Mientras que la decoloración determinada al máximo de absorbancia del colorante mostró una diferencia mínima en la decoloración, el análisis espectrofotométrico fue más específico en ese cambio. Se determinó que la presencia de sulfato de cobre disminuía ligeramente la decoloración en el sobrenadante (Figura 5).

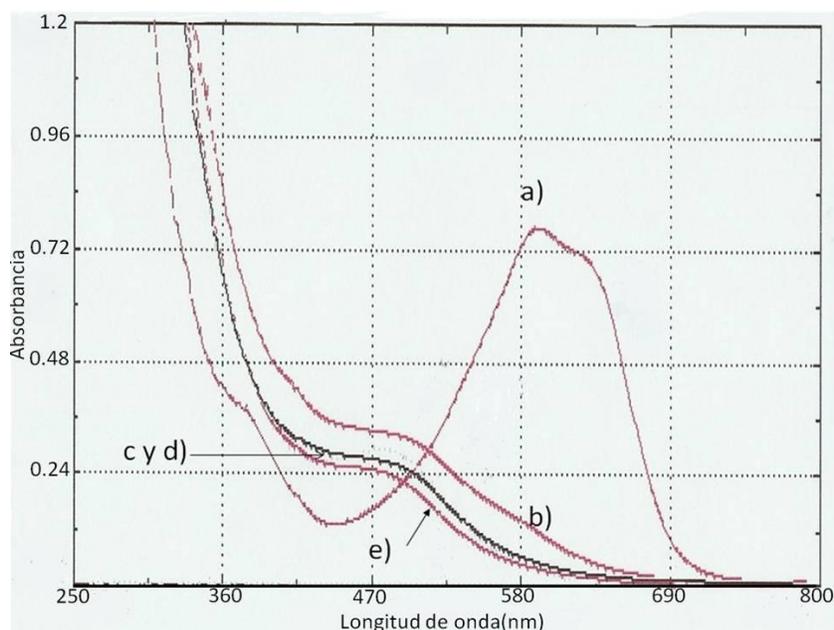


Figura 5. Espectro UV-Vis de decoloración del RBBR bajo diferentes condiciones al día 8. **a)** Control; **b)** RVAN2 + CuSO₄; **c)** RVAN2; **d)** RVAN12 + CuSO₄; **e)** RVAN12.

3.4 Isoenzimas

Finalmente, se evaluó el perfil electroforético para determinar si la presencia del colorante favoreció la síntesis de isoenzimas (Figura 6). Los resultados obtenidos mostraron que sólo en los

sobrenadantes de RVAN2, bajo la presencia de colorante y sulfato de cobre se detectaron dos bandas bien definidas (Figura 6b). En el caso de RVAN12, con sulfato de cobre sólo se observó un incremento en la intensidad de la única banda detectada (Figura 6c y 6d).

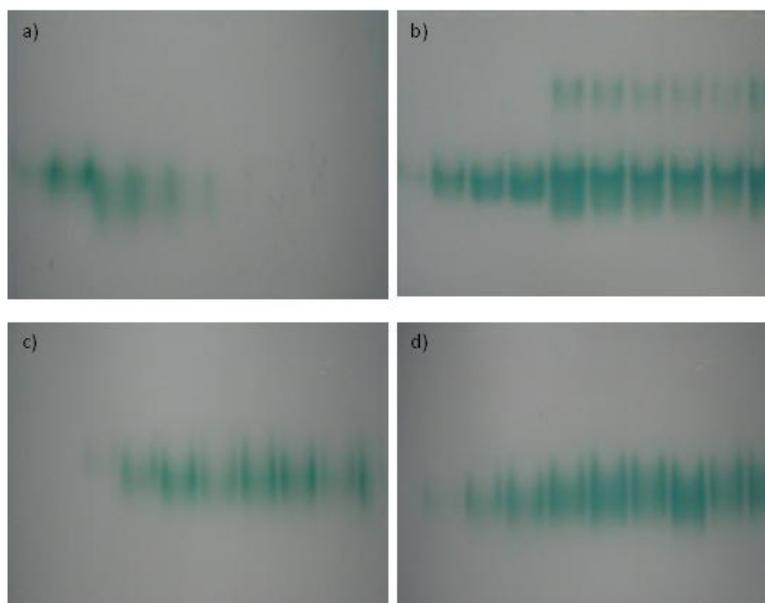


Figura 6. Perfil enzimático de los extractos crudos de los diferentes tratamientos:

- a) RVAN2+RBBR
- b) RVAN2+RBBR+CuSO₄
- c) RVAN12+RBBR
- d) RVAN12+RBBR + CuSO₄.

4. Discusión

Por décadas, los métodos de selección de microorganismos degradadores de colorantes eran los cultivos líquidos. Con el paso de los años, se implementó un método rápido y eficiente, la decoloración en placa. Es un método de selección primaria y los colorantes más utilizados son el poly R-478 y/o RBBR (Novotný, *et al.*, 2001). Por tal razón se aplicó este método para la selección de dos hongos pertenecientes al género *Trametes* sp. RVAN2 y RVAN12. Este mecanismo permite elegir hongos capaces no sólo de degradar efluentes textiles, incluso han demostrado ser capaces de degradar colorantes en suelo (Novotný, *et al.*, 2001). Sin embargo, existen diferencias en la decoloración, tiempo y capacidad, las cuales son dependientes de la estructura del

colorante, la especie de hongo y medios de cultivo utilizados.

La velocidad, cantidad y calidad de las enzimas lignolíticas, en particular de la lacasa, está afectada por las condiciones de crecimiento, el medio de cultivo utilizado, la aireación, etc. (Arora and Gill, 2000; Hatvani and Mécs, 2002; Pointing *et al.*, 2000; Vasconcelos, *et al.*, 2000). Por ello, por décadas se ha manejado el uso de compuestos denominados inductores y/o potenciadores, cuyo principal objetivo es el incrementar la actividad de las enzimas lignolíticas como la lacasa. Esto a la vez permitirá utilizar a los hongos y sus sobrenadantes en diversos procesos. Dentro de los compuestos utilizados para incrementar la actividad enzimática destacan el etanol, siringaldazina, sulfato manganoso y sulfato de cobre. De ellos, el más empleado es el sulfato de cobre (Mouso, *et*

al. 2003) y los resultados del presente trabajo señalan que para las especies de *Trametes* es el más indicado. Una de las principales razones por la cuales se busca incrementar la actividad enzimática es favorecer la degradación de compuestos tóxicos.

D'Souza-Ticlo, et al. (2006), determinaron que algunos colorantes y efluentes textiles pueden presentar un efecto inductor; en el caso del RBBR, éste funciona como sustrato de la enzima (Machado, et al., 2005); este efecto se observó en el presente trabajo aunque en menor proporción a lo obtenido cuando estuvieron presentes sulfato de cobre y colorante.

La lacasa, LiP y MnP, así como otras enzimas lignolíticas son importantes en la degradación de los diferentes colorantes. La desaparición de los picos en el espectro visible está relacionada con el rompimiento del grupo cromóforo en el colorante. En *Irpex lacteus* la desaparición de este grupo está relacionado con la síntesis de MnP como lo determinó Shin (2004). Tanto en RVAN2 y RVAN12, ambas del género *Trametes*, se determinó que la lacasa fue la enzima más importante detectada en el sobrenadante, bajo las condiciones de cultivo ensayadas. Estos resultados son similares a lo encontrado en el caso de *Pycnoporus cinnabarinus*, *Phlebia tremellosa* y *Pleurotus sojarcaju* (Chagas and Durrant, 2001). De igual forma, en *Ganoderma* spp (De Souza-Silva et al., 2005), *P. ostreatus* (Zhao et al., 2006), *P. chrysosporium* (Asgher et al., 2006), e incluso deuteromicetos tales como *Pestalotiopsis guepinii* (Nazareno-Saparrat y Hammer, 2006), se ha estudiado la degradación de colorantes sintéticos. En todos ellos, la respuesta en la decoloración fue dependiente del colorante empleado, la concentración e incluso el medio de cultivo empleado, como ha sido demostrado utilizando a

Phanerochaete chrysosporium y *Pleurotus sajor-caju*, cuando investigaron la degradación de colorantes tipo azo (Pereira and Durrant, 2001). D'Souza-Ticlo et al. (2006), determinó que la presencia de colorantes activa la maquinaria de síntesis de enzimas lignolíticas, entre ellas lacasa en diversos tipos de efluentes. Los resultados presentados por Shin (2004), señalan que tanto la lacasa como la LiP no están relacionadas con la decoloración del efluente analizado. En el presente trabajo, se determinó que la lacasa fue la principal enzima responsable de la decoloración, al no ser detectadas la MnP y la LiP. Estos resultados sugieren que pueden ser otras peroxidasas las que estarían participando en la degradación del colorante o incluso compuestos de bajo peso molecular con habilidad oxidativa.

Finalmente, la presencia de isoenzimas de lacasa es un evento común entre los hongos de pudrición blanca, éstas son detectadas cuando están en contacto con inductores (Farnet et al., 2000; Lu and Ding, 2010). Lo anterior se observó en el medio suplementado con sulfato de cobre mas no donde sólo estuvo presente el colorante. Generalmente, las isoenzimas presentan diferentes características, esto es, punto isoeléctrico, pH y/o temperatura, e incluso diferentes patrones de decoloración (Šušla, et al., 2007). Una de las razones por las cuales se incrementa la actividad de lacasa en presencia de inductores, es el papel que juega en la protección contra el estrés oxidativo causado por los radicales libres que se originan bajo la presencia de compuestos aromáticos, entre ellos el RBBR; aunque el patrón de inducción indicaría que solo ciertas isoformas sirven en el efecto de protección, lo anterior explicaría por qué se presentó una menor decoloración cuando el sulfato de cobre estuvo presente.

5. Conclusiones

Los hongos estudiados fueron capaces de decolorar el RBBR utilizando un medio líquido (GMM), en un tiempo menor que lo reportado en medio sólido. Ambos aislados responden favorablemente a la presencia de “potenciadores”, sin embargo el efecto del mismo dependerá de las concentraciones utilizadas. Por otro lado, el mismo colorante incrementa la actividad de lacasa en combinación con el sulfato de cobre, comparado al control, no así la decoloración. Se alcanzó una decoloración superior al 98% al día 8, independientemente de la presencia de sulfato de cobre en el medio de cultivo. Los resultados obtenidos indican la ventaja que presentan los hongos utilizados en el presente trabajo al no ser necesaria la adición de compuestos inductores, ya que alcanzaron igual o mayor decoloración que el medio con sulfato de cobre. Esto abre la posibilidad de emplear estos microorganismos, RVAN2 y RVAN12, en el tratamiento de efluentes textiles, así como en otros procesos donde compuestos de difícil degradación y altamente contaminantes se encuentren presentes.

6. Bibliografía

- Arora, D. S., and Gill, P. K. 2005. Production of ligninolytic enzymes by *Phlebia floridensis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 1021-1028.
- Asgher, M., Shah, S. A. H., Alizard, M., Legge, R. L. 2006. Decolorization of some reactive textile dyes by white rot fungi isolated in Pakistan. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22: 89-93.
- Chagas, E. P., Durrant, L. R. 2001. Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju*. *Enzyme Microb. Technol.* 29: 473-477.
- De Souza-Silva, C. M. M., Soares, M. I., de Oliveira, P. R. 2005. Ligninolytic enzyme production by *Ganoderma* spp. *Enzyme Microb. Technol.* 37: 324-329.
- D'Souza-Ticlo, D., Kumar, V. A., Mathew, M., Raghukumar, C. 2006. Effect of nutrient nitrogen on laccase production, its isozyme pattern and effluent decolorization by the fungus NIOCC · 2a isolated for mangrove wood. *Indian J. of Marine Sci.* 35: 364-372.
- Farnet, A. M., Criquet, S., Tagger, S., Gil, G., Le Petit, J. 2000. Purification, partial characterization and reactivity with aromatic compounds of two laccases from *Marasmius quercophilus* strain 17. *Can. J. Microbiol.* 46: 189-194.
- Fu, Y., Viraraghavan, T. 2001. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. *Bioresour Technol.* 79:251-262. doi:10.1016/S0960-8524(01)00028-1.
- Gnanamani, A., Jayaprakashvel, M., Arulmani, M., Sadulla, S. 2006. Effect of inducers and culturing processes on laccase synthesis in *Phanerochaete chrysosporium* NCIM 1197 and the constitutive expression of laccase siozymes. *Enzyme Microb. Technol.* 38: 1017-1021.
- Hatvani, N., Mécs, I. 2002. Effect of the nutrient composition on dye decolorisation and extracellular enzyme production by *Lentinus edodes* on solid medium. *Enzyme Microb. Technol.* 30: 381-386.
- Kornilowicz-Kowalska, T., Wrzosek, M., Grinalska, G., Iglík, H., Bancercz, R. 2006. Identification and application of a new fungal strain *Bjerkandera adusta* R59 in decolorization of daunomycin wastes. *Enzyme Microb. Technol.* 38: 583-590.
- Lu, X., Ding, S. 2010. Effect of Cu²⁺, Mn²⁺ and aromatic compounds on the production of laccase isoforms by *Coprinus comatus*. *Mycosci.* 51:68-74. DOI 10.1007/s10267-009-0002-6
- Kuhad, R. C., Sood, N., Tripathi, K. K., Singh,

- A., Ward, O. P. 2004. Developments in Microbial Methods for the Treatment of Dye Effluents. *Adv. Appl. Microbiol.* 56: 185-213.
- Machado, K. G. M., Matheus, D. R., Bononi, V. R. L. 2005. Ligninolytic enzymes production and remazol brilliant blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes fungi. *Brazilian J. Microbiol.* 36: 246-252.
- Mouso, N., Papinutti, L., Forchiassin. 2003. Efecto combinado del cobre y pH inicial del medio de cultivo sobre la producción de lacasa y manganeso peroxidasa por *Stereum hirsutum* (Willd) Pers. *Rev. Iberoam. Micol.* 20: 176-178.
- Nazareno-Saparrat, M. C., Hammer, Elke. 2006. Decolorization of synthetic dyes by the deuteromycete *Pestalotiopsis guepinii* CLPS no. 786 strain. *J. Basic Microbiol.* 46: 28-33.
- Niladevi, K. N., Prema, P. 2005. Mangrove actinomycetes as the source of ligninolytic enzymes. *Actinomycetologica.* 19:40-47.
- Novortý, C., Rawal, B., Bhatt, M., Patel, M., Šašec, V., Molitoris, H. P. 2001. Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. *J. Biotechnol.* 89: 113-122.
- Pereira CE, Durrant LR. 2001. Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju*. *Enzyme Microb. Technol.* 29: 473-477.
- Pointing, S. B., Jones, E. B. G., Vrijmoed, L. L. P. 2000. Optimization of laccase production by *Pycnoporus sangui* submerged liquid culture. *Mycology* 139-144.
- Rodríguez, C. S., Santoro, R., Cameselle, C., Sanromán, A. 1997. Laccase production in semi-solid cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology Lettes.* 19(10): 995-998.
- Shin, K-S. 2004. The role of enzymes produced by white-rot fungus *Irpex lacteus* in the decolorization of the textile industry effluent. *J. Microbiol.* 42: 37-41.
- Šušla, M., Novotný Č., Svobodová. 2007. The implication of *Dichomitus squalens* laccase isoenzymes in dye decolorization by immobilized fungal cultures. *Biores. Technol.* 2109-2115.
- Tekere, M., Mswaka, A. Y., Zvauya, R., Read, S. J. 2001. Growth, dye degradation and ligninolytic activity studies on Zimbabwean white rot fungi. *Enzyme Microb. Technol.* 28: 420-426.
- Toh, Y-C., Lin-yen, J. J., Obbard, J. P., Ting Y-P. 2003. Decolourisation of azo dyes by white-rot fungi (WRF) isolated in Singapore. *Enzyme Microb. Technol.* 33: 569-575.
- Thurston, C. F. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiol.* 140: 19-26.
- Vasconcelos, A. F., Barbosa, A. M., Dekker, R. F. H., Scarminio, I. S., Rezende, M. I. 2000. Optimization of laccase production by *Botruospaeria* sp. In the presence of veratryl alcohol by the response-surface method. *Proc. Biochem.* 35: 1131-1138.
- Zhao, X., Hardin, I. R., Hwang, H-M. 2006. Biodegradation of a model azo disperse dye by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Inter. Biodet. Biodeg.* 57: 1-6.
- Wariishi H, Valli K, Gold MH, 1992. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* 267: 23668-23695.