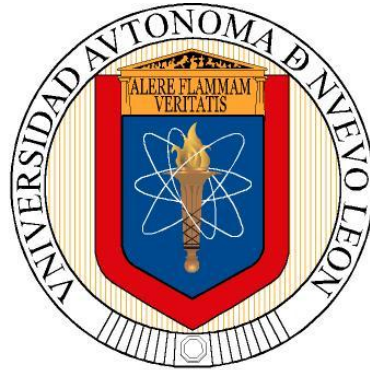


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DECOLORANTE DE CEPAS DE
BASIDIOMICETOS NATIVAS SOBRE COLORANTES SINTÉTICOS

Por

SERGIO MANUEL SALCEDO MARTÍNEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
con Especialidad en MICROBIOLOGIA

Ciudad Universitaria

Mayo, 2009

**CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DECOLORANTE
DE CEPAS DE BASIDIOMICETOS NATIVAS
SOBRE COLORANTES SINTÉTICOS**

Aprobada por el Comité de Tesis:



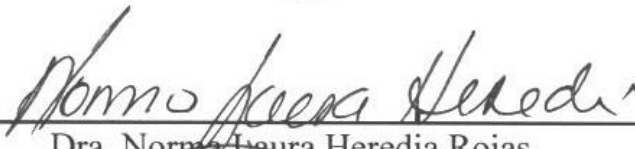
Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna
Director de la Tesis



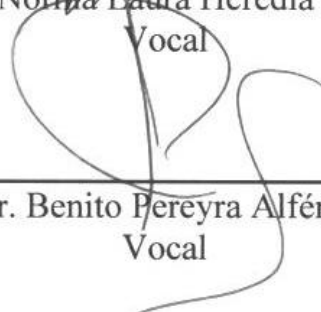
Dr. Juan Francisco Contreras Cordero
Secretario



Dr. José Santos García Alvarado
Vocal



Dra. Norma Laura Heredia Rojas
Vocal



Dr. Benito Pereyra Alférez
Vocal

LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Enzimología del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna.

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Carlos E. Hernández Luna por su dirección y consejos como Asesor de esta Tesis. Asimismo, al Dr. Juan Francisco Contreras, Dr. J. Santos García Alvarado, Dra. Norma L. Heredia Rojas y Dr. Benito Pereyra Alférez, por sus observaciones como miembros de mi Comité de Tesis. También agradezco las recomendaciones de la Dra. Leticia Háuad Marroquín, el Dr. Salomón Martínez Lozano y el Dr. Juan José Peña Cabriales, quienes conformaron mi Comité Tutorial,

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el soporte económico otorgado a través de la beca crédito 30884 durante mi formación académica y a la Secretaría Académica de la UANL por el apoyo económico otorgado a través del PAICYT para la realización del proyecto CN1311-06 que permitió concluir esta Tesis.

Al Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas, especialmente al Dr. Luis Galán Wong y la MC Lucía Palacios, por permitirme el uso de sus instalaciones y agitadores de temperatura controlada.

A la Dra. Catalina Rivas Morales y Dra. Azucena Oranday Cárdenas del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Biológicas, por permitirme el uso de su lector de placas.

A mis compañeros, especialmente Guadalupe Gutiérrez Soto e Irene Cortina por hacer más placenteras las horas en el laboratorio.

A mi familia por su apoyo incondicional. A mis padres Sergio Manuel y Ma. del Pilar, quienes me inculcaron sus normas de vida y aún me brindan su amor incondicional. A mis padres políticos Alfredo † y Hortencia por aceptarme y tratarme como a otro hijo. A mis hermanos Sergio Manuel, Jaime Oziel, Marco Antonio, Jorge Alberto, Ma. del Pilar y Mauricio Alonso, por su complicidad y ejemplo de competitividad. A mi esposa Lilia Hortencia por su carácter jovial, su optimismo y por enseñarme a distinguir las cosas de valor de aquéllas que son valiosas. A mis hijos Ismael Alejandro, Aldo Emanuel e Isis Carolina, por permitirme ser su amigo y en ocasiones pedir mi opinión o seguir mis consejos.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	i
ÍNDICE.....	ii
LISTA DE TABLAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE APÉNDICES.....	xi
NOMENCLATURA.....	xii
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN.....	3
3 HIPÓTESIS.....	4
4 OBJETIVOS.....	5
4.1 Objetivo general.....	5
4.2 Objetivos particulares.....	5

5	ANTECEDENTES.....	6
5.1	Generalidades de hongos.....	6
5.2	Ligninólisis y biorremediación.....	7
5.2.1	Madera, lignina y ligninólisis.....	7
5.2.2	El Sistema de Enzimas Modificadoras de Lignina (SEML), componentes y mecanismo de acción.....	10
5.2.3	Evolución del sistema de enzimas modificadoras de lignina.....	15
5.2.4	Contaminación por actividades humanas y biorremediación.....	16
5.2.5	Características del sistema de enzimas modificadoras de la lignina que favorecen su aplicación en biorremediación.....	17
5.2.6	Aplicaciones de los SEML.....	18
5.2.7	Colorantes.....	19
5.2.8	Mercado de colorantes.....	22
5.2.9	Problemática de los colorantes en el mundo y México.....	23
5.2.10	La estructura de los colorantes y el proceso de decoloración...	26
5.2.11	Mediadores.....	27
5.2.12	Antecedentes de la aplicación de los HPB en procesos de decoloración.....	28
5.2.13	Búsqueda de nuevos sistemas ligninolíticos.....	38
5.2.14	Diversidad fúngica en México y Nuevo León.....	40
6.	METODOLOGÍA.....	42
6.1	Materiales y reactivos.....	42
6.2	Identificación taxonómica.....	43
6.3	Medios y condiciones de cultivo.....	43
6.4	Cepas fúngicas de referencia.....	44
6.5	Colecta de carpóforos y aislamiento de micelios vegetativos.....	44
6.6	Inóculo.....	45
6.7	Ensayos en placa.....	45
6.7.1	Preselección de aislados con mejores capacidades ligninolítica y decolorante.....	45
6.7.2	Selección de aislados con mejor capacidad decolorante.....	47
6.7.3	Obtención de sobrenadantes, extractos crudos y fracciones de diferente talla molecular de cultivos líquidos.....	48

6.8	Determinación del tipo de actividad enzimática.....	48
6.9	Curvas de producción enzimática contra tiempo.....	50
6.10	Caracterización de los principios decolorantes.....	50
6.10.1	Ensayos de decoloración en cultivos líquidos.....	50
6.10.2	Uso de sustratos enzimáticos y retiro de cofactores.....	52
6.10.3	Electroforesis en gel de poliacrilamida y zimogramas.....	52
6.10.4	Determinación de los valores óptimos de actividad y la estabilidad de la lacasa a pH y temperatura.....	54
6.10.5	Efecto de inhibidores de la actividad enzimática.....	55
6.10.6	Determinación de la presencia de mediadores.....	55
7.	RESULTADOS.....	57
7.1	Aislamiento y selección de los aislados nativos con mejor capacidad decolorante.....	57
7.2	Identificación taxonómica.....	61
7.3	Curvas de producción enzimática.....	63
7.4	Caracterización de los principios decolorantes.....	66
7.4.1	Ensayos de decoloración en cultivos líquidos y con muestras de cultivos.....	66
7.4.2	Uso de sustratos enzimáticos específicos y retiro de cofactores..	75
7.4.3	Electroforesis en gel de poliacrilamida y zimogramas.....	76
7.4.4	Determinación de los valores de pH y temperaturas óptimos para la actividad y la estabilidad enzimática.....	79
7.4.5	Efecto de inhibidores sobre la actividad enzimática.....	86
7.4.6	Mediadores.....	88
8.	DISCUSIÓN.....	92
8.1	Selección de aislados con mejor capacidad decolorante.....	92
8.1.1	Método de aislamiento.....	92
8.1.2	Sistema de selección en placa utilizado.....	93
8.1.3	Selección de aislados con mejor capacidad decolorante.....	93
8.2	Identificación taxonómica.....	94
8.3	Producción enzimática.....	95
8.4	Caracterización de los principios decolorantes.....	97

8.4.1 Ensayos de decoloración en cultivos líquidos y con muestras de cultivos.....	97
8.4.2 Uso de sustratos enzimáticos específicos y retiro de cofactores.....	98
8.4.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida y zimogramas.....	99
8.4.4 Parámetros funcionales de la lacasa. Óptimos de temperatura y pH. Estabilidad de la actividad a pH y temperatura. Estimación de la masa molecular. Efecto de inhibidores.....	99
8.4.5 Enzimas de <i>Trametes</i>	101
8.4.6 Mediadores.....	102
8.5 Decoloración.....	103
9. CONCLUSIONES.....	106

APÉNDICES

A. Clasificación de los colorantes por su uso según el World Bank Group...	108
B. Clasificación química de los colorantes de acuerdo a sus grupos funcionales y precursores, fórmulas generales y ejemplos.....	111
C. Nombres y fórmulas químicas de los sustratos enzimáticos y colorantes utilizados.....	119
D. Diferentes hongos de la podredumbre blanca reportados como degradadores de colorantes sintéticos.....	124
E. Índices de actividad ligninolítica y decolorante de los aislados en la Colección del Laboratorio de Enzimología.....	129
F. Protocolo de electroforesis en geles de poliacrilamida.....	133
G. Efecto decolorante de muestras de sobrenadantes de cultivos sobre diferentes colorantes.....	138
LITERATURA CITADA.....	142
RESUMEN BIOGRÁFICO.....	166

ARTICULO 1

ARTICULO 2

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Clases de colorantes sintéticos de acuerdo al Índice de Color (C.I.).....	21
II	Métodos fisicoquímicos disponibles para el tratamiento de agua de desecho colorida y sus ventajas y desventajas.....	25
III	Valores de los Índices de Actividad Ligninolítica y Decolorante en BF de los aislados en la Colección del Lab. de Enzimología..	57
IV	Índice de Actividades Ligninolítica y Decolorante para nuevos aislados.....	58
V	Resultados de la actividad ligninolítica sobre PR y decolorante sobre RBBR, AR44 y CV de 10 aislados, ensayada en los medios YMGA y TK.....	59
VI	Resultados de decoloración de 6 aislados sobre una gama amplia de colorantes en tres medios diferentes.....	60
VII	Resumen de los resultados de los ensayos en placa. Resultados con los aislados seleccionados y dos cepas de referencia sobre CV, AR44, CV y PR en dos medios de cultivo y sobre AR183, AG27, IN, OII, BBR, BK5 y ABF en tres medios de cultivo.....	61
VIII	Características diagnósticas específicas de los aislados nativos..	62
IX	Porcentajes de decoloración de RBBR, AR44 y CV obtenidos en cultivos sumergidos de LE95 y CS63.....	67
X	Porcentajes de decoloración obtenidos con muestras de 100 µl de cultivos de 12 días de BAD, LE13, LE95 y CS63.....	68
XI	Porcentajes de decoloración por extractos de cultivos de LE95 y CS63 (10 U Lac) sobre los colorantes RBBR, AR44 y CV (200 ppm) en ausencia (Testigo) y presencia de 10 mM de inhibidores enzimáticos después de 2 h.....	73

XII	Resultados de ensayos con diferentes sustratos y en presencia y ausencia de cofactores para confirmar el tipo de actividad presente en extractos crudos de cultivos de LE95 y CS63 en medio TK.....	75
XIII	Porcentajes de actividad Lac del concentrado de cultivo de CS63 y sus fracciones de pesos moleculares superior e inferior a 10 kDa.....	89
XIV	Clasificación de algunos colorantes por su tipo.....	115
XV	Resultados de decoloración por muestras de cultivos de las cepas de referencia <i>B. adusta</i> y <i>P. chryso sporium</i> y de los aislados nativos de LE95, CS63 y LE13.....	140

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema general del ciclo catalítico de peroxidasa	12
2	Ciclo catalítico de las lacasas	15
3 A	Actividad enzimática tipo Lac detectada en cultivos de LE95...	64
3 B	Actividad enzimática tipo MnP detectada en cultivos de LE95..	65
4	Actividad enzimática tipo Lac detectada en cultivos de CS63...	66
5	Curvas de disminución de absorbancia de los colorantes RBBR (1), AR44 (2) y CV (3) con muestras de cultivos de LE95 (A) y CS63 (B)	67
6	Decoloración de RBBR, AR44 y CV por muestras de cultivos de <i>B. adusta</i> , LE13, LE95 y CS63	69
7	Pérdida de color por diferentes colorantes debido a la acción de los sobrenadantes de CS63 y LE95	71
8	Efecto de la concentración de colorante y las unidades de actividad tipo lacasa de cultivos de CS63 en el proceso de decoloración del OII	72
9	Curvas de actividad lacasa y producción de biomasa de <i>Trametes hirsuta</i> CS63 a lo largo de 30 días de cultivo en medio Tien y Kirk modificado	74
10	Curvas de actividad lacasa en cultivos de <i>T. hirsuta</i> CS63 a lo largo de 30 días de cultivo en medio Tien y Kirk modificado y efecto decolorante de sus extractos crudos sobre 4 colorantes	74
11	Análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% de la actividad decolorante	77
12	Análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% de los principios decolorantes	78
13	PAGE nativos de lacasas de LE95 (A) y CS63 (B)	79

Figura		Página
14 A	Curvas de actividad enzimática tipo Lac de CS63 en función del pH.....	80
14 B	Curvas de actividad enzimática tipo Lac en función del pH de LE95.....	80
15	Curvas de actividad enzimática tipo Lac de CS63 y LE95 en función del pH.....	81
16 A	Curvas de actividad enzimática tipo Lac de CS63 y LE95 en función de la temperatura.....	82
16 B	Curvas de actividad enzimática tipo Lac de CS63 y LE95 en función de la temperatura.....	82
17 A	Curvas de estabilidad de la actividad enzimática tipo Lac en función de la temperatura de CS63.....	83
17 B	Curvas de estabilidad de la actividad enzimática tipo Lac en función de la temperatura de LE95.....	83
18 A	Curvas de estabilidad de extractos de cultivos de CS63 en BF a diferentes valores de pH.....	84
18 B	Comportamiento de la actividad Lac de extractos crudos de cultivos de CS63 en BF a diferentes valores de pH a los 60 min de incubación.....	85
19 A	Curvas de estabilidad de extractos crudos de cultivos de LE95 en BF a diferentes valores de pH.....	85
19 B	Comportamiento de la actividad Lac para extractos crudos de cultivos de LE95 en BF a los 60 min de incubación a diferentes valores de pH.....	86
20	Efecto de diferentes concentraciones de EDTA sobre la actividad enzimática tipo Lac en extractos crudos de cultivos en medio BF.....	87
21	Efecto de diferentes concentraciones de Ácido tioglicólico sobre la actividad enzimática tipo Lac en extractos crudos de cultivos en medio BF.....	87
22	Efecto de diferentes concentraciones de Azida de Sodio sobre la actividad enzimática tipo Lac en extractos de cultivos en medio BF.....	88

Figura		Página
23	Espectros de decoloración de AG27 obtenidos con extractos crudos de cultivos de CS63 y sus fracciones superior e inferior a 10 kDa.....	90
24	Porcentajes de color residual de AG27 obtenidos en mezclas de reacción con extractos crudos de cultivo de CS63 y sus fracciones superior e inferior a 10 kDa.....	91

LISTA DE APÉNDICES

Apéndice		Página
A	Clasificación de los colorantes por su uso según el World Bank group	108
B	Clasificación química de los colorantes de acuerdo a sus grupos funcionales y precursores, fórmulas generales y ejemplos	111
C	Nombres y fórmulas químicas de los sustratos enzimáticos y colorantes utilizados	119
D	Diferentes hongos de la podredumbre blanca reportados como degradadores de colorantes sintéticos.....	124
E	Indices de actividad ligninolítica y decolorante (I_{AL} y D) de los aislados nativos en la Colección del Laboratorio de Enzimología de la Facultad de Ciencias Biológicas.....	129
F	Protocolo de electroforesis en geles de poliacrilamida.....	133
G	Efecto decolorante de muestras de sobrenadantes de cultivos sobre diferentes colorantes.....	138

NOMENCLATURA

AAP	4-aminoantipirina
ABF	Colorante Azul de Bromofenol
ABTS	Sal de amonio del ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
AG27	Colorante Verde Ácido 27
APS	Persulfato amónico
AR 44	Colorante Rojo Ácido 44
AR183	Colorante Rojo Ácido 183
AV	Alcohol veratrílico (alcohol 3,4-dimetoxibencílico)
BAD	<i>Bjerkandera adusta</i>
BF	Medio lignocelulósico Bran Flakes ^(MR) diseñado por Pickard <i>et al.</i> (1999)
BK5	Colorante Negro Reactivo 5
BBR	Colorante Azul Brillante Reactivo
CV	Colorante Cristal Violeta
DMAB	Ácido 3-dimetilaminobenzoico
DMOP	2,6-dimetoxifenol
DCP	2,4-diclorofenol
ϵ	Coefficiente de extinción molar
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EML	Enzimas modificadoras de la lignina

GUA	Guayacol
GLOX	Glioxal oxidasa
h	Horas
HBT	1-hidroxibenzotriazol
HPB	Hongos causantes de la podredumbre blanca de la madera
I _{AlyD}	Índice de Actividad Lignolítica y decolorante
IN	Colorante Índigo Carmín
ITS	Región del espaciador transcrito internamente situada entre los genes 28S y 18S del DNA ribosomal
Kcat	Constante catalítica o número de recambio
kDa	Kilo Dalton
Km	Constante de Michaelis-Menten
kg	Kilogramo
KM	Medio de Kirk modificado
l	Litros
Lac	Lacasa
LiP	Lignino peroxidasa
M	Mol
MBTH	3-metil 2-benzotiazolina hidrazona
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimoles
μM	Micromoles
MnP	Manganeso peroxidasa

mV	Mili voltios
nm	Nanómetros
OA	Ortoanisidina
OII	Colorante Naranja II
%	Por ciento
°C	Grados centígrados
<i>Pch</i> o PCH	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
pH	Potencial de hidrógeno (-log [H ⁺])
pI	Punto isoelectrico
PR	Colorante Polimérico R-478
ppm	Partes por millón (mg/l)
RBBR	Colorante Azul Brillante de Remazol Reactivo
RB5	Colorante Negro Reactivo 5
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
P/V	Peso sobre volumen
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SEML	Sistema de enzimas modificadoras de lignina
sp.	Especie no determinada
SYR	Siringaldazina (3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzaldeidazina)
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil-etilendiamina
TK	Medio a base de sales diseñado por Tien y Kirk (1988)
UI	Unidades Internacionales
UV	Ultravioleta
YMGA	Medio en agar de extracto de malta, levadura y glucosa

RESUMEN

En México, las industrias productoras y consumidoras de colorantes sintéticos contribuyen al problema de contaminación ambiental con sus efluentes. Anualmente las industrias textil y del cuero vierten 4,880 Ton de colorantes a los ríos. Los tratamientos físicos y químicos de sus efluentes con colorantes recalcitrantes, potencialmente tóxicos y carcinogénicos son costosos e ineficientes, por lo que la biorremediación microbiana mediante hongos lignolíticos surge como un método alternativo o complementario a ellos. El sistema oxidativo de los *hongos del grupo de la podredumbre blanca de la madera* (HPB) es eficaz para degradar los colorantes y disminuir su toxicidad. La fisiografía de Nuevo León posee una cobertura vegetal que permite una gran diversidad micológica, por esta razón se buscaron y aislaron HPB nativos, cuyo sistema enzimático modificador de la lignina fuera capaz de degradar colorantes modelo de los grupos químicos comúnmente usados en la industria textil. En una primera selección utilizando un sistema de detección en placa con sustratos que revelan oxidasas y peroxidasas (o-anisidina y guayacol) e indican la capacidad depolimerizante (Poly R478) y decolorante sobre 3 colorantes de los grupos azo, antraquinónico y trifenilmetano, se analizaron 109 aislados nativos y 10 de ellos se sujetaron a una segunda selección en placa probando su capacidad decolorante en un medio completo (YMGA) y otro limitado en nutrientes (Tien y Kirk) sobre 7 colorantes (200 ppm) pertenecientes a los grupos químicos indigoide, antraquinónico, trifenilmetano y azo. Seis aislados CU1, CS5, LE13, LE95, CS63 decoloraron mejor que las cepas de referencia: *P. chrysosporium*, *B. adusta* y *P. ostreatus*. Mediante ensayos de espectrofotometría con sustratos específicos para determinar la actividad enzimática y asociarla a la decoloración en cultivos sumergidos y sus muestras, así como análisis simultáneos de las actividades enzimática y decolorante mediante zimogramas en PAGE y análisis de masa relativa en SDS-PAGE, se determinó que la actividad decolorante tanto en *Trametes trogii* CS63 como en *T. pubescens* LE95 se debe a lacasas monoméricas que son estables a valores de pH alrededor de la neutralidad y temperaturas inferiores a 60°C y cuyas actividades son óptimas entre 50 y 80°C, pero son inhibidas efectivamente por la azida de sodio y el ácido tioglicólico aunque solo parcialmente por el EDTA. Que en LE95 presenta varias isoformas con masa molecular entre los 48 y 105 kDa y óptimo de pH a 3.5 y en CS63 posee masa molecular de 45 kDa, pH óptimo de 4 y no necesitó mediadores para decolorar, aunque con el sintético hidroxibenzotriazol, incrementó ligeramente su capacidad. Todos estos resultados sugieren que la capacidad decolorante de las cepas estudiadas reside en lacasas de alto potencial redox con capacidad de oxidar una amplia gama de colorantes sintéticos.

ABSTRACT

The manufacturing and consumer industries of synthetic dyes in Mexico contribute to the problem of environmental pollution owing to their effluents. Annually, the textile and leather industries dump 4880 tons of dyes to rivers. The physical and chemical treatment of their effluents containing recalcitrant, potentially toxic and carcinogenic dyes are expensive and inefficient, for this reason the microbial bioremediation using ligninolytic fungi emerges as an alternative or complementary process. The oxidative system of wood white rot fungi (WRF) efficiently degrades dyes, reducing also their toxicity. The physiography of Nuevo Leon has a vegetation cover which maintains a great fungal diversity, for this reason native WRF were searched and isolated looking for those having an enzymatic lignin modification system capable to degrade model dyes from chemical groups commonly used in the textile industry. In a first selection over 109 isolates, using a plate detection system with substrates revealing oxidases and peroxidases (o-anisidine and guaiacol) and evaluating depolymerization (Poly R478) and decolorization activities over the dye chemical groups anthraquinonic, triarylmethane and azo, ten isolates were chosen and passed to a second testing of their decolorizing ability over seven dyes (200 ppm) of the chemical groups indigoid, anthraquinonic, triphenylmethane and azo, on two different media: complete (YMGA) and nutrient limited (Tien and Kirk). Six isolates exhibited a better decolorization than the reference strains *P. chrysosporium*, *B. adusta* and *P. ostreatus*. Spectrophotometric assays with specific substrates to determine the enzymatic activity and associate this to decolorization in submerged cultures and their cell free samples, together with simultaneous analysis of the enzymatic and decolorizing activities by zymograms on PAGE and molecular weight analysis by SDS-PAGE, all three served to determine that decolorizing activity both in *Trametes trogii* CS63 and *T. pubescens* LE95 is due to monomeric laccases which retain their stability around neutral pH values and temperatures below 60°C and whose optima activities occur between 50 and 80°C, but are effectively inhibited by sodium azide and tioglycolic acid but only partially by EDTA. The laccase of LE95 shows several isoforms with molecular masses between 48 and 105 kDa and activity optimum at pH 3.5. That of CS63 has a molecular mass of 45 kDa, an optimum of activity at a pH of 4 and didn't required mediators to decolorize, but the synthetic mediator 1-hydroxibenzothiazol increased slightly its capability. All these results strongly suggest that the decolorizing ability of the studied strains resides in high redox potential laccases, capable to oxidize a variety of synthetic dyes.

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos pertenecen al Reino fungi y comparten como característica distintiva la alimentación osmotrófica, que implica la digestión enzimática extracelular del alimento y la absorción por difusión o pinocitosis de sustancias simples. Dentro de los hongos existe un grupo que causa la pudrición blanca de la madera, cuyo sustrato natural es la lignina. Este grupo fisiológico comprende principalmente basidiomicetos y algunos géneros de ascomicetos de la familia Xylariaceae. La lignina es un polímero aromático heterogéneo tridimensional que contiene varias uniones bioquímicamente estables éter y carbón-carbón entre unidades monoméricas de fenilpropano. La capacidad para degradar este polímero complejo radica en el empleo de un proceso mediado por enzimas inespecíficas, las cuales no requieren un ajuste estérico enzima sustrato, sino actúan por medio de agentes oxidantes intermediarios de bajo peso molecular, que difunden entre las estructuras complejas, rompiendo enlaces dentro de las macromoléculas que resultan inaccesibles a otro tipo de enzimas. Los mecanismos inespecíficos usados por estos hongos les permiten degradar una amplia gama de especies químicas que se asemejan a la lignina o sus derivados. Dentro de estas se cuentan xenobióticos de limitada solubilidad en agua y cuya absorción a la materia particulada los hace poco susceptibles al metabolismo bacteriano intracelular. Ejemplos de estos compuestos recalcitrantes son el DDT, lindano, bifenilos policlorados (PCBs), TNT, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) y colorantes azo, antraquinoides y trifenilmetano.

Existen más de 10,000 colorantes comerciales disponibles para la industria textil, la cual consume grandes cantidades de agua y químicos durante el proceso de teñido y produce finalmente efluentes que contienen los colorantes, que consisten de compuestos complejos, sintéticos y además frecuentemente recalcitrantes, debido a que están diseñados para ser resistentes a la luz, al agua, a agentes oxidantes y por tanto son difíciles de degradar una vez que son liberados a los sistemas acuáticos. Actualmente hay una preocupación creciente sobre la liberación de colorantes sintéticos o efluentes pigmentados al ambiente por las industrias textil y de pigmentos. Esto se debe principalmente a dos razones: la primera es que

estéticamente aún la presencia de muy bajas concentraciones de colorante es muy evidente e indeseable y la segunda es que pone en riesgo la salud humana, ya que el cromóforo o sus productos de degradación son potencialmente tóxicos y si forman aminas aromáticas incoloras en condiciones anaerobias, se tornan carcinogénicos. Los tratamientos convencionales de los efluentes para remover los colorantes emplean métodos físicos y químicos, los cuales frecuentemente son costosos, ineficientes, complicados y en ocasiones sólo precipitan el colorante, transfiriendo el contaminante a los lodos residuales, sin degradarlo, por lo que no remedian el problema de contaminación.

Una ventaja que ofrece la inespecificidad de sustrato de las enzimas lignolíticas, es que pueden degradar una amplia variedad de compuestos xenobióticos recalcitrantes a dióxido de carbono y agua sin que el hongo haya tenido un contacto previo o inducción, otra ventaja es su carácter extracelular, que permite a los hongos tolerar concentraciones más altas de contaminante. Dentro de los compuestos que pueden degradar se encuentran los colorantes y el estudio del proceso ha generado una línea de investigación sobre la aplicación de estos sistemas fúngicos para la bioremediación de efluentes de las industrias que utilizan o fabrican colorantes. La magnitud del problema de contaminación por colorantes y pigmentos en nuestro país se hace patente al considerar que las industrias textil y del cuero en México liberan por la ineficiencia del proceso de teñido alrededor de 4,800 Ton anuales de colorantes a los efluentes y los tratamientos actuales remueven solamente un 10% de esta carga. Los colorantes reactivos pueden permanecer en el ambiente hasta 46 años, lo cual representa un riesgo para la salud en ciudades donde se concentran estas industrias en nuestro país.

La posibilidad de encontrar hongos ligninolíticos con una capacidad de degradar colorantes superior a la de las cepas tomadas como referencia en la literatura científica habitando las maderas duras de la vegetación de Nuevo León, aunado a la cantidad de colorantes que se consumen en México y los riesgos ambientales y de salud intrínsecos a su empleo, fueron el fundamento para esta investigación, en la cual se colectaron Basidiomicetos en diferentes localidades del Estado, sus micelios vegetativos se aislaron y purificaron y su capacidad de degradar colorantes pertenecientes a distintos grupos estructurales fue ensayada en placas, para finalmente seleccionar la cepa de mejor desempeño, a la cual se caracterizó los principios químico-enzimáticos responsables de la actividad decolorante.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

Las empresas que fabrican colorantes o los utilizan en procesos de tinción comúnmente descargan en sus aguas residuales de un 10 al 50% de la cantidad del colorante que utilizan.

La contaminación por colorantes ocasiona cambios en el color del agua, aumenta el material particulado en suspensión, la demanda de oxígeno y representa un peligro potencial para la salud de la población, debido al carácter carcinogénico de sus moléculas.

Los tratamientos físicos y químicos para remover los colorantes son ineficientes o costosos y la tendencia actual es combinarlos con microorganismos que pueden degradar estas moléculas sintéticas.

En México y particularmente en Nuevo León, existe una gran diversidad de hongos causantes de la podredumbre blanca de la madera que poseen esta capacidad, lo cual justifica la búsqueda de cepas potencialmente útiles en procesos de biorremediación de efluentes contaminados por colorantes. La importancia de este estudio radica en haber encontrado y aislado dos cepas nativas, *T. pubescens* (LE95) y *T. trogii* (CS63) que mostraron mayor eficiencia decolorante que las citadas internacionalmente como referencia y haber caracterizado en ambas a la lacasa como enzima responsable de la decoloración de colorantes modelo. Esto constituye un primer paso hacia el desarrollo de patentes nacionales en procesos de reutilización del agua, actualmente uno de los temas prioritarios del país.

3. HIPÓTESIS

En Nuevo León existen hongos que por procesos oxidativos biocatalíticos son capaces de degradar colorantes que son contaminantes de aguas residuales industriales y su capacidad es igual o superior a la mostrada por las cepas internacionalmente reconocidas como útiles en biorremediación.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Caracterizar los principios químico-enzimáticos implicados en la actividad decolorante de los aislados nativos con mejor desempeño.

4.2 Objetivos Particulares

4.2.1 Seleccionar del cepario micológico del laboratorio de enzimología y de nuevos aislados, los que tengan mejor capacidad ligninolítica y decolorante.

4.2.2 Ensayar la capacidad decolorante de los aislados seleccionados en el punto anterior en una mayor diversidad de colorantes sintéticos.

4.2.3 Seleccionar los aislados con mejor desempeño decolorante para caracterizar los principios químico-enzimáticos implicados en este proceso.

5. ANTECEDENTES

5.1 Generalidades de hongos.

Los hongos verdaderos se agrupan en el Reino Fungi o Eumycota y son organismos eucariotas heterótrofos que presentan su material genético estructurado en cromosomas, digestión extracelular y nutrición saprótropa, algunos son unicelulares pero la mayoría son pluricelulares, de aspecto comúnmente filamentoso y con paredes celulares compuestas de quitina y β -glucanos, presentan ribosomas 80S y producen esporas en alguna etapa de su ciclo vital (Carlile *et al.*, 2001). Algunos grupos anteriormente considerados dentro del Reino Fungi han sido segregados a partir de 1994 a los Reinos Protista (Myxomycota, Plasmodiomycota, Dictyosteliomycota, Acrasiomycota) o Chromista (Oomycota, Hyphochytriomycota, Labyrinthulomycota), basándose en la presencia de celulosa en la composición química de sus paredes celulares, una forma diferente a la placoide en sus crestas mitocondriales, la presencia de pelos tripartitas en el flagelo de las esporas, la ausencia de ergosterol en la membrana plasmática, la utilización de un precursor diferente al ácido aminopimélico en la síntesis de lisina y otras evidencias moleculares (Kirk *et al.*, 2001; Hawksworth, 1991).

Así, los hongos comprenden actualmente cuatro phyla que se reconocen entre sí por el tipo de esporas que producen: Los Chytridiomycota, son formas acuáticas cuyas esporas son realmente gametos móviles (zoosporas) provistos generalmente de un solo flagelo posterior en forma de látigo (opistoconte). Los Zygomycota poseen la cigospora, una estructura de resistencia producto de la fusión de dos hifas diferenciadas en gametangios. Los Ascomycota son el phylum más numeroso y sus esporas sexuales se desarrollan dentro de estructuras en forma de sacos alargados o

ascos. Los Basidiomycota producen sus esporas sexuales en el exterior de filamentos o hifas especializadas, ensanchadas hacia la punta, llamadas basidios (Carlile *et al.*, 2001; Kirk *et al.*, 2001). El análisis filogenético basado en evidencias fósiles, moleculares y métodos cladísticos sitúa el origen del Reino Fungi un billón de años atrás, en un ancestro común a plantas, hongos y animales, de cuya línea se separaron temprano las plantas y posteriormente, hace 965 millones de años, los hongos y animales. Los phyla Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota surgieron en el periodo Cambriano hace 550 millones de años (mda) de los Chytridiomycota, separándose los Ascomycota de los Basidiomycota hace alrededor de 400 millones de años, después que las plantas invadieron exitosamente la tierra hace 460 mda [este hecho posiblemente gracias a asociaciones micorrícicas con miembros de los Glomales (Zigomycota)]. En base al registro fósil, se ha hipotetizado que todas las clases y familias actuales aparecieron sucesivamente entre los periodos Cambriano (550 mda) y Terciario (2 mda) alcanzando una gran diversidad en el Carbonífero (360 mda); el hallazgo de hifas fosilizadas con la presencia de fíbulas indica que para entonces los Basidiomycota ya habían evolucionado (Guarro *et al.*, 1999). La habilidad para degradar o modificar la lignina enzimáticamente se originó paralelamente con la evolución de las plantas vasculares en el periodo Devónico Superior (385 mda) (Martínez *et al.*, 2005). En el Jurásico ocurrió una radiación en los ascomicetos y basidiomicetos (200-220 mda), que coincide con la aparición de las angiospermas, originándose en el segundo grupo los agaricoides y poroides. Los primeros evolucionaron en el Cretácico (144 mda) y en el Cenozoico (66 mda) aparecen los primeros cuerpos fructíferos en forma de sombrillas, costras, repisas y esferas (Hass *et al.*, 1994; Remy *et al.*, 1994a, b; Taylor *et al.*, 1994).

5.2 Ligninólisis y biorremediación.

5.2.1 Madera, lignina y ligninólisis.

Los hongos contribuyen al reciclaje del carbono y nitrógeno en la naturaleza al participar en la descomposición de la materia orgánica. Aunque esta actividad

también la realizan las bacterias, el reciclaje del carbono contenido en la madera, es una responsabilidad que cumplen principalmente los hongos. Cada año millones de toneladas de madera son producidas en los bosques del mundo y deben ser descompuestas. La vida como la conocemos se estancaría por la ausencia de dióxido de carbono en alrededor de veinte años si la destrucción de la madera cesara mientras la fotosíntesis continuara (Kirk y Cowling, 1984). La madera de las plantas leñosas tiene su origen en el cambium secundario, el cual origina las traqueidas y vasos xilemáticos, que mueren a los días o semanas de formados debido al engrosamiento e impermeabilización de sus paredes celulares. Estas estructuras vasculares pierden su contenido celular para transportar mejor el agua y sales minerales y cuando maduran consisten casi exclusivamente de paredes celulares formadas por microfibrillas de celulosa, inmersas en una matriz de hemicelulosas y rodeadas por lignina. La celulosa y la lignina son los dos polímeros naturales más abundantes del planeta. La lignina suma el 35% del peso de la madera, le proporciona rigidez y la vuelve impermeable y resistente al ataque microbiano (Cohen *et al.*, 2002).

La lignina es un polímero aromático heterogéneo, complejo, variable, hidrofóbico, de enlaces cruzados que forma una red tridimensional que contiene varias uniones éter (C-O-C) y carbón-carbón (C-C) bioquímicamente estables, entre unidades monoméricas *p*-hidroxifenilpropanoides dimetoxiladas (siringilo, S), monometoxiladas (guayacilo, G) y no metoxiladas (*p*-hidroxifenilo, H) derivadas de los correspondientes alcoholes *p*-hidroxicinámicos: sinapílico, coniferílico y cumarílico. La copolimerización mediante radicales libres produce alrededor de 10 tipos de enlaces interfenilpropano entre los alcoholes, entre los que predominan el β -O-4 (>50%) y β -1. Reacciones secundarias en el proceso de polimerización llevan al entrecruzamiento entre lignina y hemicelulosas (Kirk, 1987; Martínez *et al.*, 2005). Esta estructura insoluble, no repetitiva y no estereo selectiva, la hace extremadamente resistente a la degradación química y enzimática y requiere un proceso de degradación inespecífico, extracelular y oxidativo (Higson, 1991; Kirk and Farrell, 1987).

Los tres mecanismos biológicos que han evolucionado para superar la barrera de la lignina son: 1) la destrucción mecánica, en la que la madera es reducida a astillas, quedando expuestas la celulosa y hemicelulosa y disponibles para la descomposición químico-enzimática por microorganismos de vida libre o comensales del tracto digestivo; es realizada por insectos, aves, organismos marinos

y algunos mamíferos al utilizar la madera como refugio, alimento o ambos, 2) la degradación oxidativa, que es un proceso inespecífico que algunos microorganismos, principalmente hongos superiores, utilizan para descomponer la lignina, dejando expuestos los polisacáridos, 3) la descomposición por mediadores, realizada por agentes no enzimáticos depolimerizantes de celulosa que son lo suficientemente pequeños para atravesar la vaina de lignina y son secretados por otros hongos superiores (Kirk y Cowling, 1984).

Los hongos xilótrofos recurren a alguno de estos dos últimos mecanismos para degradar la madera y aunque pertenecen a diferentes grupos taxonómicos, pueden agruparse en uno de tres grupos fisiológicos, en función del tipo de pudrición que causan: blanca, parda o suave. En las pudriciones blandas y pardas la celulosa y hemicelulosas de la pared celular son degradadas, mientras la lignina es solo ligeramente modificada. La pudrición parda es causada exclusivamente por basidiomicetos que atacan maderas blandas (gimnospermas), representan solamente el 7% de las especies de basidiomicetos que pudren la madera. La pudrición blanda, es causada principalmente por ascomicetos, deuteromicetos y algunas bacterias (ocasionalmente basidiomicetos) que afectan generalmente maderas duras (angiospermas). La pudrición blanca es causada principalmente por basidiomicetos, algunos ascomicetos de la familia Xylariaceae y ciertos actinomicetos (Martínez *et al.*, 2005). A los hongos causantes de la pudrición blanca se les considera los agentes de degradación de la lignina más rápidos y eficientes, pues son capaces de mineralizar los componentes de la lignina a dióxido de carbono y agua (Schmidt, 2006; Higson, 1991) y pueden provocar dos tipos de pudrición blanca: la simultánea, en la que los tres componentes de la pared celular son degradados al mismo tiempo (maderas duras) o la selectiva, en la que hay un ataque inicial sobre hemicelulosas y lignina (maderas duras y blandas) y posteriormente una degradación de la celulosa (Blanchette, 1984). Las tres pudriciones reciben su nombre del aspecto y consistencia que causan en la madera (Martínez *et al.*, 2005).

5.2.2 El Sistema de Enzimas Modificadoras de Lignina (SEML), componentes y mecanismo de acción.

La importancia de la madera y otros materiales lignocelulósicos como un recurso abundante y renovable para la producción de productos de papel, alimentos, químicos y combustibles, despertó el interés por conocer el mecanismo de la degradación de la lignina de los hongos causantes de la podredumbre blanca de la madera (HPB) y las investigaciones en este campo condujeron por separado a dos grupos de trabajo diferentes, al descubrimiento de los sistemas enzimáticos modificadores de la lignina a mediados de los ochentas (Tien y Kirk, 1983; Glenn *et al.*, 1983; Glenn y Gold, 1985).

Los HPB secretan una o más de tres familias de enzimas glicosiladas extracelulares, conocidas como enzimas modificadoras de lignina (EML) y que se combinan con otros procesos para mineralizar la lignina. Al depolimerizarla, los productos solubilizados son absorbidos por las células fúngicas y metabolizadas a intermediarios del ciclo de Krebs y finalmente a dióxido de carbono (Higson, 1991), a este proceso se le ha nombrado combustión enzimática (Kirk y Farrel, 1987). Las enzimas comprenden principalmente a dos hemoperoxidasas, la lignino peroxidasa (LiP, EC 1.11.1.14) y la peroxidasa dependiente de manganeso (MnP, EC 1.11.1.13) y una cupro-fenoloxidasas, la lacasa (Lac, EC 1.10.3.2). Algunos autores han reportado también una peroxidasa versátil (VP) (Camarero *et al.*, 1999) con propiedades oxidativas de ambas peroxidases y una actividad MnP independiente del manganeso (Eggert *et al.*, 1996).

La producción de las EML ocurre durante el metabolismo secundario y generalmente es inducida por una limitación de nitrógeno y es óptima a tensiones altas de oxígeno, en el caso de la Lac es favorecida por agitación. Las tres enzimas principales son codificadas por familias de genes que producen múltiples isoformas y que están sujetas a una regulación compleja (Garg y Modi, 1999; Manssur *et al.*, 1997; Pointing, 2001; Thurston, 1994; Yaver y Golightly, 1996).

Hatakka (1994), agrupó a los hongos de la podredumbre blanca en tres categorías, dependiendo de las enzimas ligninolíticas que producen: Grupo LiP-MnP (*P. chrysosporium* y *Phlebia radiata*), Grupo MnP-Lac (*Dichomitus squalens* y *Rigidoporus lignosus*) y Grupo LiP-Lac (*Phlebia ochraceofulva*, *Junghuhnia*

separabilima). Siendo más frecuente la presencia de la combinación MnP-Lac. (Galiano *et al.*, 1991). Recientemente ha surgido un nuevo grupo en cuyos miembros solamente se presenta actividad lacasa (*Pycnoporus cinnabarinus*, *Coriolopsis gallica*).

Las peroxididasas requieren la presencia de peróxido de hidrógeno para oxidar la lignina y los compuestos relacionados a ella, por lo que existen otras enzimas extracelulares implicadas en la degradación de la lignina incapaces de degradarla por si solas. El peróxido lo aportan oxididasas generadoras de H₂O₂ como la súper óxido dismutasa (E.C. 1.15.1.1) y la glioxal oxidasa (E.C. 1.2.3.5) y además existen deshidrogenasas asociadas al micelio, que reducen los compuestos derivados de la lignina, como las aril alcohol deshidrogenasas (AAD) y las quinona reductasas (QR) y enzimas implicadas en mecanismos de regulación que sirven para unir vías de degradación de celulosa como la glucosa oxidasa (E.C. 1.1.3.4), la aril-alcohol oxidasa (AAO, E.C. 1.1.3.7) que también genera peróxido, la celobiosa: quinona oxidoreductasa (E.C. 1.1.5.1) y la celobiosa deshidrogenasa (E.C. 1.1.99.18) (Leonowicz *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 2005).

Las LiPs o ligninasas, poseen una masa molecular entre 38 y 43 kDa y un pI de 3.3 a 4.7 (Pérez *et al.*, 2002). Gracias a su alto potencial redox pueden catalizar la oxidación de sustratos con un potencial superior a 1.2 mV (Kersten *et al.*, 1990; Millis *et al.*, 1989; Schoemaker *et al.*, 1994) como compuestos fenólicos y no fenólicos, aminas, éteres aromáticos y aromáticos policíclicos. Su ciclo catalítico es similar al de otras peroxididasas (Fig. 1.), donde la enzima férrica es oxidada primero por peróxido de hidrógeno para generar el compuesto I (un estado intermedio oxidado de la enzima, causado por la pérdida de dos electrones, uno por el Fe⁺³ y otro por el anillo de porfirina).

El compuesto I es reducido en dos etapas, en la primera un electrón donado por una molécula sustrato, produce ambos, un radical libre y el compuesto II (que es un intermediario enzimático Fe⁺⁴). El ciclo catalítico es completado en la segunda etapa, cuando el compuesto II es reducido por un electrón aportado por una segunda molécula sustrato (Mester y Tien, 2000). La reacción de la LiP con el peróxido de hidrógeno genera un radical catiónico porfirina (complejo oxiferril) de alto potencial redox que puede extraer un electrón de un anillo aromático de un sustrato (lignina) generando un radical catiónico aromático, esto es seguido por una variedad de reacciones espontáneas degradativas vía radical e intermediarios catiónicos. La

oxidación de metoxibencenos no fenólicos produce radicales catiónicos arilo y reacciones de demetoxilación, oxidación del alcohol bencílico, ruptura de enlaces

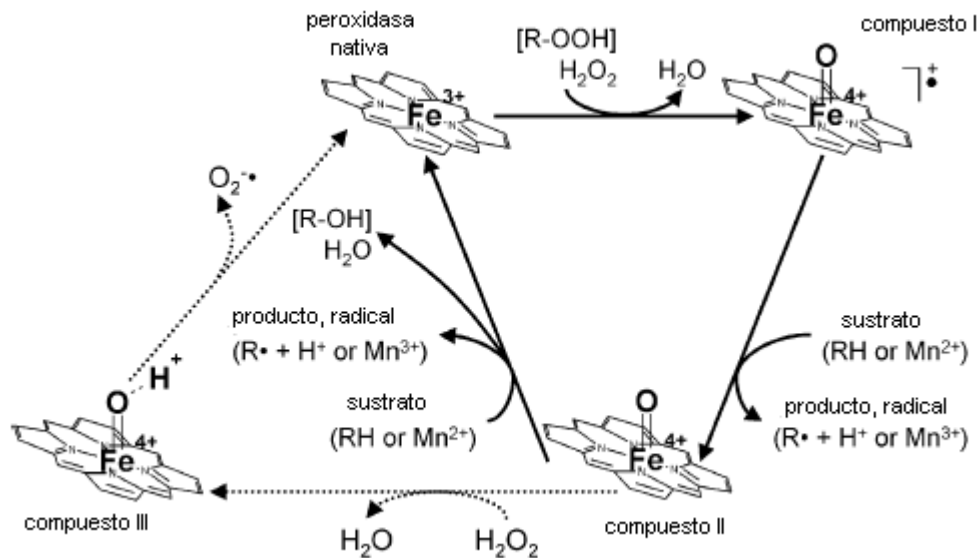


Fig. 1. Esquema general del ciclo catalítico de peroxidasas (Tomado de Wesenberg *et al.*, 2003).

carbón-carbón o hidroxilación de anillos aromáticos y cadenas laterales (Kirk y Farrel, 1987; Pérez *et al.*, 2002). La presencia de alcohol veratrílico (alcohol 3,4-dimetoxibencílico, AV) endógeno, ayuda en la regeneración de la enzima, la protege de inactivación por H_2O_2 y permite la oxidación de sustratos que la LiP no oxida por si sola. La LiP oxida el AV y este a su vez sustrae un electrón de núcleos aromáticos no fenólicos, generando radicales catiónicos arilo. Este radical lleva a cabo reacciones de oxidación del alcohol bencílico, ruptura de enlaces carbón-carbón, hidroxilación, dimerización y polimerización de fenoles y desmetilación (Koduri y Tien, 1995; Pointing, 2001) degradando productos alifáticos y aromáticos no enzimáticamente, los que son mineralizados intracelularmente.

Las MnPs son molecularmente similares a las LiPs, pero tienen masas moleculares ligeramente más elevadas que van de 38-62.5 kDa predominando las de 45 kDa. Sus isoformas poseen generalmente puntos isoeléctricos ácidos (pI 3-4). Las producen hongos de la pudrición blanca de la madera (Familias Meruliaceae, Coriolaceae, Polyporaceae) y del mantillo (Strophariaceae, Tricholomataceae) (Hofrichter, 2002). Tienen un ciclo típico de hemoperoxidasas (Fig. 1) que incluye la enzima férrica nativa y los compuestos I y II, pero este último requiere Mn (II) para

ser reducido y completar el ciclo catalítico. Así, el Mn (III) formado en presencia de H₂O₂ es estabilizado formando quelatos estables con algún ácido orgánico (como el oxálico o el malónico) y actúa como un mediador redox difusible de bajo peso molecular capaz de atacar de forma inespecífica moléculas orgánicas vía abstracción de hidrógeno y un electrón. La MnP es una enzima oxidante de fenoles, las estructuras no fenólicas no son susceptibles de oxidación vía el ataque directo por los quelatos de Mn⁺³ con ácidos carboxílicos. La oxidación de estas estructuras se ha explicado vía formación de radicales reactivos tiilo (S•) y peroxilo (ROO•) a partir de compuestos orgánicos azufrados (glutatión, L-cisteína) y ácidos grasos insaturados y sus derivados (linolénico, Tween 80) respectivamente, que actúan como mediadores co-oxidantes (Paszczynski *et al.*, 1986; Wariishi *et al.*, 1989; Wariishi *et al.*, 1992). Las VPs además de oxidar el Mn⁺² también oxidan compuestos fenólicos y no fenólicos aromáticos y se consideran formas híbridas de MnP y LiP. Así, su existencia demuestra la estrecha relación entre ambas enzimas (Hofrichter, 2002).

Las lacasas son comunes en plantas, hongos, insectos y bacterias (Gianfreda *et al.*, 1999). Mientras en plantas juegan un papel en la lignificación (Mayer, 1987), en los hongos desempeñan además del papel inverso, otros como la síntesis de pigmentos, morfogénesis de carpóforos y desintoxicación (Mayer y Staples, 2002). Son cupro-fenoloxidasas azules que contienen entre 520-550 residuos de aminoácidos y catalizan la oxidación de un gran número de compuestos fenólicos y aminas aromáticas usando oxígeno molecular como el aceptor de electrones, el cual es reducido a agua. Poseen masas moleculares entre 60-80 kDa, un pH óptimo entre 3 a 6 y un punto isoeléctrico entre 3-5. Su rango de glicosilación fluctúa entre 10-25% pero son frecuentes los valores más elevados (45%). La glicosilación además de su papel estructural le confiere protección proteolítica durante su acción extracelular. La presencia de isoenzimas en una misma especie de hongo es frecuente y estas pueden expresarse en diferentes cepas exhibiendo diferentes propiedades. La mayoría de las lacasas fúngicas son proteínas monoméricas, algunas son homodiméricas y existen las oligoméricas (Leonowicz *et al.*, 2001). El sitio activo de las lacasas incluye cuatro iones cobre. Los centros de cobre se identifican por sus propiedades espectroscópicas, el cobre T1 absorbe fuertemente la luz alrededor de 600 nm, el T2 absorbe débilmente en la región visible pero tiene actividad electrónica de resonancia paramagnética (EPR) y los dos iones de cobre del sitio T3

son silenciosos a la resonancia paramagnética del electrón y absorben la luz a 330 nm. Enzimas similares, que carecen del átomo de cobre responsable de la coloración, son llamadas lacasas “amarillas” o “blancas”, pero no se consideran lacasas verdaderas. La siringaldazina se considera el sustrato específico de la lacasa, siempre y cuando se excluya el peróxido de hidrógeno de la reacción. Las lacasas son altamente oxidantes, su potencial redox varía de 450 a 790 mV en diferentes especies. Su actividad óptima depende de la presencia de los 4 iones cúpricos (sobre todo el Cu¹) coordinados a una única cadena polipeptídica (Leonowicz *et al.*, 2001).

El cobre Tipo I (Fig. 2.) actúa como un aceptor de electrones de aminas o fenoles sustituidos y el cobre tipo II transfiere los electrones al aceptor final di-oxígeno, que se reduce a agua. Los dos cobres tipo III actúan como intermediarios en la vía de transporte de electrones, que también incluye un residuo de cisteína y dos de histidina. El ambiente molecular del cobre tipo I parece regular el potencial redox de la enzima (Martínez *et al.*, 2005). La diferencia en potencial redox entre un sustrato fenólico y el cobre T1 de la lacasa disminuye al incrementarse el pH, aumentando la velocidad de oxidación hasta que el incremento del anión hidróxido causa una inhibición de la lacasa al unirse a los átomos de cobre en los sitios T2/T3 (Xu, 1997).

El potencial redox del sitio T1 ha sido determinado contra el electrodo normal de hidrógeno para muchas lacasas utilizando diferentes mediadores y varía de 430 mV para el árbol *Rhus vernicifera* hasta 780 mV para la lacasa fúngica de *Polyporus versicolor*. La eficiencia catalítica de las lacasas (K_{cat}/K_m) para algunos sustratos reductores depende linealmente del potencial redox del cobre T1 (a mayor potencial del sitio T1 mayor la eficiencia catalítica). Este es el porqué las lacasas con un alto potencial redox en este sitio son de interés especial en biotecnología, por ejemplo, para procesos eficientes de blanqueo y biorremediación. El potencial del sitio T3 se ha determinado para lacasas de *R. vernicifera* y *P. versicolor* en 480 y 780 mV respectivamente. El potencial del sitio T2 es aproximadamente de 390 y 400 para cada una (Reinhammar, 1972; Reinhammar y Vänngård, 1971). Las lacasas se han clasificado en dos grupos, las de alto potencial redox comprenden aquéllas con potenciales alrededor de 730 mV como las de *T. versicolor*, *T. villosa*, *Rhizoctonia solani*, POXC y POXA1b de *Pleurotus ostreatus*, B y D de *Rigidosporus lignosus* y Lac 1 de C30, las de bajo potencial redox poseen potenciales de 390 a 560 mV como las de *Coprinus cinereus*, *Myceliophthora thermophila*, *Scytalidium thermophilum* y

Lac2 de C30 (Klonowska *et al.*, 2002; Shleev *et al.*, 2005). Debido a que el potencial redox de las lacasas es menor al de las peroxididasas (> 1200 mV), por mucho tiempo

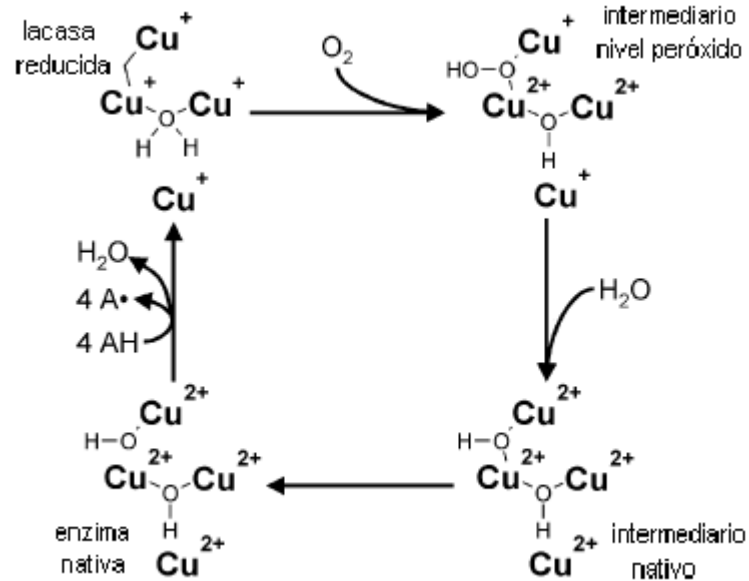


Fig. 2. Ciclo catalítico de las lacasas (tomado de Wesenberg *et al.*, 2003).

se pensó que solamente eran capaces de oxidar sustratos fenólicos (Kersten *et al.*, 1990). Sin embargo, esta barrera de 500 mV, se puede franquear en presencia de mediadores redox de bajo peso molecular naturales, como el 3-hidroxiantranilato y el siringaldehído o sintéticos como el ABTS, HBT y el ácido violúrico, permitiendo la oxidación de un mayor rango de sustratos, incluyendo los compuestos no fenólicos (Camarero *et al.*, 2005; Pérez *et al.*, 2002; Shah y Nerud, 2002). El núcleo fenólico se oxida por remoción de un electrón, generando un radical libre fenoxilo, capaz de promover la ruptura de polímeros (Thurston, 1994).

5.2.3 Evolución del sistema de enzimas modificadoras de lignina.

Es probable que los sistemas modificadores de la lignina extracelulares derivaran de sistemas de desintoxicación intracelulares. Se ha sugerido que la LiP surgió evolutivamente como un mecanismo de desintoxicación de los productos de la

desaminación de los aminoácidos aromáticos (por ejemplo en condiciones de reducción de oxígeno) o bien como un mecanismo de defensa contra las especies reactivas del oxígeno (estrés oxidativo) y que la función extracelular de ligninólisis se adquirió subsecuentemente. Esto se apoya en el hecho de que la formación de EML no coincide con la síntesis de hidrolasas de polisacáridos y en la ausencia de co-sustratos estos hongos no pueden utilizar la lignina como única fuente de carbono y energía. Además, los co-sustratos (alcohol veratrílico en *P. chrysosporium* y compuestos aromáticos metoxilados e hidroxilados en *B. adusta* y *P. eryngii*) son producidos solo en la idiofase, por la degradación protéica y en condiciones de baja concentración de nutrientes (nitrógeno y carbono). Por otra parte, la lignina no induce la síntesis enzimática, pero los productos de la descomposición de la madera como los ácidos p-hidroxicinámico y ferúlico, el p-hidroxibenzaldehído, p-hidroxibenzoato, la vainillina o el ácido vainílico si la estimulan y son precursores del veratrol y otros inductores aromáticos derivados de los ácidos benzóico y cinámico y del benzaldehído (Rabinovich *et al.*, 2004). La desintoxicación también se ha planteado como un papel que desempeñan las lacasas en los hongos (Mayer y Staples, 2002), esta teoría es apoyada por el hecho de que la presencia de colorantes y xenobióticos induce un incremento de su actividad en cultivos (Baldrian, 2004; Mougin *et al.*, 2002). Aunque al considerar el origen evolutivo, Hoeger *et al.* (2006) postulan que ancestralmente, en homobasidiomicetos existían múltiples lacasas, que se mantuvieron durante la diversificación y especiación, por la posible variabilidad de demandas de enzimas oxidativas en sus diferentes roles fisiológicos, como formación de cuerpos fructíferos, pigmentación, patogénesis, competencia, humificación y ligninólisis.

5.2.4 Contaminación por actividades humanas y biorremediación.

Las actividades industriales humanas como la producción de energía y el consumo de combustibles, la fabricación del papel, la producción y utilización de dieléctricos y acarreadores de calor, plastificantes y aditivos, aceites hidráulicos, diluyentes, agentes de defensa vegetales y colorantes, han llevado a la contaminación de la biosfera con compuestos sintetizados por el hombre, cuya estructura química es

poco frecuente o inexistente en la naturaleza. Ejemplos de estos xenobióticos son los hidrocarburos policíclicos condensados y compuestos aromáticos que contienen azufre, cloro y nitrógeno, poco solubles y altamente resistentes (Rabinovich *et al.*, 2004). El costo de limpieza de un solo sitio contaminado por estos compuestos puede variar entre 10-15 millones de dólares y en los Estados Unidos de Norteamérica, se estima que el costo total de remediación de desechos peligrosos podría llegar a ser de medio a un millón de millones de dólares ($0.5-1 \times 10^{12}$ dólares) (Aust y Benson, 1993). El peligro que representan para la salud y la necesidad de un mecanismo económico de recuperación de las áreas contaminadas ha incentivado la búsqueda de microorganismos capaces de degradarlos (Rabinovich *et al.*, 2004; Shah y Nerud, 2002). La reconocida capacidad de los hongos en general, de deteriorar metales, plásticos, drogas, cosméticos, pinturas, esculturas, productos de madera, equipo eléctrico, combustibles y aceites (biodeterioración) y la capacidad de los hongos de la podredumbre blanca de degradar compuestos xenobióticos recalcitrantes en particular, convirtiéndolos en compuestos inofensivos o reduciendo sus niveles de concentración por debajo de los límites permisibles gracias a su sistema ligninolítico, les ha merecido ser considerados como una opción viable en biorremediación (Bennet *et al.*, 2002; Paszcynski y Crawford, 2000).

5.2.5 Características del sistema de enzimas modificadoras de la lignina que favorecen su aplicación en biorremediación.

Las enzimas modificadoras de lignina son altamente inespecíficas respecto a su rango de sustratos, lo que les permite de una manera fortuita ser capaces de transformar o mineralizar *in vitro* un amplio rango de contaminantes orgánicos sintéticos extremadamente recalcitrantes, esta capacidad obedece a la similitud estructural de estos compuestos con la lignina o los productos de su degradación (Pointing, 2001).

Además de esta ausencia de especificidad, otras características del sistema de EML que lo hacen atractivo en procesos de biorremediación, incluyen: que no es inducible por la lignina o compuestos relacionados, por lo que no es necesario que el hongo entre en contacto con el contaminante para que lo reconozca y se adapte a el o

empiece a producir las enzimas, además, las concentraciones a que puede degradarlos pueden ser menores que las necesarias para inducir la síntesis de enzimas de otros organismos; las enzimas son extracelulares, lo que le permite oxidar sustratos de baja solubilidad a la vez que evita la necesidad de internar a la célula compuestos tóxicos, los cuales son oxidados en el ambiente circundante; las enzimas se expresan en condiciones de deficiencia de nutrientes, las cuales prevalecen en muchos suelos, las enzimas pueden utilizarse inmovilizadas en un soporte adecuado (como quitosan), lo que permite su reutilización y aumenta su estabilidad (Mester y Tien, 2000; Reddy, 1995; Shah y Nerud, 2002) y los hongos que las producen (HPB) son comunes en ambientes naturales, crecen fácilmente en subproductos agrícolas que son económicos y pueden agregarse fácilmente al sitio contaminado; el crecimiento apical de las hifas filamentosas le permite extenderse por el suelo y alcanzar el contaminante de una forma que las bacterias no podrían y pueden emplearse en el tratamiento de efluentes líquidos o en suelos (Reddy, 1995; Shah y Nerud, 2002; Robinson *et al.*, 2001). El sistema de EML es capaz de mineralizar una amplia variedad de xenobióticos tóxicos y mezclas de contaminantes vía un mecanismo de oxidación inespecífica basado en radicales libres (Kirk y Farrell, 1987; Barr y Aust, 1994).

5.2.6 Aplicaciones de los SEML

Hace casi 30 años que se descubrieron los sistemas de enzimas modificadores de la lignina (Kirk y Chang, 1981) e inmediatamente se reconoció su utilidad en la degradación de contaminantes ambientales (Bumpus *et al.*, 1985). Desde entonces las investigaciones se han intensificado y diversificado, con la expectativa de encontrar mejores sistemas degradadores de lignina, que pudiesen utilizarse exitosamente en diferentes procesos biotecnológicos (D'Sousa *et al.*, 1999). Algunos de ellos incluyen la producción de etanol (Lee, 1997), el desarrollo de sensores para distinguir drogas (morfina), la clarificación de vinos, su aplicación en procesos de tinción y decoloración de telas y cabello (Mayer y Staples, 2002; Arana *et al.*, 2002), el biopulpeo del papel, el mejoramiento de alimentos para rumiantes, la producción de adhesivos fenólicos (Cohen *et al.*, 2002), pero sobre todo los estudios se han

enfocado hacia la aplicación de estas enzimas en el desarrollo de procesos “suaves” de degradación de sustancias contaminantes recalcitrantes liberadas al medio por las actividades humanas, como explosivos (TNT, nitroglicerina, RDX, Yperita), pesticidas (DDT, aldrin, dieldrin, heptacloro, clordano, lindano, mirex, atrazina, texafeno, endosulfano, MCPA, 2,4-di-, 2,4,5- y 2,4,6-tri- y penta-clorofenoles) y subproductos de su fabricación o degradación (dioxinas y anilinas cloradas), hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs: antraceno, benzapireno, naftaleno y fenantreno), bifenilos policlorados (PCBs: usados como fluidos dieléctricos, hidráulicos o de transferencia de calor, retardantes de flama, diluyentes orgánicos, plastificantes o extendedores de solventes), compuestos halogenados de bajo peso molecular producto del blanqueamiento del papel (derivados clorados de guayacol y benzoato, lignosulfonatos y cloroligninas), polímeros estables (PVC, PVA, poliacrilato, poliacrilamida, policaprolactam y polietileno) y en los últimos años para la decoloración de efluentes contaminados con colorantes (Higson, 1991; Pointing, 2001; Paszczynski y Crawford, 1995; Reddy, 1995; Knapp y Newby, 1999; Mester y Tien, 2000; Rabinovich *et al.*, 2004).

5.2.7 Colorantes

El empleo del color ha acompañado al hombre a lo largo de la historia en sus manifestaciones artísticas, religiosas y en su vestido. El hombre de las cavernas utilizó colorantes naturales en sus pinturas rupestres y desde entonces su evolución tecnológica ha ido a la par con la historia de la humanidad y su desarrollo comercial. En Egipto el teñido de fibras textiles se practicaba ya hace más de 5500 años. Gracias al descubrimiento de diversos tintes extraídos de plantas y animales se originó la industria de la fabricación de colorantes, lo cual impulsó a la industria de las telas. Entre muchos otros, el índigo y la alizarina extraídos de órganos vegetales de la *Indigofera tinctoria* y la *Rubia tinctorum*; así como el sepia y el púrpura obtenidos respectivamente de la bolsa de tinta del calamar *Sepia officinalis* y moluscos de la familia Muricidae, fueron utilizados ampliamente hasta mediados del siglo XIX en textiles y pieles. El descubrimiento de la mauveína, sintetizada por primera vez en 1856 por el inglés William Perkin, marcó el inicio de la industria de

los colorantes sintéticos (Devore y Muñoz, 1969). Con la revolución industrial, empezó una carrera por satisfacer la demanda de nuevos colorantes, más brillantes y durables, más resistentes al sol, al uso y los lavados, de calidad consistente, procesado más rápido y de tonalidades exactas. El monopolio en la producción mundial de colorantes que Alemania tuvo hasta 1913 terminó con la Primera Guerra Mundial y la industria floreció en otros países. El continuo descubrimiento de colorantes sintéticos con nuevas tonalidades, mejores características y menor costo que los naturales, acabó por desplazar a estos últimos en la preferencia de los usuarios y comerciantes, y ambas tendencias continúan hasta nuestros días (Dhuinnshleibhe, 2000).

Un colorante posee una estructura en anillo aromático acoplada con una cadena lateral, estas estructuras de resonancia que causan desplazamiento o aparición de bandas de absorción en el espectro visible de luz son responsables del color. La síntesis de colorantes orgánicos requiere: Un cromógeno incoloro que es la estructura aromática que contiene anillos de benceno, antraceno o naftaleno. Un grupo cromóforo, que es un átomo o radical portador del color y está representado por los siguientes radicales, los cuales forman la base para una clasificación química de colorantes cuando se acoplan con el cromógeno: azo ($-N=N-$), carbonilo ($=C=O$), carbón ($=C=C=$), carbón-nitrógeno ($>C=NH$ o $-CH=N-$), nitroso ($-NO$ o $N-OH$), nitro ($-NO_2$ o $=NO-OH$) y sulfuro ($>C=S$ y otros grupos carbón-azufre). Un auxocromo es un grupo de afinidad que imparte solubilidad y causa adherencia del colorante a la fibra ayudando así a la estructura cromógeno-cromóforo. El auxocromo puede ser básico como el amino ($-NH_2$), los amino sustituidos ($-NHR$, $-NR_2$) y el fenólico ($-OH$), o ácidos como el radical $-COOH$ y los radicales sulfónicos ($-SO_3H$) o sus derivados. Estos auxocromos son importantes en la clasificación de colorantes por su uso (Diccionario enciclopédico Quillet, 1973).

Los colorantes son solubles en alguna etapa de su proceso de aplicación y se vuelven parte integral del material al que se aplica, aquéllos cuya solubilidad es poca se denominan dispersos, mientras los pigmentos son insolubles (The New Enciclopedia Britanica, 1978).

Las lanas y sedas, a diferencia de las fibras vegetales, poseen una afinidad por grupos ácidos o básicos que permite teñirlas directamente con colorantes con estos grupos. Esto se debe a su carácter anfótero conferido por su naturaleza protéica. Con las fibras textiles como lino y algodón, hay que emplear colorantes que se fijan por

adsorción o utilizar sustancias que fijan el colorante a la tela. La clasificación de colorantes por su uso comprende según el World Bank Group (1998), los colorantes de rayón de acetato, los ácidos, azoicos, básicos, directos, mordentes o crómicos, las lacas o pigmentos, los azufrosos o sulfurosos y aquéllos a la cuba o tina. En el **Apéndice A** se agregan algunos más y se exponen los criterios de clasificación.

El Índice de Color (Color Index C.I.) publicado por la Society of Dyers and Colourists del Reino Unido y la American Association of Textile Chemists and Colorists (AATC) de los Estados Unidos de América, nombra cada colorante con un número que identifica el grupo químico al que pertenece, seguido por su tipo y color (Tabla I), de esta manera es posible identificarlos individualmente.

Tabla I. Clases de colorantes sintéticos de acuerdo al Índice de Color (C.I.).

Código	Clase Química	Código	Clase Química
10,000	Nitroso	49,000	Tiazol
10,300	Nitro	49,400	Indamina/Indofenol
11,000	Monoazo	50,000	Azina
20,000	Disazo	51,000	Oxazina
30,000	Trisazo	52,000	Tiazina
35,000	Poliazos	53,000	Sulfuro
37,000	Azoico	55,000	Lactona
40,000	Stilbeno	56,000	Aminocetona
40,800	Carotenoide	57,000	Hidroxicetona
41,000	Difemilmetano	58,000	Antraquinona
42,000	Triarilmetano	73,000	Indigoide
45,000	Xanteno	74,000	Ftalocianina
46,000	Acridina	75,000	Natural
47,000	Quinolina	76,000	Base de Oxidación
48,000	Metina	77,000	Inorgánico

Así, los colorantes pueden separarse en diferentes grupos químicos en base a su cromógeno, los más ampliamente utilizados son los colorantes azoicos, que poseen el grupo funcional $-N=N-$, le siguen en importancia los antraquinónicos que tienen un anillo quinoide con grupos hidroxilo o amino, los diaril y triaril metano que derivan del metano por sustitución de los átomos de hidrógeno por anillos arilo, los indigoides y tioindigoides que se obtienen por oxidación de la anilina, los nitro que tienen carácter ácido y al menos un grupo $-NO_2$ unido a un anillo fenólico, los nitrosos que poseen un grupo funcional $-N=O$ y luego los menos comunes como los colorantes de acridina, los de quinona-imina, las ftalocianinas, los compuestos de

tetrazolium, los tiazólicos y los colorantes derivados del xanteno. En el **Apéndice B**, se enlistan las clases de los colorantes de acuerdo a su clasificación química, se agregan los precursores y fórmulas generales y se mencionan algunos ejemplos de cada grupo (Stainsfile, 2005).

5.2.8 Mercado de colorantes.

Todos los colorantes y muchos pigmentos son compuestos orgánicos complejos sintetizados principalmente a partir de compuestos químicos de la industria petroquímica y del alquitrán mineral. Los pigmentos se emplean en pinturas, barnices, tintas de impresión y plásticos, mientras los colorantes sintéticos comerciales están actualmente en uso en la industria textil, papelera, alimenticia, del cuero y cosmética. En 1999 el valor del mercado de los colorantes, pigmentos y sus intermediarios se estimó en 2.5 billones de dólares. El segmento del mismo, correspondiente a colorantes y pigmentos representa una producción de 3.3 millones de toneladas. Asia es líder en la producción de colorantes en términos de valor y volumen con el 44% del mercado, seguido por Estados Unidos (24%) y Europa (22%). Esto refleja la producción de la industria textil, de la cual es líder Asia, seguida de Estados Unidos, Latinoamérica y Europa Occidental. Estas posiciones obedecen a estrategias comerciales benéficas para Estados Unidos, quien han trasladado su producción hacia México y Latinoamérica para tomar ventaja del tratado NAFTA y para Europa que ha cambiado su producción a Asia para tomar ventaja de su tasa de crecimiento (Khan, 2003). China es la nación productora más importante, totalizando 1.153 millones de toneladas para el 2006, principalmente para la industria textil. Sus exportaciones de más de 1,200 diferentes productos representan más del 20% del comercio mundial de los colorantes (RIC ICCL, 2007).

Considerando la producción para 1997 a nivel mundial de colorantes que fue de 800,000 ton (Heinfling *et al.*, 1998) y tomando en cuenta solamente el 4% que el INEGI (1999) reporta para la industria textil y del cuero en México, es posible calcular un total de 32,000 Ton de colorantes consumidas para ese año. Tomando los números para el 2006 y considerando los mismos porcentajes, el consumo se ha multiplicado 44 veces.

5.2.9 Problemática de los colorantes en el mundo y México.

Los colorantes sintéticos sirven para dar color a fibras textiles y materiales como papel, cuero, pieles, aceites, jabones, alimentos, cosméticos, militares, fotográficos, biológicos y algunos funcionan como indicadores de pH o tienen propiedades medicinales.

Los grupos químicos más comúnmente empleados en la industria son los azo, los trifenilmetano y los polimérico/heterocíclicos. Las dos principales fuentes de liberación de colorantes al ambiente son las industrias fabricantes y la textil (Nigam *et al.*, 1996).

Existen más de 10,000 colorantes comerciales disponibles para la industria textil (Robinson, *et al.*, 2001), la cual consume grandes cantidades de agua y químicos durante el teñido. En la tinción la molécula colorante se debe concentrar en la superficie de la fibra y estar ligada por fuerzas iónicas, enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals o enlaces covalentes y debido a que en general este proceso tiene un bajo rendimiento, produce finalmente efluentes que contienen de un 10 a un 50% del colorante empleado, dependiendo del tipo y el 90% de la cantidad que llega a los efluentes es descargado sin cambio a los ríos. La tasa de generación de aguas de desecho varía de 1 a 700 l/kg de producto y se eleva para los colorantes de cubeta hasta 8,000 l/kg de producto. Los sólidos de desecho incluyen lodos de filtración, lodos del tratamiento de efluentes y del proceso y residuos de los contenedores (Pierce, 1994).

Los colorantes sintéticos son xenobióticos por definición y recalcitrantes por demanda, ya que están diseñados para ser resistentes a la luz, al agua y a agentes oxidantes, por tanto son difíciles de degradar una vez que son liberados a los sistemas acuáticos y la compleja estructura de sus cromóforos frecuentemente los hace tóxicos (Michaels y Lewis, 1985).

Mundialmente hay una preocupación creciente sobre la liberación de colorantes sintéticos al ambiente, la cual se refleja en la implementación de leyes, reglamentos y normas a las que se deben ajustar las aguas de desecho (Aitken, 1993; Hao *et al.*, 2000; O'Neil *et al.*, 1999) y en la formación de asociaciones internacionales de

industrias (Ecological and Toxicological Association of the Dyestuffs Manufacturing Industry en 1974) para determinar normas de manejo seguro, riesgos ecológicos, toxicidad y criterios de legislación en materia de colorantes (O'Neil *et al.*, 1999). Los efluentes de la industria textil son complejos, ya que contienen mezclas de diferentes grupos de colorantes, impurezas naturales extraídas de las fibras y otros productos, como dispersantes, uniformantes, ácidos, álcalis, sales y en ocasiones metales pesados (Laing, 1991). En general, la presencia de un colorante es muy evidente aún a muy bajas concentraciones, afecta la estética del paisaje (Nigam *et al.*, 2000), plantea un problema para la fotosíntesis de algas y plantas acuáticas al impedir el paso de la luz, hace que se eleven las demandas biológica (BOD) y química (DQO) de oxígeno, causa un alta conductividad y cambios de pH hacia la alcalinidad (Banat *et al.*, 1996).

Los colorantes reactivos representan el 25% de la producción total mundial y los dispersos un 20% mientras que los de cubeta y directos tienen un mercado más reducido (Kahn, 2003). Los colorantes azo o dimida son los más diversos y numerosos, pues su estabilidad, variedad de tonalidades y colores vivos, son preferidos por la industria, que utiliza cientos de estas estructuras que no existen en la naturaleza. Se ha estimado que aproximadamente el 75% de los colorantes descargados por la industria textil de la Europa Occidental pertenecen a los de tipo azo en alguno de los grupos: reactivos (~36%), ácidos (~25%) y directos (~15%) (Øllgaard *et al.*, 1998). El grupo cromóforo de estos colorantes puede ser degradado por enzimas azoreductasas bacterianas en ambientes de baja tensión de oxígeno generándose aminas aromáticas tóxicas y aún carcinogénicas (Chung y Cerniglia 1992; McCann y Ames, 1975) en sedimentos (Weber y Wolfe, 1987) o los intestinos (Chung *et al.*, 1978). Los tratamientos convencionales de los efluentes para remover los pigmentos emplean métodos físicos (como adsorción, filtración, intercambio iónico, irradiación, coagulación) y químicos (procesos oxidativos, reacciones Fenton, ozonación, fotoquímica, hipoclorito de sodio, destrucción electroquímica, transformación química, incineración) (Tabla II) los cuales frecuentemente son costosos, complicados e ineficientes (Moreira *et al.*, 2000; Garg y Modi, 1999) y aunque los colorantes son removidos, se crea un nuevo problema, el de eliminación del concentrado residual (Robinson *et al.*, 2001). Los procesos biológicos (adsorción a biomasa, sistemas bacterianos aeróbicos/anaeróbicos, hongos de la podredumbre blanca) proporcionan una alternativa a esta tecnología debido a que son más

efectivos, de menor costo, ambientalmente amigables y producen menores cantidades de aguas residuales (Azmi *et al.*, 1998). Además, específicamente los sistemas modificadores de lignina de los hongos de la podredumbre blanca son oxidativos (Kirk y Farrel, 1987) y evitan la formación de aminas tóxicas en la degradación de colorantes azo, ya que son capaces de romper el doble enlace del grupo y liberar nitrógeno molecular por un mecanismo que implica mediadores redox (Chivicula y Renganathan, 1995).

Tabla II. Métodos físico-químicos disponibles para el tratamiento de agua de desecho colorida, sus ventajas y desventajas (Resumidas de Robinson *et al.*, 2001).

Métodos	Ventajas	Desventajas
Reactivo Fenton	Decoloración efectiva de colorantes solubles e insolubles	Generación de aguas residuales (sludge)
Ozonación	Aplicación en forma gaseosa, no altera el volumen	Vida media breve (20 min)
Fotoquímica	Coproduce aguas residuales	Se producen sub-productos
NaOCl	Inicia y acelera la ruptura del enlace azo	Liberación de aminas aromáticas
Carbón activado	Remoción efectiva de un número amplio de colorantes	Muy costoso
Turba	Buen absorbente debido a la estructura celular	Área superficial específica inferior a la del carbón activado
Filtrado por membrana	Remueve todos los tipos de colorantes	Muy costoso y genera lodos muy concentrados
Intercambio iónico	Hay regeneración del adsorbente el cual no se pierde	No es efectivo para todos los tipos de colorantes
Irradiación	Oxidación efectiva a escala de laboratorio	Requiere gran cantidad de oxígeno disuelto
Sílica gel	Efectivo para remover colorantes básicos	La aplicación comercial detenida por la existencia de reacciones secundarias
Coagulación electrocinética	Económicamente viable	Gran generación de lodos
Astillas de madera	Buena capacidad de adsorción de colorantes ácidos	Requiere tiempos largos de retención
Destrucción electroquímica	Los compuestos que se generan no son peligrosos	Alto consumo de electricidad

Se calcula que la descarga anual mundial de colorantes hacia cuerpos de agua debida a procesos de teñido industrial es de 30 a 150 mil toneladas de colorantes (Vanhulle *et al.*, 2008). Si consideramos conservadoramente los números para 1999, el consumo de las industrias textil y del cuero en México fue de 32,000 ton y si entre un 10 a 15% de ellas se perdió por la ineficiencia del proceso de teñido (Pointing, 2001; 2-50% según McMullan *et al.*, 2001) un total de hasta 4,800 ton de colorantes llegaron al desagüe de estas compañías en ese año y probablemente llegaron directamente a nuestros ríos. En ocasiones el tratamiento de los efluentes remueve sólo el 10 % de la carga y los colorantes (sobre todo los reactivos) pueden permanecer en el ambiente hasta 46 años (Hao *et al.*, 2000), lo cual representa un riesgo acumulativo para la salud en ciudades donde se concentran estas industrias en nuestro país.

5.2.10 La estructura de los colorantes y el proceso de decoloración.

Los estudios de decoloración con hongos ligninolíticos y sus enzimas han demostrado que la efectividad del proceso depende de la estructura y complejidad de cada colorante así como de las enzimas implicadas (Kim *et al.*, 1995). Los estudios iniciales indicaron que pequeñas diferencias estructurales podían afectar fuertemente la decoloración y los investigadores atribuyeron estas diferencias, a la distribución electrónica, la densidad de carga y probablemente a factores estéricos (Knapp *et al.*, 1995). Estudios sobre la degradación de colorantes azo (Chivikula y Renganathan, 1995; Pasti-Grigsby *et al.*, 1992) permitieron concluir que los sustituyentes en los anillos de benceno afectan la capacidad decolorante y que los grupos amino e hidroxilo hacen más susceptibles a un colorante al ataque. La confirmación experimental de este efecto para los colorantes triarilmetano, antraquinónico e indigoide (Abadula *et al.*, 2000) ha llevado a sugerir la sustitución en el mercado de aquellos colorantes más recalcitrantes, por colorantes “ecológicos” (“green dyes”), que al tener este tipo de sustituyentes en sus estructuras resultarían bioaccesibles a los hongos ligninolíticos utilizados en procesos biológicos de tratamiento de efluentes textiles (Martins *et al.*, 2003). Incluso se ha propuesto que un análisis de regresión basado en descriptores estructurales y que utiliza la técnica de

discriminantes, podría ayudar en el diseño de nuevos colorantes azo mas susceptibles a biodegradación (Suzuki *et al.*, 2001).

5.2.11 Mediadores

La lacasa posee un potencial redox inferior a las peroxidasas (0.5 a 0.8 vs 1 V), que limita su capacidad de oxidar sustratos no fenólicos. Sin embargo, su actividad sobre estos y otros sustratos, puede extenderse utilizando un mediador, lo que las capacita para ser utilizadas en procesos industriales tales como la deslignificación de la pulpa de papel, la remediación de efluentes contaminados con PAHs o pesticidas y la síntesis orgánica (Li *et al.*, 1999; d'Acunzo *et al.*, 2002). Los mediadores fueron descritos por primera vez por Bourbonais y Paice (1990). Son moléculas de estructura diferente a la enzima, de bajo peso molecular, que después de ser oxidadas difunden alejándose del sitio activo para oxidar sustratos que por su gran tamaño o alto potencial redox la enzima no puede atacar directamente. La forma oxidada del mediador puede oxidar al sustrato sustrayéndole un electrón o un átomo de hidrógeno, dependiendo de la propensión a reaccionar de este último. Los sistemas de lacasa con los mediadores 1-hidroxibenzotriazol, N-hidroxiftalimida y ácido violúrico utilizan la ruta de transferencia de electrón mientras aquél con la sal de amonio del ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) o ABTS, emplea la ruta del átomo de hidrógeno (Baiocco *et al.*, 2002). Al igual que la concentración de enzima determina la velocidad de la reacción pero no el nivel final (Claus *et al.*, 2002), la presencia del mediador aumenta el rango de sustratos susceptibles al ataque y la velocidad de la reacción, pero tampoco afecta el nivel final. La efectividad del sistema dependerá de una alta afinidad (K_m) y un elevado número de recambio (K_{cat}) de la enzima hacia el mediador, que este posea un potencial redox adecuado además de buena reversibilidad (Cho *et al.*, 2004) y que la enzima resista la inactivación debida a la presencia del radical libre mediador, el cual afecta a los aminoácidos aromáticos como el triptofano y la tirosina (Li *et al.*, 1999).

5.2.12 Antecedentes de la aplicación de los HPB en proceso de decoloración

En los primeros estudios de biorremediación de aguas coloridas, los hongos ligninolíticos fueron utilizados para tratar efluentes de industrias papeleras (Eaton *et al.*, 1980; Marton *et al.*, 1969). La búsqueda de modelos de lignina para estudiar el proceso de su degradación enzimática por los SML, llevó a la utilización de colorantes poliméricos y de algunos otros grupos químicos con este fin (Baldrian, 2004; Field *et al.*, 1993; Glenn y Gold, 1983; Gold *et al.*, 1988; Platt *et al.*, 1985). Las ventajas de usarlos como indicadores de ligninólisis y degradación de compuestos aromáticos son la sencillez de la metodología, el bajo costo del colorante y la rapidez y reproducibilidad de los resultados (Tekere, 2001), además que son solubles en agua, exhiben baja toxicidad y se puede medir su concentración fácilmente por espectrofotometría (Hatvani y Mécs, 2002). Por estas razones se siguen utilizando para el diagnóstico del tipo de podredumbre, estimar rápidamente las capacidades de degradación o estudiar los mecanismos de degradación utilizados por hongos (Cookson, 1995).

A finales de los 1960's la posibilidad de utilizar hongos ligninolíticos para la decoloración de efluentes coloridos despertó el interés científico. Pero fue hasta 1983 que Glenn y Gold probaron su capacidad decolorante con éxito y se inició una línea de investigación, dedicada al estudio de estos hongos para la bioremediación de efluentes de industrias que utilizan o fabrican colorantes. Al demostrarse la capacidad decolorante de *Phanerochaete chrysosporium* (*Pch*) los estudios se centraron en un número reducido de cepas de esta especie que se estableció como referencia para comparar mecanismos y capacidades de otros aislados de hongos de la podredumbre blanca (Pointing *et al.*, 2000; Fu y Viraraghavan, 2001; Pointing, 2001).

Glenn y Gold (1983), en los primeros estudios con *P. chrysosporium* (*Pch*) demostraron que los colorantes poliméricos (Poly B-411, R-481 y Y-606) podían ser decolorados por sus cultivos y que los inhibidores de la ligninólisis también inhibían la decoloración. En 1990 se reportó por vez primera la decoloración de colorantes azo sulfonados por *Pch* (Cripps *et al.*, 1990). Para 1998 *Pch* ya había sido ensayado para la decoloración de colorantes azo (Reddy, 1995), antraquinónicos,

heterocíclicos, trifenilmetano, de fluoresceína y poliméricos (Gogna *et al.*, 1992; Ollikka *et al.*, 1993; Paszczynski *et al.*, 1991; Paszczynski *et al.*, 1992; Spadaro *et al.*, 1992).

Panerochaete chrysosporium (*Pch*), *T. versicolor* y *Bjerkandera* sp. se han probado con colorantes azo: Amaranto, Tropaeolin O, Remazol Black B, Naranja Brillante de Remazol 3R; antraquinónicos: Remazol Azul Brillante R; ftalocianinas: Azul 15 Reactivo y sus mezclas (Swamy y Ramsay, 1999). *Pch* con poliméricos: Poly-R 478 y trifenil metano: Cristal Violeta (Moldes *et al.*, 2003); con ftalocianina: Remazol Turquoise Blue G133, Azul Turquesa de Everzol y Azul Heligon S4 (Conneely *et al.*, 2000); con indigoide: Índigo Carmín (Podgornik *et al.*, 2001); con fluoresceína: Rosa de Bengala (Gogna *et al.*, 1992). *Pch* y *Pleurotus sajorcaju* con azo: Amaranto, New Coccine, Naranja G y Tartrazina (Pereira-Chagas y Durrant, 2001); *T. versicolor* con colorantes azo: Amaranto, Tropaeolin O, Azul Reactivo 15, Rojo Congo, Negro Reactivo 5, Amarillo Brillante de Cibacron 3B-A y antraquinona: RBBR (Ramsay y Nguyen, 2002); también con industriales: Amarillo Dorado Reactivo R, Rojo Procion, Violeta Reactivo 5, Azul Reactivo 28, Rojo Ponceau 4R, Negro Reactivo 5, Rojo Reactivo 152 y Azul Novaltico BC S/D (Kehaira y Madamwar, 2002); con reactivos: RBBR, Negro de Remazol B, Naranja Reactivo 122, Rojo Reactivo 251 (Peralta-Zamora *et al.*, 2003). *T. (Coriolus) versicolor*, *F. trogii*, *P. sajorcaju* y *Pch* con los azo: Naranja II, trifenilmetano: ABF, antraquinona: RBBR y el aromático heterocíclico: Azul de Metileno (Yesilada y Özcan, 1998). *T. versicolor* y *Bjerkandera adusta* con azos: Violeta Reactivo 5, Negro Reactivo 5, Naranja Reactivo 96 y ftalocianinas: Azul Reactivo 15 y Azul Reactivo 38 (Heinfling *et al.*, 1997). *T. (Coriolus) versicolor*, *F. trogii*, *Laetiporus sulphureus* y *Pch* con trifenilmetano: Cristal Violeta (Yesilada, 1995). *B. adusta* y *P. eryngii* con ftalocianina: Azul Reactivo 38 y azo: Azul Reactivo 15, Violeta Reactivo 5, Negro Reactivo 5, Naranja Reactivo 96, Rojo Reactivo 198 (Heinfling *et al.*, 1998). *T. modesta*, *T. hirsuta*, *T. versicolor* y *Sclerotium rolfsii* sobre grupos azo, trifenilmetano, indigoide y antraquinónico (Nyanhongo *et al.*, 2002). *B. adusta* y *Phlebia tremellosa* con los comerciales: Amarillo Cibacron C-2r, Rojo Cibacron C-2G, Azul Cibacron C-R, Negro de Remazol B y Rojo de Remazol RB (Robinson *et al.*, 2001). *Trametes (Funalia) trogii* con Xylidina, Verde Malaquita, Azul de Antraquinona, Poly R-478, Azure B, Índigo Carmín, RBBR (Trupkin *et al.*, 2003). *Trametes hirsuta* y *S. rolfsii* con el Indigoide: Índigo (Campos *et al.*, 2001).

Pycnoporus sanguineus con los azo: Naranja G y Amaranto y los trifenilmetano: Azul de Bromofenol y Verde Malaquita (Pointing y Vrijmoed, 2000) y el disazo: Azul Cielo Chicago (Schliephake, *et al.*, 2000). *Fomes lividus* con Naranja G, Negro Amido 10B, Rojo Congo (Selvam *et al.*, 2003). *Pleurotus ostreatus* con el antraquinónico RBBR (Vyas y Molitoris, 1995); con este colorante (RBBR) y el trifenilmetano: CV (Shin *et al.*, 1997). *P. ostreatus* e *Irpex lacteus* en placa con azo, diazo, antraquinona, heterocíclico, trifenilmetano, ftalocianina (Novotný *et al.*, 2001). *P. pulmonarius* con Negro Amido, Rojo Congo, Azul de Tripano, Verde de Metilo, RBBR, Violeta de Metilo, Violeta de Etilo, Azul Brillante de Cresilo, Azul de Metileno y Poly R-478 (Tychanowicz *et al.*, 2004). *Lentinus edodes* con Poly R-478, RBBR y OII (Havatni y Mécs, 2002); *Daedalea quercina*, con Azul Cielo Chicago, RBBR, Poly-R B-411, Azul de Tripano y Azul Reactivo 2 (Baldrian, 2004). Para un resumen de lo anterior, ver el **Apéndice D**.

Para muchas otras especies se ha comprobado su capacidad decolorante en laboratorio, pero aún es escaso el número de cepas a las que se ha caracterizado sus enzimas o que se han probado con efluentes coloridos según se puede apreciar en diferentes revisiones del tema (Hao *et al.*, 2000; Fu y Viraraghavan, 2001). En estas revisiones se destacan cepas que en laboratorio han alcanzado 100 % de pérdida de color, dependiendo de la composición del medio, tipo de colorante y concentración, pH, oxigenación y agitación, temperatura o presencia de iones metálicos. Entre las especies más estudiadas destaca *Phanerochaete chrysosporium* en primer sitio (Kirby *et al.*, 1995; Swamy y Ramsay, 1999), con *Coriolus (Trametes) versicolor* (Heinfling *et al.*, 1997; Ramsay y Nguyen, 2002; Swamy y Ramsay, 1999), *Berkjandera adusta* (Heinfling *et al.*, 1997, 1998), *Pleurotus ostreatus* (Rodríguez *et al.*, 1999; Vyas y Molitoris, 1995) y otras especies de *Pleurotus* (*P. eryngii*, Heinfling *et al.*, 1997; *P. sajorcaju*, Pereira-Chagas y Durrant, 2001), *Lentinus edodes* (Hatvani y Mécs, 2002) y *Phlebia* (McMullan *et al.*, 2001) en segundo y muchas otras con menor cantidad de estudios, entre ellas *Trametes hispida* (Rodríguez *et al.*, 1999), *Trametes hirsuta* (Jarosz-Wilkolazka *et al.*, 2002), *Trametes (Funalia) trogii* (Trupkin *et al.*, 2003) *Irpex lacteus* (Kasinath *et al.*, 2003), *Telephora* sp (Selvam *et al.*, 2003) y *Pycnoporus cinnabarinus* (Schliephake y Lonergan, 1993).

Chivikula y Renganathan (1995), trabajando con colorantes azo fenólicos y una lacasa comercial de *P. oryzae* encontraron que la decoloración ocurre sin la

ruptura directa del enlace azo o la formación de aminas aromáticas, a través de un mecanismo inespecífico que implica radicales libres, resultando en una disminución de la toxicidad del colorante por oxidación. Su conclusión fue que el mecanismo de degradación de estos colorantes es similar en lacasas que en peroxidadas.

Kirby *et al.* (1995), estudiaron la decoloración de 9 colorantes azo sintéticos en presencia y ausencia de glucosa como fuente de carbono y utilizaron una mezcla de los colorantes para simular un efluente textil, al cual decoloró *Pch* después de 7 días.

Vyas y Molitoris (1995), al utilizar el colorante RBBR como indicador de actividad ligninolítica encontraron en el curso de la decoloración por *Pleurotus ostreatus* en sustrato sólido, una actividad enzimática dependiente de peróxido en cultivos de 14 a 20 d, diferente a las actividades MnP, MnP independiente y fenol oxidasa. La llamaron RBBR-oxigenasa dependiente de peróxido

Yesilada (1995), logró porcentajes de decoloración del colorante Cristal Violeta de 92, 82, 86 y 62% con cultivos de 3 d de *C. versicolor*, *Funalia trogii*, *Laetiporus sulphureus* y *P. chrysosporiu*, respectivamente.

Shin *et al.* (1997), encontraron una alta afinidad de la peroxidasa de *P. ostreatus* por los colorantes RBBR y CV.

Heinfling *et al.* (1997), mostraron que de 18 cepas fúngicas en las cuales probaron su potencial para decolorar colorantes textiles reactivos comerciales, solamente *Bjerkandera adusta*, *T. versicolor* y *P. chrysosporium* fueron capaces de decolorar todos los colorantes.

Heinfling *et al.* (1998), investigaron la transformación de 6 colorantes industriales tipo azo y ftalocianina por *Bjerkandera adusta* y *Phanerochaete chrysosporium* y encontraron poca o ninguna oxidación por la MnP o el complejo lactato-Mn⁺³ de este último. La baja actividad de la LiP del primero se incrementó hasta 100 veces por la adición de alcohol veratrílico. Señalaron la existencia de una peroxidasa Mn²⁺ independiente que degradó los colorantes, producida por *B. adusta* y *Pleurotus eryngi* y cuya actividad no se afectó por adición de alcohol veratrílico.

Swamy y Ramsay (1999), evaluaron la habilidad decolorante de cinco hongos de la podredumbre blanca (*P. chrysosporium*, *T. versicolor*, *Trametes hirsuta*, *Bjerkandera* sp. y *Pleurotus ostreatus*) sobre seis colorantes: 3 azo (50 ppm Amaranto, 20 ppm Tropaeolin O, 60 ppm Naranja de Remazol), 1 disazo (60 ppm Negro de Remazol B), 1 antraquinónico (40 ppm RBBR) y 1 ftalocianina (20 ppm

Azul Reactivo). Modificando amortiguadores y condiciones de agitación, ensayaron los colorantes en forma individual, en mezclas de colorantes y con adiciones repetidas. De las 5 especies de la podredumbre blanca probadas en su actividad decolorante, *Bjerkandera* sp. BOS55, *P. chrysosporium* y *T. versicolor* mostraron la mayor actividad, pero *T. versicolor* decoloró la mayor parte de los colorantes en forma más rápida que los otros hongos en amortiguador de ácido 2,2'-dimetilsuccínico.

Abadulla *et al.* (2000), probaron la lacasa de *Trametes hirsuta* en forma purificada libre e inmovilizada para degradar 7 colorantes de diferente estructura, teniendo éxito en cuanto la disminución de nivel de toxicidad y eliminación de coloración. Concluyeron que el tiempo y susceptibilidad a la degradación dependían de la estructura y que la presencia de LiP o MnP en combinación con la lacasa incrementaba en un 25% la capacidad decolorante. Además encontraron que los agentes quelantes y detergentes disminuían la actividad enzimática de un 20 a un 70% dependiendo de la especie que producía la enzima.

Kirby *et al.* (2000), decoloraron ocho colorantes textiles sintéticos a concentraciones de 200 ppm con *Phlebia tremellosa* en más de un 96% en 14 d en cultivos estacionarios. La actividad lacasa se detectó a partir del día 5 para llegar al 14° día a 15 UI⁻¹. Colorantes como el Negro de Remazol B aunque decolorados, no fueron mineralizados en su totalidad.

Moreira *et al.* (2000), probaron 7 cepas fúngicas productoras de MnP con tres colorantes sintéticos de estructura diferente, logrando decolorarlos *Phanerochaete sordida*, *Bjerkandera* sp. BOS55, *Phlebia radiata* y *Phanerochaete chrysosporium*. En ninguna cepa detectaron LiP y actividad Lac solamente en *P. radiata*. Promedio de la velocidad de decoloración de 0.2 Δ Absorbancia/d.

Robinson *et al.* (2002 a, b), exploraron la capacidad de adsorción de subproductos agrícolas sobre un efluente artificial formado por 5 colorantes a concentraciones de 10 a 200 ppm, encontrando que la cascarilla de cebada fué mejor (92% decoloración en 48 h) que el olote (2002 a) y el bagazo de manzana superior a la paja de trigo (2002 b). Mientras Gandolfi *et al.* (2004), en cultivos de *Lentinula (Lentinus) edodes* en fase sólida sobre olote, lograron una decoloración total a 200 ppm de los colorantes Amido Black, Rojo Congo, Azul de Tripiano, Verde de Metilo,

RBBR, Violeta de Metilo, Violeta de Etilo y Poly R-478 a los 18 días, atribuyendo la capacidad decolorante a la actividad MnP.

Novotný *et al.* (2001), evaluaron en Poly R-478 y RBBR, 103 hongos aislados de bosques en la República Checa y de ellos probaron a *Irpex lacteus* y *Pleurotus ostreatus* para degradar seis grupos de colorantes: azo, diazo, antraquinona, heterocíclico, trifenilmetano y ftalocianina en placa a los cuales ambos decoloraron. *I. lacteus* en cultivos líquidos de 14 días decoloró a RBBR 93%, ABF 100%, ftalocianina de cobre 98%, Rojo de Metilo 56%, Rojo Congo 58% y un derrame en suelo estéril de RBBR lo degradó en un 77% en 6 semanas.

Podgornik *et al.* (2001), utilizaron el colorante Índigo Carmín para entender el mecanismo de su decoloración por la MnP y LiP de *P. chrysosporium*, encontraron una mayor velocidad de decoloración con MnP, pero al mismo tiempo, además del color final amarillo producto de la actividad de la LiP o la MnP, observaron la aparición de un color rojo con la actividad MnP. Atribuyeron este color a la formación de un producto de condensación por la MnP.

Soares *et al.* (2001), estudiaron la decoloración del RBBR como representante de los colorantes antraquinónicos por un formulado a base de lacasa comercial (CLF), un mediador redox y un surfactante no iónico. Compararon el formulado contra la lacasa individual y reportaron como diferencia, solamente una mayor estabilidad de la enzima en el formulado, manteniéndose inalterados los perfiles de pH y temperatura. Extrañamente encontraron que la lacasa por sí sola no decolora al RBBR. Al combinar el formulado comercial con el mediador HBT lograron la decoloración total del RBBR concluyendo por ello que la combinación puede ser adecuada para el tratamiento de efluentes con colorantes antraquinónicos.

Pereira-Chagas y Durrant (2001), ensayaron *Pch* y *Pleurotus sajorcaju* en la decoloración de 4 colorantes azo empleados en alimentos. Encontrando que el primero decolora en 100 % el Amaranto, New coccine y el Naranja G, pero sólo un 60% la Tartrazina. Las enzimas implicadas fueron la MnP y la β -Glucosidasa. En el caso de *P. sajorcaju* decoloró los 2 pigmentos en un 100 %, el tercero en un 50% y el tartrazine en un 20% con la lacasa y la Glucosa 1-oxidasa como enzimas implicadas.

Robinson *et al.* (2001), ensayaron la capacidad de decoloración de 4 hongos de la podredumbre blanca sobre 5 colorantes. Dos cepas, *Bjerkandera adusta* y *Phlebia tremellosa*, demostraron ser mejores que *Pleurotus ostratus* y *Coriolus versicolor* sobre la mezcla de colorantes Amarillo de Cibacron C-2R, Rojo de

Cibacron C-2G, Azul de Cibacron C-R, Negro de Remazol B y Rojo de Remazol RB. Además señalaron que una alta concentración de nitrógeno en el medio de cultivo aumentó la producción enzimática pero solo ligeramente la degradación.

Balan y Monteiro (2001), con cultivos de 4 días de *Phellinus gilvus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pycnoporus sanguineus* y *P. chrysosporium* obtuvieron porcentajes de decoloración del 100, 94, 91 y 75 respectivamente sobre el colorante Índigo y aislaron por cromatografía en capa fina, un metabolito con $R_f = 60$ producto de la degradación del colorante.

Campos *et al.* (2001), utilizaron lacasas purificadas de *Trametes hirsuta* y *Sclerotium rolfsii* para degradar el colorante textil índigo. Basados en el consumo de oxígeno propusieron un mecanismo de ataque que inicia con una abstracción de 4 electrones por la enzima para a través del isatin, llegar finalmente a ácido antranílico (2-aminobenzóico). La lacasa de *S. rolfsii* en presencia de acetosiringona como mediador incrementó en un 30% la velocidad de oxidación del índigo.

Hatvani y Mécs (2002), postularon que como varios colorantes con 1 o más anillos aromáticos tienen estructuras similares a los xenobióticos aromáticos, se les puede utilizar para investigar la capacidad degradadora de los organismos y establecer modelos de degradación. Ensayaron *Lentinus edodes* sobre Poly R-478, RBBR y OII a los cuales decoloró por medio de lacasa y MnP, viéndose afectada su actividad por la concentración de Mn y la disponibilidad de nitrógeno en el medio.

Nyanhongo *et al.* (2002), compararon la habilidad decolorante de cuatro hongos ligninolíticos productores de lacasa (*Trametes modesta*, *T. hirsuta*, *T. versicolor* y *Sclerotium rolfsii*) sobre 8 colorantes de los grupos azo, triarilmetano, indigoide y antraquinónico. Reportando a *T. modesta* como el más eficiente, bajo condiciones ácidas y que la eficiencia se incrementó al ascender la temperatura de 50-60°C y en presencia de los mediadores 1-hidroxibenzotriazol y 2-metoxibenzotiazina.

Jarosz-Wilkolazka *et al.* (2002), hicieron ensayos de decoloración con 115 hongos de colección sobre dos colorantes, el colorante monoazo Rojo Ácido 183, al cual 16 cepas lo degradaron en 21 días y el colorante antraquinónico Azul Básico 22 que 69 lo degradaron en 5–14 días. Resaltaron la necesidad de agitación para que ocurra la degradación y la importancia de cepas con mejor potencial tecnológico en la degradación de colorantes que aquéllas más ensayadas (*P. chrysosporium*, *T. versicolor* y *B. adusta*). Aunque los hongos de la pudrición blanca fueron más

rápidos, algunos de la pudrición café y mohos mitospóricos fueron muy efectivos en la decoloración, además de una levadura y 2 basidiomicetos degradadores de mantillo.

Hatvani y Mecs (2002), estudiando *Lentinus edodes* encontraron que los metales pesados inhibieron la decoloración del Poly-R 478 y la producción de MnP, pero (exceptuando el hierro) incrementaron la actividad lacasa.

Mielgo *et al.* (2003), optimizaron el proceso de decoloración de un sistema basado en MnP (versátil) de *Bjerkandera* sp. BOS 55 para colorantes azo, alcanzando una decoloración mayor al 90% para concentraciones de Naranja II de hasta 1500 ppm en 10 min, con una capacidad oxidativa de 10 mg de colorante degradado por unidad de MnP. Concluyen que el principal factor en el proceso es la adición continua de peróxido a flujo controlado y que en este caso particular no se requirió la presencia de un ácido orgánico quelante, posiblemente porque el Mn^{+3} fue quelado por el colorante.

Harazono *et al.* (2003), investigaron la decoloración del colorante azo Rojo Reactivo 120 por *P. sordida* obteniendo un 90.6% de decoloración a los 7 días con una concentración inicial de 200 ppm. La actividad responsable detectada fue MnP la cual infirieron que fue promovida por hidropéroxido formado por la descomposición del malonato o a partir de peroxidación de lípidos.

Selvam *et al.* (2003), reportaron una mejor eficiencia decolorante para el hongo *Thelephora* sp. sobre los colorantes Naranja G (33% en 9 d), Rojo Congo (97.1% en 8 h) y Negro Amido 10B (98.8% en 24 h) que la reportada para *B. adusta* y *P. chrysosporium*. Al tratar un efluente industrial encontraron que un tratamiento en lote (batch) fue más efectivo que en continuo por un 11%.

Yesilada *et al.* (2003), lograron decolorar en 24 h más del 75% de los colorantes probados, utilizando esferas fúngicas en lote alimentado. Comprobaron que la decoloración no se debió a adsorción y se mantuvo efectiva por 10 días a concentraciones de 264 ppm del colorante Astrazone Azul, al añadir suero de queso a cultivos de *Funalia trogii*.

Lopez *et al.* (2004), emplearon un reactor enzimático agitado provisto de una membrana de ultrafiltración, logrando una decoloración del 85% con mínima desactivación enzimática después de 18 días y una eficiencia de 42.5 mg de colorante azo OII por unidad de MnP consumida.

Zille *et al.* (2005), estudiaron la degradación del colorante azo naranja de metilo por la lacasa de *Trametes villosa* y el acople entre sus aminas aromáticas y el catecol en presencia y ausencia del mediador 1-hidroxibenzotriazol (HBT) para su remoción física de efluentes. Ellos encontraron una mayor velocidad de reacción con la enzima libre que inmovilizada y que la eficiencia catalítica aumentó considerablemente con el mediador HBT. Los autores concluyeron que es posible la remoción física de aminas aromáticas mediante el acople mediado por lacasa con catecol de estos contaminantes y el monitoreo en línea de la actividad enzimática de la enzima inmovilizada sobre macro-electrodos.

Levin *et al.* (2005), estudiaron los efectos de la composición del medio sobre la producción de Lac, MnP y GLOX por *Trametes trogii* (MYA 28-11) y determinaron que el cobre posee la mayor influencia en el incremento de la producción enzimática extracelular, que alcanzó 45.32 U/ml Lac, 214.5 mU/ml MnP y 116 mU/ml GLOX. Estos valores coincidieron con la máxima capacidad decolorante sobre los colorantes Ponceau 2R (un derivado de la Xilidina), Verde Malaquita y Azul de Antraquinona a velocidades de 2.14 µg, 1.35 µg y 3 mg colorante/ml*h), respectivamente. Sus resultados sugieren una mayor participación de la lacasa en la degradación de Xilidina y de la MnP en la decoloración de Verde Malaquita.

Machado *et al.* (2006), decoloraron con *Trametes villosa* y *Pycnoporus sanguineus* 28 colorantes reactivos textiles utilizados en la manufactura de algodón. *P. sanguineus* solamente logró decolorar nueve. En un efluente artificial obtenido de la mezcla de 10 colorantes se obtuvo una mayor decoloración cuando se utilizó un co-cultivo de ambos hongos.

Kariminiaae-Hamedani *et al.* (2007), lograron de un 84.9–99.6% de decoloración en 14 días con el HPB L-25 sobre 12 diferentes colorantes azo y antraquinónicos a 40 ppm, atribuyendo el efecto a la actividad de la MnP.

Erkurt *et al.* (2007), en su estudio de decoloración en condiciones estáticas (a 30°C y pH 5) del Azul Real Brillante de Remazol y el Azul de Drimareno CL-BR con *Pleurotus ostreatus*, *Coriolus versicolor* y *Funalia trogii* obtuvieron el máximo efecto con *F. trogii* y el mínimo con *P. ostreatus*, atribuyendo el efecto sólo a la actividad lacasa. Mientras para el segundo ambos colorantes resultaron tóxicos, para el primero sólo lo fue el Azul de Drimareno arriba de 60 ppm.

Sathiya *et al.* (2007), ensayaron *Trametes hirsuta* y *Pleurotus florida* para decolorar hasta 75 ppm de los colorantes reactivos textiles Azul CA, Negro B133 y Violeta de Corazol SR. Obtuvieron al 5º día el mayor grado de decoloración sobre el azul y el violeta, lo cual atribuyeron a la actividad lacasa. *P. florida* tuvo mejor desempeño decolorante que *Trametes hirsuta* sobre un efluente real al cultivarlo con glucosa al 2%.

Gomaa *et al.* (2008), investigaron la habilidad de *P. chrysosporium* para decolorar 14 colorantes textiles sintéticos. El hongo decoloró 6 de ellos con una eficiencia entre el 14 y el 52 % y el ataque fue inespecífico. Sus ensayos posteriores con el colorante Azul Victoria B sugirieron que en su decoloración existió la participación de una lacasa y/o una oxigenasa/oxidasa y un factor no enzimático termoestable.

Actualmente, además del proceso de decoloración, se considera si la biotransformación del colorante disminuye su toxicidad, la limitante es que no se tiene un método estándar, por lo que los resultados no son comparables. Por ejemplo, se han utilizado ensayos con hongos susceptibles, como *Phanerochaete chrysosporium* al Verde Malaquita (Mouso *et al.*, 2007); ensayos de inhibición del crecimiento de *Lemna minor* (Eichlerová *et al.*, 2007); con sistemas modelo microbianos (Chhabra *et al.*, 2008); con células epiteliales de intestino humano Caco-2 y ensayos VITOTOX® (Vanhulle *et al.*, 2007).

Mientras la mayoría de las evaluaciones han sido en cultivos sumergidos, también ha sido exitosa la decoloración por cultivos inmovilizados en diferentes soportes, como poliuretano, piedra, partículas de madera, tejido de yute y espuma de poliuretano (Kapdan *et al.*, 2000; Ramsay *et al.*, 2005; Shin *et al.*, 2002; Yang y Yu, 1996).

Aunque se continúa tratando de optimizar las condiciones de cultivo sumergido en algunas cepas, la fermentación en sustrato sólido se ha postulado como la mejor alternativa cuando se trata de biorremediación de efluentes con colorantes. Asgher *et al.* (2008), tratando de optimizar el proceso decolorante, modificaron las condiciones de cultivo de *Schizophyllum commune* IBL-06 creciéndolo en un medio a base de sales hasta obtener una decoloración completa del colorante textil directo Amarillo Dorado Solar a los 2 días de incubación. Encontraron como enzima principal del proceso la MnP, aunque también reportaron Lac y LiP. Rodríguez Couto (2007), registró una alta producción de lacasa en fermentación en sustrato

sólido para *Trametes hirsuta* creciéndolo en cortes de papel (7695 U/L al día 9) y reportó una capacidad decolorante de preparaciones crudas a valores alcalinos sobre Índigo Carmín y Verde B de Lissamina.

Repetidamente se ha encontrado que existen hongos con mejor capacidad decolorante que el hongo modelo *P. chrysosporium* (Chandler *et al.*, 2004) y su tipo de sistema ligninolítico basado en LiP. Knapp *et al.* (1995), reportaron que algunos HPB son decolorantes superiores a *Pch* respecto al rango de sustratos degradados y la velocidad de decoloración.

Dey (1994), en su estudio sobre la capacidad de decolorar pigmentos del hongo de la pudrición café *Polyporus ostreiformis*, encontró que de las 2 enzimas que produce, LiP y MnP, la última le confiere mayor habilidad para decolorar pigmentos que la reportada para *Pch*. Reportó 99 % de degradación en 9 días para el colorante azo Rojo Congo y 77.6 % en 9 días para el colorante de tiazina Azul de Metileno.

Rodríguez *et al.* (1999), compararon contra 23 colorantes industriales la capacidad decolorante de *Pch* (ATCC 24725) y *Pleurotus ostreatus* (IE8) y demostraron que *P. ostreatus* era capaz de decolorar 12 mientras solo 5 fueron decolorados por el primero.

Revankara y Lele (2007), decoloraron 100 ppm de amaranto en un 96% en 8 h con la cepa WR-1 de *Ganoderma* sp. Mencionando que la velocidad de decoloración fue muy alta comparada con cepas de *Trametes versicolor* y *Pch*, y resaltaron el amplio espectro de decoloración de la cepa al lograr decolorar totalmente un efluente industrial en 12 días.

5.2.13 Búsqueda de nuevos sistemas ligninolíticos

La mayoría de las exploraciones se han realizado en cepas de colección como BCCM/MUCL (Bélgica), MC-SU (Polonia), LPSC (Argentina), INRA (Francia) (Jaouani *et al.*, 2003; Jarroz-Wilkolazska *et al.*, 2002; Sayadi y Ellouz, 1993). Sin embargo, existen equipos de investigadores realizando nuevos aislados alrededor del mundo cuyo objetivo es encontrar cepas con propiedades más adecuadas a las condiciones imperantes en los sistemas de tratamiento de efluentes coloridos.

La diversidad fúngica que existe en países tropicales y subtropicales ha motivado a sus investigadores a realizar prospecciones buscando sistemas con nuevas propiedades adecuadas para ser utilizados en procesos de biorremediación y biotecnológicos.

Okino *et al.* (2000), mediante un ensayo rápido aislaron 116 basidiomicetos del bosque de lluvia tropical brasileño que expresaban actividades lacasa y peroxidasa.

Tekere *et al.* (2001), evaluaron las actividades ligninolíticas (Blue Dextran, Poly-R478) y decolorantes (Rojo Cresol, Cristal Violeta y Azul de Bromofenol) de 10 cepas fúngicas de Zimbabwe productoras de MnP y Lac. Las cepas con ligninólisis más rápida en cultivo líquido fueron *Trametes cingulata*, *T. versicolor*, *T. pocas*, *Datronia concentrica*, *Pycnoporus sanguineus* y la cepa DSPM95.

Saparrat *et al.* (2002), evaluaron los sistemas ligninolíticos de HPB argentinos y encontraron esencialmente actividad lacasa.

Risno y Suhirman (2002), exploraron la habilidad ligninolítica de poliporales de Indonesia usando Poly R-478. De 65 aislados 12 produjeron Lac, MnP y LiP, mientras *Hexagonia tenuis*, *Inonotus patouillardii* y *Stereum sp* solo Lac y LiP.

Levin *et al.* (2004), evaluaron 26 hongos de la podredumbre blanca de Argentina. Encontraron una cepa (*Coriolus versicolor* f. *antarcticus*) capaz de decolorar en una hora un buen porcentaje (28%, 30%, 43%, 88% y 98%) de Xylidina (24 mg/l), Poly R-478 (75 mg/l), Remazol Brilliant Blue R (9 mg/l), Verde Malaquita (6 mg/l) e Índigo Carmín (23 mg/l), respectivamente. Con una actividad Lac de 0.13 U/ml.

Hossain *et al.* (2002), de 50 aislados de Bangladesh, India, encontraron 3 con actividad ligninolítica indicada por el amarillamiento del PolyR-478 y la mejor, *Fomes lignosus*, tuvo un pH óptimo de decoloración de 4.5.

Dhouib *et al.* (2005), aislaron 315 cepas autóctonas de diferentes regiones en Túnez, de las cuales 18 degradaron el poly-R 478 y 28 produjeron una de tres enzimas ligninolíticas principales mientras en 8 de ellas las tres actividades fueron registradas. *Trametes trogii* resultó el mejor productor de lacasa de todos los aislados 110 Uml⁻¹ a los 15 días después de optimizar el medio.

Asgher *et al.* (2006), utilizaron cuatro aislados nativos de colección, para decolorar colorantes textiles reactivos por 10 días. *Pch* y *C. versicolor* decoloraron efectivamente Amarillo Brillante de Remazol 3GL (RBY), Azul Porcion PX-5R y

Azul de Cibacron P-3RGR. *P. ostreatus* no logró una decoloración eficiente sobre el RBY, mientras *Ganoderma lucidum* únicamente decoloró este colorante en forma eficiente.

Junghansa *et al.* (2008), al ensayar 95 aislados fúngicos de ambientes dulceacuícolas sobre 9 colorantes azo y 3 antraquinónicos y compararlos en su desempeño decolorante contra cinco HPB, encontraron resultados comparables o superiores. Subrayando el potencial de los hongos de ambientes limnéticos para el tratamiento de efluentes contaminados con colorantes.

5.2.14 Diversidad fúngica en México y Nuevo León

Se estima que el número total de especies de hongos verdaderos en el mundo es superior a 1.5-1.6 millones, de las cuales se han descrito alrededor de 64-70,000 (Carlile *et al.*, 2001). Para México, existe un total estimado de 200,000 especies de hongos, de las cuales se conocen apenas alrededor de 7,000 (Guzmán, 1998; Cifuentes *et al.*, 2004; Hawksworth, 1991; Hawksworth *et al.*, 1995). Los macromicetos de cuerpo fructífero grande como para verse a simple vista y tomarse con la mano reciben el nombre de setas, se estima existen 140,000 especies y se conocen 22,000 de ellas (Lindequist *et al.*, 2005). En Norteamérica las podredumbres pardas y blancas son causadas por alrededor de 1,700 especies de hongos basidiomicetos, más de 1,530 de ellas causan podredumbre blanca (Gilbertson, 1980). Nuevo León posee una gran diversidad de setas, posiblemente como resultado del desarrollo de diferentes ecofisiologías adaptadas a los variados microambientes que se presentan en sus 3 provincias biogeográficas: la planicie costera, la Sierra Madre Oriental y el altiplano (Alanís *et al.*, 1996). El número de basidiomicetos representados en la Colección UNL es de 437 especies, comprendidas en 135 géneros y 57 familias. Las setas que ocasionan podredumbre en la madera se distribuyen en los géneros *Armillariella*, *Gleophyllum*, *Daedalea/Daedaleopsis*, *Eichleriella*, *Fomes*, *Fomitopsis*, *Phellinus*, *Ganoderma*, *Hexagonia*, *Hymenochaete*, *Inonotus*, *Lenzites*, *Phlebia*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Polyporus*, *Pycnoporus*, *Poria*, *Trametes*, *Trichaptum*, *Phaeolus*, *Coltricia*, *Stereum* y *Schizophyllum*

(Salcedo *et al.*, 2007) y se ha reportado 8 especies que causan podredumbre parda y 17 que ocasionan podredumbre blanca en pinos de Nuevo León (Marmolejo, 2007).

Por lo arriba mencionado, es claro que Nuevo León posee una gran diversidad micológica y es probable que la abundancia de maderas duras propicie la ocurrencia de hongos ligninolíticos con una capacidad de degradar colorantes igual o mejor que las cepas comúnmente reportadas en la literatura científica. Esta posibilidad, la cantidad de colorantes que se consumen en México y los riesgos ambientales y de salud que ellos conllevan motivaron esta investigación, cuyos propósitos fueron: coleccionar Basidiomicetos en diferentes sitios dentro del Estado, aislarlos y probar su capacidad de degradar colorantes pertenecientes a los grupos estructurales más utilizados por la industria textil mediante técnicas de siembra en placa, seleccionar las cepas de mejor desempeño y caracterizar los principios químico-enzimáticos responsables de su actividad decolorante mediante ensayos con cultivos en medio líquido y sus extractos libres de células.

6. METODOLOGÍA

6.1 Materiales y reactivos

Los sustratos (**Apéndice C**) guayacol (2-metoxifenol, GUA), o-anisidina (2-metoxianilina, OA), siringaldazina (3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzaldeidazina, SYR), 2,6-dimetoxifenol (DMOP), 2,4-diclorofenol (2,4-DCP), 4-aminoantipirina (4-AAP), ácido 3-dimetilaminobenzoico (DMAB), 3-metil-2-benzotiazolina hidrazona (MBTH), la sal de amonio del ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), el alcohol veratrílico (alcohol 3,4-dimetoxi bencílico, AV) y Poli R-478 (PR), así como los colorantes antraquinónicos C.I. 61200 Azul Brillante de Remazol Reactivo (RBBR; 45% contenido de colorante), C.I. 61580 Verde Ácido 27 (AG27; 65% contenido de colorante), los azoicos C.I. 16250 Rojo Ácido 44 (AR44; Contenido de colorante 90%), C.I. 18800 Rojo Ácido 183 (AR183; contenido de colorante 30%), C.I. 15510 Naranja II (OII; contenido de colorante 85%), C.I. 20505 Negro Reactivo 5 (BK5, contenido de colorante 55%), los colorantes triarilmetano C.I. 42555 Cristal Violeta (CV; contenido de colorante 99%), C.I. 42660 Azul Brillante Reactivo (BBR; contenido de colorante 55%), Azul de Bromofenol (ABF; contenido de colorante 95%), el indigoide C.I. 73015 Índigo Carmín (IN; contenido de colorante 93%), los inhibidores azida de sodio y ácido tioglicólico, el agente secuestrante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), la catalasa, la albúmina de suero de bobino, así como los reactivos utilizados en los ensayos de electroforesis como la acrilamida, la N',N'- metileno-bis-acrilamida, la N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED), el persulfato amónico (APS), el dodecil sulfato de sodio (SDS) y el 2-mercaptoetanol, fueron obtenidos de Sigma-Aldrich de México, S. A. de C. V. Mientras los componentes de los medios de cultivo como la glucosa, el extracto de levadura, el extracto de malta y el agar bacteriológico así como el glicerol, se obtuvieron de DIFCO y el Bran Flakes® de Kellogg's. Cofactores como el peróxido de hidrógeno, ácidos, bases y sales minerales

empleadas en la elaboración de amortiguadores o mezclas de reacción (HCl, Malonato de sodio, Sulfato manganoso, KOH, NaOH) fueron adquiridos grado reactivo en Control Técnico y Representaciones (CTR). El Benomil es el ingrediente activo del producto comercial Promyl, elaborado por Promotora Técnica Industrial, S.A. de C.V. El agua bidestilada fue adquirida en Laboratorios Monterrey, S. A.

6.2 Identificación taxonómica

La identificación de los carpóforos a género y especie se realizó mediante las claves de Guzmán (1980) y manuales especializados como Arora (1985), Bessette *et al.* (1997), Fergus (1960), Gerhardt *et al.* (2000), Guzmán (1978), Guzmán (2003), Jordan (1995), Largent y Baroni (1988), Metzler y Metzler (1992), Overholts (1967), Phillips (2005). La identidad fue confirmada molecularmente mediante el análisis de secuencias ITS, por el Instituto Holandés Centralabureau voor Schimmelcultures (CBS).

6.3 Medios y condiciones de cultivo

El medio de cultivo empleado en la reactivación y conservación de los aislados fue YMGA (4 g de Extracto de levadura, 10 g de extracto de malta, 4 g de glucosa y 15 g de agar por litro de medio preparado en agua bidestilada). Para el aislamiento de cepas a partir de carpóforos se añadió al YMGA, en condiciones de esterilidad (Millipore 0.45 μm), 4 mg del fungicida benzimidazol sistémico Benomyl (No. CAS: 17804-35-2) disueltos en una solución 1:1 acetona-etanol 70% y 14 ml de ácido tartárico al 10% (P/V) con la intención de reducir la contaminación por hongos mitospóricos y bacterias, respectivamente. Los ensayos de decoloración se realizaron en YMGA, Medio Bran Flakes (Pickard *et al.*, 1999), [el cual es un medio lignocelulósico que se prepara con 20 g de All Bran Flakes® molido por litro de medio, en amortiguador de fosfato de potasio dibásico 60 mM a pH 6 y agregando 15 g de agar para solidificar] y Medio de Kirk modificado (KM) que es un medio

definido, incoloro, limitado en nutrientes (Jarosz-Wilkolazka *et al.*, 2002) [el cual contiene 10 g glucosa, 0.25 g extracto de levadura, 2 g de fosfato de potasio monobásico, 1.8 g de 2,2-dimetilsuccinato, 0.5 g de sulfato manganoso heptahidratado, 0.1 g de cloruro de calcio, 0.5 g de tartrato de amonio, 0.8 mM de cloruro manganoso tetrahidratado, 150 μ M de sulfato de cobre y 1 mM de alcohol veratrílico por litro de medio, cuyo pH se ajustó a 4.5 antes de esterilizar]. Para los cultivos y ensayos de decoloración en placa se emplearon cajas petri de 90 mm de diámetro desechables conteniendo aproximadamente 20 ml de medio de cultivo y las cuales se incubaron a 28°C (incubadora Labnet 211 D o Novatech). En los cultivos sumergidos se omitió el agar y se colocaron 100 ml de medio en matraces Erlenmeyer de 250 ml o 200 ml de medio en matraces Erlenmeyer bafleados de 500 ml. Los cultivos sumergidos fueron incubados a 28°C y 150 rpm en un agitador orbital de 12 plazas con temperatura regulada marca Labline u otro similar de 25 plazas (Labline Series 25, New Brunswick Sci. Co. Inc). Todos los medios se esterilizaron en autoclave a 121°C y 15 libras de presión por 20 min.

6.4 Cepas fúngicas de referencia

Las cepas de referencia *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 (*Pch*), *Pleurotus ostreatus* ATCC 58053 (*POS*) y *Bjerkandera adusta* UAMH 8258 (*BAD*), fueron amablemente proporcionadas por el Dr. M. A. Pickard de la Universidad de Alberta en Edmonton, Canadá, conservadas en YMGA a 4°C y se reactivaron mediante resiembra periódica en este medio a 28°C, así como antes de cada ensayo.

6.5 Colecta de carpóforos y aislamiento de micelios vegetativos

Todos los aislados se obtuvieron de carpóforos colectados con un muestreo oportunista en las diferentes provincias fisiográficas del Estado de Nuevo León. La información de colecta y características de los hongos se registraron *in situ*, para luego herborizar el material siguiendo la metodología de Wu *et al.* (2004). Antes del

secado, se procedió a tomar muestras para el aislamiento y purificación de los micelios vegetativos, el cual se efectuó a partir de fragmentos de aproximadamente 2 mm de diámetro extraídos de la trama de los cuerpos fructíferos. Los fragmentos fueron tratados con peróxido de hidrógeno al 3 % por 2 min., lavados un mínimo de tres veces con agua destilada, colocados en YMGA-benomil y subcultivados en YMGA a 28°C hasta obtener cultivos puros. La observación de fíbulas con azul de algodón, al microscopio, confirmó que el aislado era un basidiomiceto (Thorn *et al.*, 1996). Los aislados fueron crecidos en YMGA hasta 5 cm de diámetro para ser integrados al cepario y conservados en refrigeración a 4°C. Cada dos meses se procedió a hacer la resiembra del cepario y cada aislado nativo o cepa de referencia se reactivó 5 días antes de cada ensayo en YMGA a 28°C.

6.6 Inóculo

Para la reactivación de cepas, un cilindro de agar de 5 mm de diámetro fue tomado de la periferia del cultivo refrigerado, se colocó en el centro de una caja de Petri y al llegar el crecimiento alrededor de 6 cm de diámetro se extrajeron cilindros de 5 mm de diámetro de la periferia del cultivo, estos cilindros se emplearon tanto para los ensayos en placa como para los cultivos sumergidos. Para los ensayos en placa, el inóculo consistió en uno de estos cilindros colocado invertido al centro de la caja de Petri. El inóculo para los cultivos sumergidos consistió en 3 de estos cilindros por cada 100 ml de medio (Gutiérrez Soto, 2004; Lodge *et al.*, 2004).

6.7 Ensayos en placa

6.7.1 Preselección de aislados con mejores capacidades ligninolítica y decolorante.

La mayor parte de los aislados formaban ya parte de la colección del laboratorio de enzimología de la FCB y habían sido ensayados en el sistema de

sustratos cromogénicos y colorantes (Gutiérrez Soto, 2004). En este sistema los sustratos guayacol y *o*-anisidina indicaron la presencia de oxidasas y/o peroxidasas extracelulares al revelarse en el área de crecimiento micelial un anillo de color pardo anaranjado o púrpura, respectivamente. El compuesto polimérico Poly R-478 al experimentar un cambio de color de rosa intenso a amarillo en el área de crecimiento, indica una depolimerización e indirectamente, la capacidad ligninolítica del micelio. Los tres colorantes empleados Azul brillante reactivo de remazol (RBBR), Rojo Ácido 44 (AR44 o Cristal Ponceau 6R) y Cristal violeta (CV) pertenecen cada uno a un grupo químico diferente de colorantes sintéticos: antraquinónico, azoico y triarilmetano, respectivamente. La desaparición del color en forma de halos en el área del micelio es indicativa de la capacidad decolorante del hongo sobre el colorante en cuestión.

Los nuevos aislados fueron ensayados por triplicado en cajas petri de 90 mm con medio de Bran Flakes en presencia del colorante polimérico Poly R-478 o del triarilmetano CV y comparando los resultados contra un testigo, basándonos en que estos colorantes forman un sistema de selección simple para aislados con alta capacidad de decoloración, de acuerdo a Gutierrez Soto (2004).

Para la selección de los aislados a ensayar se asignaron valores numéricos a cada uno de los resultados de las pruebas con los indicadores de actividad ligninolítica y/o decoloración, tanto de ensayos previos (Gutiérrez Soto, 2004) como con nuevos aislados. Para los sustratos indicadores de ligninólisis, se asignó el valor de 0 si la reacción fue negativa en *o*-anisidina (OA), guayacol (GUA) o Poly R-478 (PR) y el valor de 1 si la reacción fue positiva. En el caso particular de Poly R-478 se asignó un valor de 0.5 si se detectó depolimeración parcial del sustrato. Para los colorantes RBBR, AR44 y CV, representativos de los grupos químicos antraquinónico, azo y trifenilmetano, se asignaron valores de 2 si la decoloración ocurrió en el periodo de una semana, de 1 si fue mayor a una semana, de 0.5 si la decoloración fue parcial y de 0 si no ocurrió decoloración, para cada colorante. El índice de actividad ligninolítica y decolorante (**Apéndice F**) se obtuvo de la suma de cada resultado:

$$I_{AL\ y\ D} = R_x(OA) + R_x(G) + R_x(PR) + D(RBBR) + D(AR\ 44) + D(CV)$$

donde: $I_{AL y D}$ es el índice de actividad ligninolítica-decolorante, Rx es el valor del resultado con los sustratos cromogénicos y D es el valor de decoloración con los colorantes. Por ejemplo, el aislado LE67 mostró reacción positiva con OA y GUA, parcial depolimeración de PR, decoloración parcial de RBBR y decoloración total después de 7 días con los 2 colorantes restantes, su $I_{ALyD} = 1+1+0.5+0.5+1+1 = 5$.

Exceptuando el Poly R-478 que se adicionó al medio antes de esterilizar en autoclave, los sustratos indicadores y colorantes se agregaron al medio previamente esterilizado a partir de soluciones de trabajo 100x esterilizadas por filtración (Millipore 0.45 μm) para obtener una concentración final de 0.02% (200 ppm) (P/V). Los diámetros de las colonias, los indicios de reacción y datos de decoloración fueron registrados diariamente durante diez días y después cada semana durante un mes.

6.7.2 Selección de aislados con mejor capacidad decolorante

Los aislados con mejores capacidades ligninolítica y/o decolorante en Bran Flakes (BF), fueron seleccionados para ensayos de decoloración sobre RBBR, AR44 y CV en los medios YMGA y Kirk modificado (KM).

Posteriormente, los aislados de mejor desempeño fueron seleccionados para ensayarlos frente a una gama más amplia de colorantes. Para ello se agregaron el antraquinónico Verde Ácido 27 (AG27), los monoazoicos Rojo Ácido 183 (AR183), Naranja II (OII), el diazoico Negro 5 Reactivo (BK5), el indigoide Indigo Carmín (IN) y los triarilmetano Azul Brillante Reactivo (BBR) y Azul de Bromofenol (ABF).

Los resultados en cada una de las pruebas de decoloración fueron comparados contra los obtenidos con las cepas de referencia, para ello se asignó un valor numérico de 0, 0.5, 1 o 2 a cada repetición en función al grado de decoloración del sustrato (reactivo o colorante), siguiendo el procedimiento indicado en la sección anterior. Los resultados de las repeticiones se promediaron para cada sustrato y por último se sumaron los promedios. Los aislados que decoloraron de una forma más rápida y eficiente a una mayor diversidad de colorantes, sumaron un número mayor que los de bajo desempeño decolorante y se seleccionaron para los ensayos

posteriores de decoloración en placa o para identificar la naturaleza del sistema oxidativo implicado en su habilidad decolorante.

6.7.3 Obtención de sobrenadantes, extractos crudos y fracciones de diferente talla molecular de cultivos líquidos

Las muestras de cultivo consistieron en los sobrenadantes libres de células obtenidos mediante centrifugación a 14,000 rpm por 10 min (Eppendorf Centrifuge 5415c) de muestras de 1 ml tomadas de los cultivos líquidos.

Los extractos crudos se obtuvieron a partir de cultivos crecidos en medio TK o BF, a los que se determinó como mínimo cada tercer día la actividad enzimática y al graficarla contra el tiempo, se identificó el periodo de máxima actividad, se suspendió la incubación y se procesaron los cultivos. Para ello el micelio fue separado por filtración en papel Whatman No. 1 y el sobrenadante se congeló a -4°C por 48 h. Después de descongelarlo se removió el mucílago por decantación y filtrado y el extracto crudo se separó en alícuotas y se congeló.

Para obtener fracciones de diferente talla molecular a partir de un extracto crudo, se pasó este a través de una membrana de corte YM 10, montada en el sistema de ultrafiltración AMICON, con ayuda de una presión de 40 psi (libras por pulgada cuadrada) de nitrógeno gaseoso. El retenido consistió en la fracción de talla molecular elevada y el filtrado en la fracción de baja talla molecular.

6.8 Determinación del tipo de actividad enzimática

La actividad enzimática fue determinada por triplicado para cada muestra, extracto crudo o fracción en un espectrofotómetro Shimadzu UV-VIS mini 1240 (Oberlin, Ohio), la desviación estándar de los valores fue en todos los casos inferior al 5%. La actividad lignino peroxidasa LiP fue determinada por la oxidación del alcohol veratrílico (AV) a veratraldehído a 310 nm, en presencia de peróxido de hidrógeno (Tien y Kirk, 1988). La mezcla de reacción consistió de 0.1 ml de

muestra, extracto crudo o de alguna de las fracciones de su filtrado, 0.1 ml de H₂O₂ 10 mM, 0.1 ml de AV 60 mM y 2.7 ml de amortiguador de tartrato de sodio 50 mM a pH 4.5. Para los cálculos de actividad se consideró un coeficiente de extinción molar (ϵ_{310}) de 9.3 mM⁻¹ cm⁻¹. Una unidad de actividad LiP se definió como la cantidad de enzima que oxida un micromol de AV por minuto (Tien y Kirk, 1988).

La actividad MnP se determinó por el método de Wariishi *et al.* (1992), siguiendo el cambio de absorbancia debido a la formación del complejo Mn (III)-malonato dependiente de peróxido a 270 nm. La mezcla de reacción consistió en 0.1 ml de muestra, extracto crudo o de alguna de las fracciones de su filtrado, 0.1 ml de peróxido de hidrógeno 10 mM, 0.1 ml de MnSO₄ (Mn⁺²) 0.2 mM y 2.7 ml de amortiguador de malonato de sodio 50 mM pH 4.5. El cálculo de actividad se realizó con un $\epsilon_{270} = 11.59 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Wariishi *et al.*, 1992), considerando una unidad de actividad MnP como la cantidad de enzima que forma 1 micromol del complejo Mn⁺³-malonato por minuto. También se determinó la capacidad oxidativa del extracto crudo sobre sustratos de alto potencial redox, referidos como específicos de actividad de MnP, como lo son el par MBTH y DMAB (Castillo *et al.*, 1994; Jordaan y Leukes, 2003). La actividad MnP es capaz de acoplar por acción oxidativa ambos sustratos, dando lugar a la formación del producto púrpura indamina, el cual es detectado a 590 nm ($\epsilon_{590} = 53 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La actividad LiP también se evaluó siguiendo a pH 5.5 y 510 nm ($\epsilon_{510} = 18.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) la formación del producto de oxidación color rosado que resulta al combinarse 2,4-diclorofenol (DCP) 1 mM y 4-aminoantipirina (AAP) 8.2 mM en succinato de sodio 100 mM después de la adición de peróxido de hidrógeno a una concentración final de 0.1 mM (Ramachandra *et al.*, 1988). Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que transforma 1 μM de sustrato por minuto a 25°C.

La actividad lacasa fué rutinariamente determinada siguiendo la oxidación del 2,6-dimetoxifenol al compuesto naranja/parduzco 3,5,3',5'-tetrametoxidifenoquinona a 469 nm (Abadulla *et al.*, 2000; Claus y Filip, 1997). La mezcla de reacción consistió en 0.1 ml de muestra, extracto crudo o alguna fracción de su filtrado y 0.1 ml de DMOP 60 mM, en 2.8 ml de amortiguador de acetato de sodio 200 mM a pH 4.5 ($\epsilon_{469} = 49.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Una unidad de Lac se definió como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μmol de DMOP por min. Para la confirmación de actividad lacasa se siguió el método basado en la oxidación de la siringaldazina a su quinona en amortiguador de citrato-fosfato de sodio siguiendo la cinética a 525 nm ($\epsilon_{525} =$

$65 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Harkin y Obst, 1973; Szklarz *et al.*, 1989). La mezcla de reacción consistió en 0.1 ml de extracto crudo, 2.8 ml de amortiguador de citrato-fosfato de sodio 0.05:0.1 M (pH 5) y 0.1 ml de siringaldazina 0.1 mM disuelta en etanol.

6.9 Curvas de producción enzimática

Debido a que el proceso decolorante comúnmente es asociado a diferentes tipos de actividades enzimáticas, los aislados seleccionados en los ensayos de decoloración en placas, fueron crecidos en cultivos sumergidos en dos diferentes medios y condiciones de agitación, para determinar en cuáles era donde mejor se producían los diferentes tipos de actividades enzimáticas, así como los periodos de máxima actividad. Matraces de 250 ml conteniendo 100 ml de medio se inocularon con cada aislado por triplicado y se tomaron muestras de 0.5 ml cada tercer día a partir del tercer día de inoculación por un periodo de 30 días. A cada muestra de cultivo se le determinó por triplicado el tipo de actividad presente y la cantidad de unidades de actividad enzimática producidas, obteniéndose la media y desviación estándar de los valores.

6.10 Caracterización de los principios decolorantes

Para la caracterización de los principios químico-enzimáticos implicados en el proceso decolorante se realizaron ensayos en medio líquido y se utilizaron sustratos enzimáticos específicos para identificar su actividad y revelar zimogramas. Una vez identificada la actividad se determinaron sus parámetros operativos y el efecto de inhibidores sobre ella. Por último se buscó la existencia de mediadores.

6.10.1 Ensayos de decoloración en cultivos líquidos

Los aislados nativos seleccionados fueron desarrollados en cultivos sumergidos para identificar la naturaleza del sistema químico enzimático implicado en el proceso

decolorante. Como primer paso para relacionar el proceso decolorante con la actividad enzimática, se realizaron experimentos de decoloración microbiana y enzimática. En el primer caso, los colorantes AR44, CV y RBBR fueron agregados individualmente (concentración final 0.02%), a cultivos en medio Bran Flakes (100 ml) en el periodo de máxima actividad enzimática y la decoloración microbiana fue registrada en un espectrofotómetro Shimadzu UV-VIS mini 1240 (Oberlin, Ohio), midiendo a diferentes tiempos la disminución de la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción de cada colorante (510, 588 y 592 nm respectivamente) y comparando el valor con el control respectivo (100%). Además, para comprobar la capacidad decolorante de los fluidos extracelulares de los cultivos (decoloración enzimática), se obtuvieron muestras de 1 ml antes de la adición del colorante a los mismos y con los sobrenadantes libres de células se realizaron ensayos de decoloración sobre los mismos colorantes. La mezcla de reacción consistió de 3 ml que contenían 0.1 ml de muestra, colorante al 0.002 % (P/V) y amortiguador de acetato de sodio a pH 4.5 y los cambios en los valores iniciales de absorbancia fueron comparados contra un control sin muestra y otro control con muestra del cultivo previamente calentada a temperatura de ebullición por 10 min.

En otro ensayo, se intentó demostrar la relación entre el crecimiento micelial y los aumentos de la actividad enzimática con la capacidad decolorante. Se realizó con cultivos en Medio de Kirk modificado (KM) ya que este medio ofrece la ventaja sobre el Bran Flakes de ser incoloro y no presentar material particulado. Se inocularon dos series de 14 matraces Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de medio, con CS63 y se cultivaron por 30 días. Cada tercer día se tomó una muestra de los cultivos y se determinó actividad enzimática tipo lacasa, MnP y LiP. Al detectar actividad enzimática a partir del día 12 de cultivo y cada tercer día en adelante, se empezaron a retirar matraces por duplicado y se les determinó gravimétricamente la biomasa producida, separando el micelio por filtración en papel Whatman No. 1 previamente tarado y secando a peso constante en una estufa a 55°C (Horno Felisa). Para cada matraz de cultivo se obtuvo el extracto crudo y a cada uno de los extractos crudos se les determinó actividad lacasa, manganeso peroxidasa y lignino peroxidasa y los resultados se promediaron. Con alícuotas de los extractos crudos se efectuaron ensayos de decoloración empleando los colorantes Indigo IN, AR44, RBBR y CV. La decoloración fue medida como la pérdida de intensidad en el pico de máxima absorbancia reportado para cada uno de los colorantes y se obtuvo en un periodo de

24 h, utilizando 0.1 ml de extracto crudo en 3 ml de una mezcla de reacción con 0.002% de colorante.

6.10.2 Uso de sustratos enzimáticos específicos y retiro de cofactores

Debido al amplio rango de sustratos de las lacasas, muy probablemente su actividad puede confundirse con la de peroxidasas, dando falsos positivos para aquéllas, sobre todo en el caso de lacasas de alto potencial redox o cuando existen mediadores presentes en las reacciones de determinación. Por lo anterior, para distinguir entre las actividades de MnP, LiP y Lac se recurrió a ensayos con sustratos específicos, usando el par DMAB y MBTH para manganeso peroxidasas, el alcohol veratrílico (Tien y Kirk, 1988) y el par AAP y DCP para lignino peroxidasas y la siringaldazina para lacasas. Además, se utilizó el DMOP como sustrato y se fueron retirando co-sustratos específicos de cada enzima necesarios para llevar a cabo la oxidación del sustrato. Para retirar el manganeso en las determinaciones de actividad, el sulfato manganeso fue sustituido por etilendiaminotetracetato (20 mM) para atrapar por quelación al ion manganeso presente en las muestras y necesario como cofactor para la MnP. Para retirar el peróxido de hidrógeno se adicionó catalasa (200 U^{-1}) a las mezclas de reacción, lo cual inactivaría el proceso oxidativo de las peroxidasas (Jordaan y Leukes, 2003).

6.10.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida y zimogramas

Para confirmar la participación de la actividad lacasa en el proceso decolorante se recurrió al empleo de geles nativos discontinuos de poliacrilamida (Garfin, 1990) en los que el gel de concentración se preparó al 4% y el de separación al 12% (**Apéndice G**). La electroforesis en gel de poliacrilamida fue utilizada para separar las proteínas de una muestra de peso molecular superior a 10 kDa (fracción retenida por ultrafiltración de extracto crudo en el sistema Amicon) y obtener bandas de

proteínas que fueron reveladas por su actividad enzimática (sobre la SYR, ABTS o el DMOP) o decolorante (sobre el AG27 o el RBBR).

La determinación de la masa relativa de las proteínas se realizó en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), desnaturalizando previamente las proteínas en la muestra con mercaptoetanol y calor, revelándolas con azul brillante de Coomassie R-250 (0.1%) en solución fijadora (10% Ac. Acético, 40% metanol) dejando el gel sumergido hasta el día siguiente y destiñéndolo solo con la solución fijadora y utilizando el juego de estándares de proteína preteñido Kaleidoscope® de Biorad, que contiene Miosina (192,888), β -galactosidasa (111,383), albumina de suero bobino (57,409), anhidrasa carbónica (30,283), inhibidor de tripsina de soya (25,200), lisozima (12,883) y aprotinina (6,471) (Da) u otro juego de estándares de rango bajo de pesos moleculares de Bio Rad (SDS-Page low range molecular weight standards) consistente en albúmina de suero de bovino (66,200), ovalbúmina (45,000), anhidrasa carbónica (31,000), inhibidor de tripsina (21,500) y lisozima (14,400) (Da). Las electroforesis se realizaron en un sistema amortiguado con Tris-Glicina a pH 8.3, cargando un mínimo de 20 μ g de proteína en cada carril (alrededor de 5 μ l). La concentración de proteína fue determinada por el método de Bradford utilizando albúmina de suero de bovino como estándar y midiendo la absorbancia a 595 nm (Stoscheck, 1990). Las electroforesis se efectuaron a 120 V.

Los zimogramas se desarrollaron en geles nativos (en los que se omite el SDS en su elaboración y el mercaptoetanol y el tratamiento térmico en la muestra), revelando la presencia de la actividad enzimática en ausencia de cofactores (H_2O_2 y Mn^{+2}) colocándolos en amortiguador de acetato de sodio 200 mM, pH 4.5 y agregando el sustrato o el colorante. La actividad enzimática y la capacidad decolorante fueron reveladas mediante la aparición de una banda debida a la oxidación del sustrato (DMOP, SYR, ABTS) o a la desaparición del color. La reacción fue detenida agregando solución fijadora una vez detectadas las bandas de actividad.

6.10.4 Determinación de los valores óptimos de actividad y la estabilidad de la lacasa a pH y temperatura.

La temperatura y el pH son dos de las variables más importantes en los procesos enzimáticos. Los valores óptimos de actividad para estas variables fueron determinados en extractos crudos de cultivos desarrollados en medios Bran Flakes y Tien y Kirk modificado, de los aislados CS63 y LE95. La concentración de los extractos crudos se realizó por ultrafiltración, mediante el sistema Amicon®, utilizando una membrana de corte a 10 kDa. Para la determinación del pH óptimo de actividad los ensayos enzimáticos se realizaron a 25°C, utilizando DMOP como sustrato y amortiguadores de acetato de sodio 200 mM (rango pH 3-6) y citrato de sodio 50 mM /fosfato de potasio monobásico 100mM (rango pH 2.5-8). La muestra de reacción consistió en 10 µl del concentrado, 0.1 ml de DMOP y el resto del volumen de la celda de 3 ml se completó con amortiguador. El valor más elevado al comparar los resultados de actividad obtenidos después de incubar una muestra del concentrado a valores de pH de 2.5, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 y 7.0 se consideró como el 100% o valor óptimo de actividad de la enzima al pH conocido. El pH óptimo de actividad se mantuvo constante mientras se procedía a determinar la temperatura óptima de actividad en ambos aislados, lo cual se efectuó precalentando a diferentes temperaturas (25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90°C) las mezclas de reacción conteniendo DMOP en amortiguador de acetato de sodio 200 mM y agregando el concentrado. El valor de actividad determinado a 25°C (inicial) se comparó contra los valores obtenidos a las diferentes temperaturas (actividades finales) y se registró en porcentaje de actividad. Para las determinaciones de estabilidad a diferente temperatura y pH, los extractos crudos obtenidos a partir de cultivos en Bran Flakes fueron divididos en alícuotas que fueron incubadas por 5, 10, 15, 30, 60, 120 y 180 min a 60, 70, 80 y 90°C para los ensayos de temperatura y a valores de 2, 2.5, 3, 4, 5, 6 y 7 para los ensayos de pH. Después del periodo de incubación los ensayos se realizaron a 25°C o al pH óptimo de actividad para cada aislado y los resultados se compararon con los de determinaciones del concentrado respectivo antes de incubar, las cuales se tomaron como 100% de actividad.

6.10.5 Efecto de inhibidores de la actividad enzimática

El efecto de los inhibidores azida de sodio, ácido tioglicólico y EDTA sobre la actividad enzimática se ensayó al valor de pH óptimo determinado para cada uno de los aislados (3.5 para LE95 y 4.0 para CS63), usando DMOP como sustrato y amortiguador de acetato de sodio 200 mM. La actividad determinada en ausencia de inhibidores fue comparada contra aquella obtenida después de añadir diferentes concentraciones del inhibidor a la mezcla de reacción (azida de sodio 0.01, 0.1, 1.0, 2.5 mM, ácido tioglicólico 1.0, 2.0 y 10.0 mM y EDTA 2.5, 5.0, 40, 100 y 250 mM).

6.10.6 Determinación de la presencia de mediadores

Para revelar la presencia de mediadores de bajo peso molecular que pudieran estar participando en el proceso decolorante, se obtuvieron extractos crudos a partir de cultivos con elevada actividad lacasa y se procedió a la separación de los mismos en dos fracciones de acuerdo a su talla molecular. Para ello se utilizó un sistema de ultrafiltración AMICON con una membrana YM10, en la cual el 90% de las moléculas mayores a 10 kDa son retenidas. Para detectar la presencia de mediadores se determinó la actividad lacasa en las fracciones de bajo y alto peso molecular y se compararon con la determinada previamente al extracto crudo, postulando que, de estar presente algún tipo de mediador, la actividad enzimática detectada en el extracto crudo debería ser mayor que la suma de aquellas registradas en cada una de las fracciones individuales. De hecho lo que se esperaría es que la actividad estuviera ausente en la fracción no retenida (conteniendo mediadores de bajo peso molecular), mientras la actividad aparente en la fracción retenida se vería disminuida en ausencia de la fracción de bajo peso molecular, por el retiro de los mediadores, comparada con la obtenida con el extracto crudo. También se consideró que al reconstituir el extracto crudo mediante la conjunción de ambas fracciones la actividad inicial se restituiría (o sería muy semejante a la del extracto crudo original) y lo mismo sucedería al reconstruir el extracto crudo solamente con la fracción retenida en agua destilada.

Tratando de demostrar que en la fracción de baja talla molecular no habría mediadores y por tanto no ocurriría decoloración al retirar la Lac. Además de que actividades lacasa de valor similar en el extracto y en la fracción de talla molecular elevada causarían decoloraciones similares, la eficiencia decolorante de 100 μ l del extracto nativo fue comparada contra aquélla de un volumen de la fracción retenida diluido en agua hasta registrar una actividad igual a la del extracto y contra la de 950 ml del filtrado (volumen del extracto multiplicado por el factor de concentración del retenido), utilizando AG27 al 0.02% en agua.

7. RESULTADOS

7.1 Aislamiento y selección de los aislados nativos con mejor capacidad decolorante.

Los 109 hongos comparados en este trabajo forman parte del cepario del Laboratorio de Enzimología de la Facultad de Ciencias Biológicas y los carpóforos están depositados en el herbario UNL de la misma facultad. Una parte (91) fueron aislados en un trabajo previo en el que se estableció el sistema de evaluación de potencial ligninolítico y habilidad decolorante (Gutiérrez Soto, 2004) y 18 fueron aislados y probados en este trabajo. Al comparar los resultados de depolimerización (PR), de producción de oxidasas/peroxidasas (guayacol y *o*-anisidina) y de decoloración sobre RBBR, AR44 y CV hicimos una selección inicial de 10 aislados que mostraron capacidades ligninolítica y de decoloración mejores que las cepas de referencia internacionales sobre los grupos químicos azo, triarilmetano y antraquinónico.

Tabla III. Valores de los Índices de Actividad Ligninolítica y Decolorante en BF de los aislados en la Colección del Lab. de Enzimología. Ensayados por triplicado por Gutiérrez Soto (2004).

0 a 5.0 (bajo)	>5.0 – 8.0 (medio)	>8.0 – 9.0 (alto)
CF3 CF6 CP1 CS1 CS9 CS11	CF 2 CF5 CF7 CF9 CF10	CF4 CF11 CS5 CS5* CS20
CS19 CS21 CS22 CS24 CS25 CS31	CF11 CF12 CS2 CS6 CS27	CS54 CS61 CS62 CS63 CS64
CS39 CS41 CS43 CS44 CS50 CS52	CS48 CS60 CS78 LE7 LE31	CU1 LE5 LE13 LE78
CS65 CS66 CS67 CS77 CV1 CV2	LE32 LE35 LE45 LE48 LE54	<i>Pleurotus</i> sp
CV3 EM1 EM3 EM5 EM6 LE16	LE55 LE57 LE69 LE79	
LE24 LE33 LE34 LE44 LE50 LE52	<i>L. edodes</i> <i>P. chrysosporium</i>	
LE56 LE58 LE61 LE63 LE64 LE65		
LE66 LE67 LE68 LE72 LE73 LE75		
LE76 SM1 SM2		
<i>B. adusta</i> <i>G. aplanatum</i>		

En el **Apéndice F** aparecen los valores asignados para cada aislado de la Colección del Laboratorio de Enzimología, para el cálculo de su Índice de Actividad

Ligninolítica y Decolorante. En la Tabla III se ordenan en tres grupos, bajo, medio y alto, los valores del I_{ALyD} calculados para cada aislado. De estos aislados, nueve fueron seleccionados por tener un valor alto en su Índice de Actividad Ligninolítica y Decolorante: CS5 (9), CS63 (9), CU1 (9), LE5 (9), LE13 (9), CF11 (8.5), CS20 (9), CS61 (9) y LE78 (8.5). Un total de 18 nuevos aislados fueron probados sobre CV y PR en medio BF. De ellos solamente uno, LE95, fue seleccionado por su buen desempeño decolorante comparado con el resto de los nuevos aislados y fue agregado a la lista de los nueve obtenidos de la Colección para dar un total de diez aislados seleccionados. En la Tabla IV se aprecian los resultados del proceso de selección de nuevos aislados.

Tabla IV. Índice de Actividades ligninolítica y decolorante para nuevos aislados. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

CEPA	PR	CV	I_{ALyD}	CEPA	PR	CV	I_{ALyD}
CH32	0.5	0.5	1.0	EM10	1	1	2.0
CS80	0.5	1	1.5	LE80	0	0	0.0
CS81	0.5	1	1.5	LE85	0.5	1	1.5
CS82	1	0.5	1.5	LE90	0.5	1	1.5
CS83	1	0.5	1.5	LE91	0	0	0.0
CU2	0.5	1	1.5	LE95	1	2	3.0
CU3	1	1	2.0	Y4	0	0.5	0.5
CU4	0.5	1	1.5	Y5	1	1	2.0
CU5	1	1	2.0	Y6	0.5	1	1.5

Los resultados de la actividad decolorante de los 10 aislados seleccionados sobre RBBR, AR y CV, ensayada en los medios YMGA y TK se muestran en la Tabla V. De las cepas de referencia, *Bjerkandera adusta* BAD demostró mejor desempeño decolorante comparada con *Phanerochaete chrysosporium* Pch o *Pleurotus ostreatus* POS. CU1 y CS5 fueron los mejores aislados decolorando, CS63 y LE5 aunque fueron de rápido crecimiento su desempeño fue algo inferior, LE95 y LE13 crecieron un poco más lentamente que los cuatro anteriores, pero decoloraron mejor que CS61. CS20 al igual que CF11 presentaron pigmentación propia, lo que se consideró que podría influir en los resultados de ensayos posteriores de decoloración en medio líquido y LE78 resultó ineficiente para decolorar al cambiar el medio de cultivo de lignocelulósico a uno rico u otro limitado en nutrientes. Por lo que para los ensayos

de decoloración sobre una gama más amplia de colorantes se seleccionaron únicamente los aislados CS5, CS63, CU1, LE5, LE13 y LE95.

Tabla V. Actividad ligninolítica sobre PR y decolorante sobre RBBR, AR44 y CV de 10 aislados, ensayada en los medios YMGA y TK. Los ensayos se realizaron por triplicado.

	YMGA				I _{ALyD} Σ	TK				I _{ALyD} Σ	I _{ALyD} Total
	RBBR	AR44	PR	CV		RBBR	AR44	PR	CV		
LE5	2	1.75	0.875	1.5	6.13	2	1.188	0.938	1.188	5.313	11.44
LE13	2	1.75	1.5	0.875	6.13	2	1	1.063	0.938	5	11.13
LE45	2	0.875	1	0.875	4.75	2	1.75	0.75	0.5	5	9.75
LE78	2	1.5	0.75	0.125	4.38	1	0.938	0.75	1	3.688	8.06
LE95	2	1.75	0.75	1.5	6.00	2	1.25	1	1	5.25	11.25
CF11	2	1.625	0.625	1	5.25	2	2	0.5	0.75	5.25	10.50
CS5	2	1.5	2	1.75	7.25	2	1.5	1.5	1.5	6.5	13.75
CS20	1.5	1.25	1.25	1.125	5.13	2	1	0.875	0.938	4.813	9.94
CS61	1.75	1.25	0.75	0.813	4.56	2	1.125	0.75	1.125	5	9.56
CS63	2	1.75	1.25	1.75	6.75	2	1.75	0.625	0.875	5.25	12.00
CU1	2	2	1	1.5	6.50	2	2	2	2	8	14.50
BAD	1.75	1.375	1.75	1.25	6.13	2	1	1	1	5	11.13
<i>Pch</i>	1	0.5	0.75	0.125	2.38	1	0.5	0.875	0.5	2.875	5.25
POS	1.5	0.875	0.25	0.75	3.38	2	1	0.25	0.25	3.5	6.88

Los seis aislados con mejor desempeño decolorante en los medios lignocelulósico (BF), completo (YMGA) y limitado (TK) en nutrientes fueron probados sobre una gama más amplia de colorantes, que incluyó el antraquinónico Verde Ácido 27 (AG27), los monoazoicos Rojo Ácido 183 (AR183) y Naranja II (OII), el diazoico Negro 5 Reactivo (BK5), el indigoide Índigo Carmín (IN) y los triarilmetano Azul Brillante Reactivo (BBR) y Azul de Bromofenol (ABF). Los resultados se resumen en la Tabla VI.

Para facilitar la interpretación de los resultados, la Tabla VII combina los resultados de las dos tablas anteriores y en ella se han ordenado en forma descendente los seis aislados seleccionados de acuerdo al resultado final de la suma del valor de su índice decolorante o ligninolítico, obtenido en cada una de las etapas de selección.

Tabla VI. Capacidad decolorante de 6 aislados sobre una gama amplia de colorantes en tres medios diferentes. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

Aislado/ Colorante	Medio YMGA							
	IN	AR183	AG27	BBR	BK5	ABF	OII	I _{AD}
CS5	2	1	1.5	0.875	1.25	2	1.125	11.5
CS63	2	0.5	2	0.75	1	2	1.125	9.75
CU1	2	1	1.5	1	2	2	2	9.38
LE5	2	0.875	0.875	0.5	0.75	2	1	8.50
LE13	2	0.875	1.375	0.75	1.25	2	1.25	9.50
LE95	2	0.75	1.5	0.625	1.25	1.125	1.25	8.00
BAD	2	0.5	0.625	0.75	0.625	0.75	1	6.25
<i>Pch</i>	1.5	0.375	0.75	0.5	0.75	0.875	0.375	5.13
	Medio BF							
	IN	AR183	AG27	BBR	BK5	ABF	OII	I _{AD}
CS5	2	0.875	1	0.875	1.125	1.75	1.25	9.75
CS63	2	0.875	1	1.25	1.375	2	1	8.88
CU1	2	0.875	1	0.875	1.25	2	1.75	9.5
LE5	2	0.875	0.875	0.5	0.75	2	1	9.25
LE13	2	0.875	0.875	0.625	1.25	2	1.25	8.88
LE95	2	0.75	1.125	0.5	1.375	2	1.5	8.00
BAD	2	0.625	0.75	0.5	0.75	0.875	1	6.50
<i>Pch</i>	0.875	0	0.25	0	0	0.5	0	1.63
	Medio TK							
	IN	AR183	AG27	BBR	BK5	ABF	OII	I _{AD}
CS5	1.75	1	1.875	1.188	1.813	2	1.438	13.50
CS63	1.188	1	2	1.313	1.438	2	1.688	11.06
CU1	2	1.75	2	1.75	2	2	2	10.63
LE5	2	0.875	0.875	0.5	0.75	2	1	11.63
LE13	2	0.75	2	0.75	1.188	2	1.5	10.19
LE95	2	1.125	2	1.25	1.75	1.75	1.75	8.00
BAD	2	1	1.75	0.75	1	2	1	9.50
<i>Pch</i>	1.75	0.375	0.625	0.75	0.875	1.5	0.5	6.38

I_{AD} Índice de Actividad Decolorante

En base a los resultados se puede afirmar que los aislados con mejor desempeño decolorante fueron CU1 y CS5. Sin embargo, debido a que ambos aislados habían sido objeto de un estudio previo de Licenciatura y el estudiante decidió continuar trabajando con ellos en su proyecto de Posgrado, no fueron elegidos para continuar con los ensayos en medio líquido y con la caracterización de sus principios decolorantes. Por lo que para la siguiente etapa de nuestro proyecto fueron seleccionaron los aislados CS63 y LE95, mismos que debido al amplio rango de colorantes utilizados en el presente estudio, pueden considerarse igualmente

sobresalientes en su desempeño, comparadas con las referidas cepas. Además, hay que resaltar que estas cuatro cepas mostraron una capacidad superior a las tres cepas de referencia.

Tabla VII. Resumen de los ensayos en placa. Resultados con los aislados seleccionados y dos cepas de referencia sobre CV, AR44, CV y PR en dos medios de cultivo (4Cx2M) y sobre AR183, AG27, IN, OII, BBR, BK5 y ABF en tres medios de cultivo (7Cx3M). Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

Aislados	Indices de actividad ligninolítica y/o decolorante					
	4Cx2M		7Cx3M			TOTAL
	YMGA	TK	YMGA	BF	TK	
CU1	6.5	8	11.5	9.75	13.5	49.25
CS5	7.25	6.5	9.75	8.875	11.06	43.44
CS63	6.75	5.25	9.375	9.5	10.63	41.50
LE95	6	5.25	8.5	9.25	11.63	40.63
LE13	6.125	5	9.5	8.875	10.19	39.69
LE5	6.125	5.313	8	8	8	35.44
BAD	6.125	5	6.25	6.5	9.5	33.38
<i>Pch</i>	2.375	2.875	5.125	1.625	6.375	18.38

7.2 Identificación taxonómica

La identidad específica de los aislados seleccionados fue determinada en base a la morfología de los carpóforos mediante claves taxonómicas y confirmada mediante técnicas moleculares por el CBS en Holanda. El aislado CS63 fue identificado por medio de claves taxonómicas dicotómicas como *Trametes hirsuta*, pero el análisis molecular, que implica la región del Espaciador Transcrito Internamente (ITS por su acrónimo en Inglés) situada entre los genes 28S y 18S del DNA ribosomal, reveló que se trata de *Trametes (Funalia) trogii*. La identificación de LE 95 por su anatomía fue confirmada por técnicas moleculares como *Trametes pubescens*. CS5 fue identificado como *Trametes hirsuta* y CU1 como *Trametes (Cerreana) maxima*. El género *Trametes* es de distribución mundial, se caracteriza por su basidiocarpo pileado, no estratificado, de contexto (carne) firme, blanco, crema o pálido y coriáceo; su sistema trimítico de hifas (generativas, esqueléticas y conectivas); la presencia de fíbulas en las hifas generativas y sus esporas cilíndricas de pared

delgada que dan reacción de Meltzer (IKI) negativa (Ryvarden, 1991). La taxonomía de las especies se desglosa a continuación y las características diagnósticas en la Tabla VIII.

Taxonomía de los aislados nativos

Reino Fungi

Phylum Basidiomycota

Clase Basidiomycetes

Orden Polyporales

Familia Polyporaceae

Género *Trametes*

Trametes (Cerrena) maxima (Mont.) A. David & Rajchenb. 1985 (CU1)

Trametes (Coriolus) hirsuta (Wulfen) Pilát 1939 (CS5)

Trametes pubescens (Schumach.) Pilát 1939 (LE95)

Trametes (Funalia) trogii (Berk.) Bondartsev & Singer 1941 (CS63)

Tabla VIII. Características diagnósticas específicas de los aislados nativos.

Característica	Especie			
	<i>T. trogii</i>	<i>T. maxima</i>	<i>T. hirsuta</i>	<i>T. pubescens</i>
Forma y consistencia	Sésil, efuso-reflejo o resupinado, firme flexible a rígido	Sésil a umbonado en la base, correoso a rígido	Sésil a efuso-reflejo, coriáceo a rígido	Sésil, en masas circulares imbricadas unidas por el centro, coriáceo a firme o rígido
Color de carpóforo	Ocráceo, parduzco o bronceado,	Blanco a cenizo, cinéreo, bronceado ligero o pardo	Grisáceo a amarillento o parduzco	Blanco a grisáceo o amarillento
Tamaño L x A x h	6 x 12 x 2 cm	15 x 25 x 0.8 cm	6 x 10 x 1 cm	5 x 8 x 1 cm
Superficie y margen	Pubescente-hirsuto, azonado, margen delgado y agudo	Tomentoso a hirsuto-tomentoso, en zonas concéntricas o parches, margen entero, lobado o entero	Hirsuto a tomentoso, zonado fuertemente a acanalado de margen oscuro	Subglabro a viloso-tomentoso o tomentoso a casi hirsuto en la base, radial-linear hacia el margen
Contexto, color, grosor	Blanco, fibroso, 2-5 mm	Blanco o pálido, suave a subcorchoso, 1-5 mm	Blanco, 1-6 mm	Blanco, 1-5 mm

Tabla VIII. Características específicas de los aislados nativos (Continuación).

Característica	Especie			
	<i>T. trogii</i>	<i>T. maxima</i>	<i>T. hirsuta</i>	<i>T. pubescens</i>
Tubos	3-7 mm largo, raramente en 2 capas, paredes gruesas y enteras, bocas subcirculares a angulares e irregulares	1-1.25 mm largo, paredes gruesas, rígidas, irpiciformes, bocas irpiciformes o dedaleoides	1-4 mm largo, paredes gruesas y enteras, a veces delgados y de márgenes lacerados, bocas semicirculares	1-4(-6) mm largo, paredes delgadas, dentadas, bocas angulares
Aspecto de la superficie con poros y número por mm	Blanquecina, grisáceo o lavanda si en crecimiento, 3	Blanquecina, amarillenta, de aspecto denticulado, 2-3	Blanca, amarillenta a humo, 3-4	Blanca a amarillenta, 3-4
Esporas	Cilíndricas ligeramente curvas, hialinas, 8-10 x 2-3 μ m	Oblongo-elipsoides o cilíndricas, lisas, hialinas, 4-5 x 2-2.5 μ m	Cilíndricas o alantoides, lisas, hialinas, 4.5-7 x 2-2.5 μ m	Cilíndricas o alantoides, lisas, hialinas, 5-8 x 2-2.5 μ m
Cistidios		NO	NO	NO
Estaquillas hifales (pegs)	Presentes	Abundantes y conspicuos	No abundantes, cónicas a cilíndricas	Raros
Fíbulas	SI	SI	SI	SI escasas
Caracter diagnóstico	Contexto blanco, sin hifas pardas, poros de bocas blancas y pequeñas	El tomento en una capa superior sobre una línea color castaño que lo separa del contexto inferior homogéneo, superficie porosa rasposa	Una zona negruzca o pardo-oscura en el margen del pileo, superficie porosa regular	

7.3 Curvas de producción enzimática

Una vez demostrada la capacidad decolorante en placa de los aislados CS63 y LE95, la siguiente interrogante fue en qué etapa del ciclo vital produce los compuestos químico-enzimáticos asociados al proceso. Para ello se crecieron los

aislados en medio BF y TK bajo dos diferentes condiciones de agitación y se determinó y cuantificó las actividades enzimáticas de tipo Lac, MnP y LiP cada tercer día por un mes. Los resultados de la cuantificación del tipo de producción enzimática para cada aislado a lo largo de 30 días se aprecian en las Fig. 3A, para el caso de actividad tipo Lac y Fig. 3B, para la tipo MnP detectadas ambas en LE95 y en la Fig. 4 para la actividad tipo Lac detectada como único tipo de actividad enzimática en CS63. En ninguno de estos dos aislados nos fue posible detectar bajo nuestras condiciones de cultivo actividad del tipo LiP.

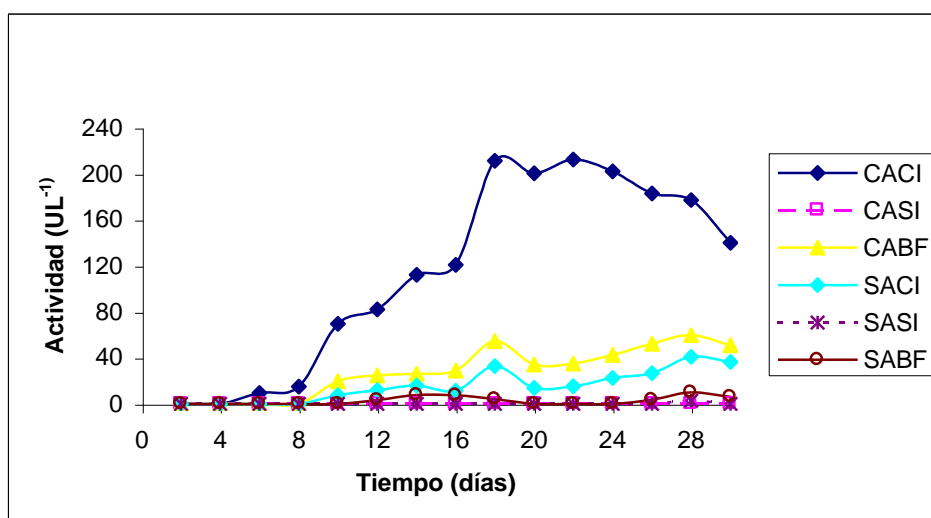


Figura 3A. Actividad enzimática tipo Lac detectada en cultivos de LE95. En un periodo de 30 días en medio de Tien y Kirk con agitación, con (CACI) y sin (CASI) inductores; sin agitación, con (SACI) y sin inductores (SASI) y en medio Bran Flakes con (CABF) y sin (SABF) agitación. Los ensayos se realizaron por triplicado y en todos los casos la desviación estándar fue menor al 5%.

La actividad Lac fue tres a cuatro veces más elevada en los cultivos en el medio limitado en nutrientes (TK) con agitación e inductores (AV, Mn⁺⁺, Cu⁺⁺) que la detectada en medio lignocelulósico (BF) con agitación. En el medio TK con inductores, sin agitación, la actividad fue 4 a 14 veces menor que en el mismo medio con agitación. La actividad en el medio con agitación e inductores fue detectada a partir del día 6, para llegar a un máximo alrededor del día 18 y decaer a partir del día 24. En los medios SACI y CABF la actividad fue subiendo gradualmente a partir del día 10 para decaer después del día 28, siendo mayor siempre en el medio BF agitado. En el resto de las condiciones la producción de Lac fue prácticamente nula.

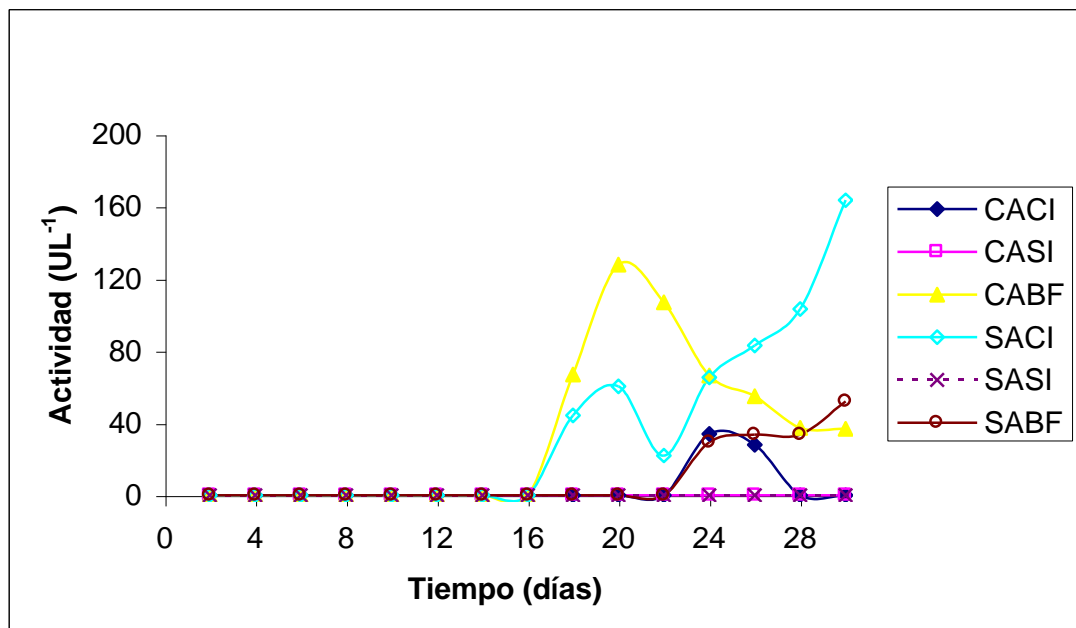


Figura 3B. Actividad enzimática tipo MnP detectada en cultivos de LE95. En un periodo de 30 días bajo las mismas condiciones que en la figura anterior. Los ensayos se realizaron por triplicado y en todos los casos la desviación estándar fue menor al 5%.

La producción de MnP en LE95 se presentó siempre después de la de Lac. Siendo mayor para el medio de TK con inductores, pero sólo hasta el día 30 de cultivo. Gráficos similares, con un pico breve de producción se presentaron en el medio de Bran Flakes agitado y el de TK agitado y con inductores, en el primero la producción fue mayor y anterior (día 20) mientras en el segundo fue casi cuatro veces menor y posterior (día 24). Gráficos similares se observaron también en condiciones no agitadas en TK con inductores y BF, en el primero la producción inició el día 18 mientras en el segundo ocurrió hasta el día 24 y fue alrededor de 2.5 veces inferior.

La producción enzimática del tipo Lac en CS63 fue seis veces mayor comparada con la de LE95. Para CS63 el medio lignocelulósico le fue más favorable tanto agitado como en reposo, a diferencia de las condiciones óptimas de producción de LE95. De hecho la producción fue similar en este último (SABF) y el de TK con agitación e inductores. Aunque la producción inició 8 días antes en medio TK con inductores y reposo que aquella con inductores y agitación, su producción fue alrededor de la mitad que esta última.

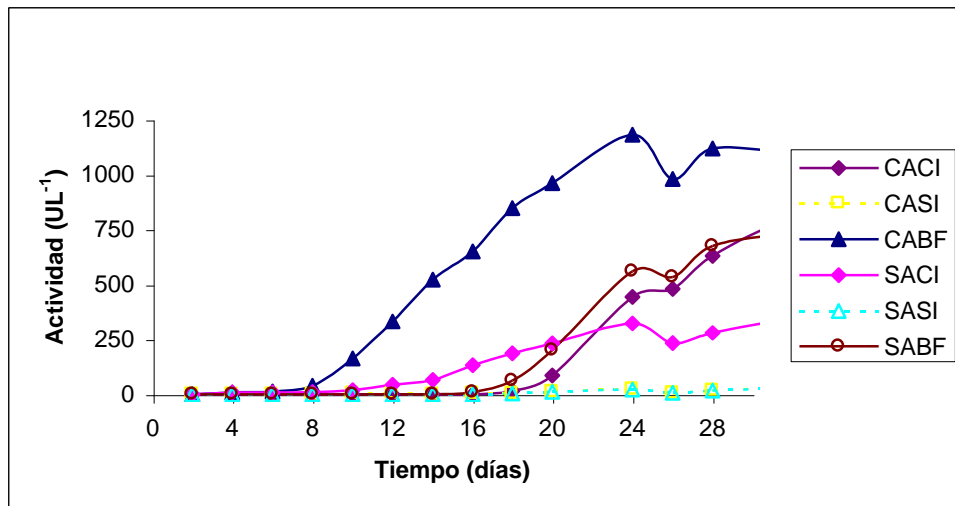


Figura 4. Actividad enzimática tipo Lac detectada en cultivos de CS63. Las condiciones son las mismas que en la Figura 3A. Los ensayos se realizaron por triplicado y en todos los casos la desviación estándar fue menor al 5%.

7.4 Caracterización de los principios decolorantes

7.4.1 Ensayos de decoloración en cultivos líquidos y con muestras de cultivos

Los ensayos con extractos crudos de cultivos sumergidos indicaron que antes de 16 días, la única actividad enzimática presente era del tipo lacasa. Para determinar si el proceso de decoloración podía atribuirse a esta actividad enzimática, se realizaron ensayos de decoloración con cultivos sumergidos (Tabla IX) y con sus muestras libres de células (Fig. 5). Al agregar los colorantes (0.02% P/V) a cultivos sumergidos de 12 días (19.44 UI^{-1} LE95 y 129.5 UI^{-1} CS63), hubo decoloración, aunque en diferente grado dependiendo del tipo de colorante ensayado. Como se observa en la Tabla IX, el colorante CV fue prácticamente decolorado en su totalidad por los cultivos miceliarés, mientras el RBBR fue decolorado más eficientemente por CS63 que por LE95. AR44 resultó el más difícil de decolorar bajo estas condiciones. La inspección visual permitió determinar que la desaparición de color no se debió a adsorción al micelio.

Tabla IX. Porcentajes de decoloración de RBBR, AR44 y CV obtenidos en cultivos sumergidos de LE95 y CS63. Colorantes al 0.02% en 100 ml de cultivos de 12 días. Los ensayos por triplicado tuvieron valores inferiores al 5% en su desviación estándar.

Tiempo (hrs)	RBBR		AR44		CV	
	CS63	LE95	CS63	LE95	CS63	LE95
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1	52.6	69.7	54.8	50.6	49.9	64.5
2	61.5	75.1	59.9	59.1	61.6	74.8
4	69.4	77.5	66.2	67.3	76.4	83.9
6	77.7	80.0	67.2	73.3	85.1	88.2
24	92.1	87.5	74.9	83.5	94.8	93.3

Los resultados de decoloración con las muestras libres de células de los cultivos, tomadas a los 12 días se muestran en la Figura 5. En ella se aprecia la caída

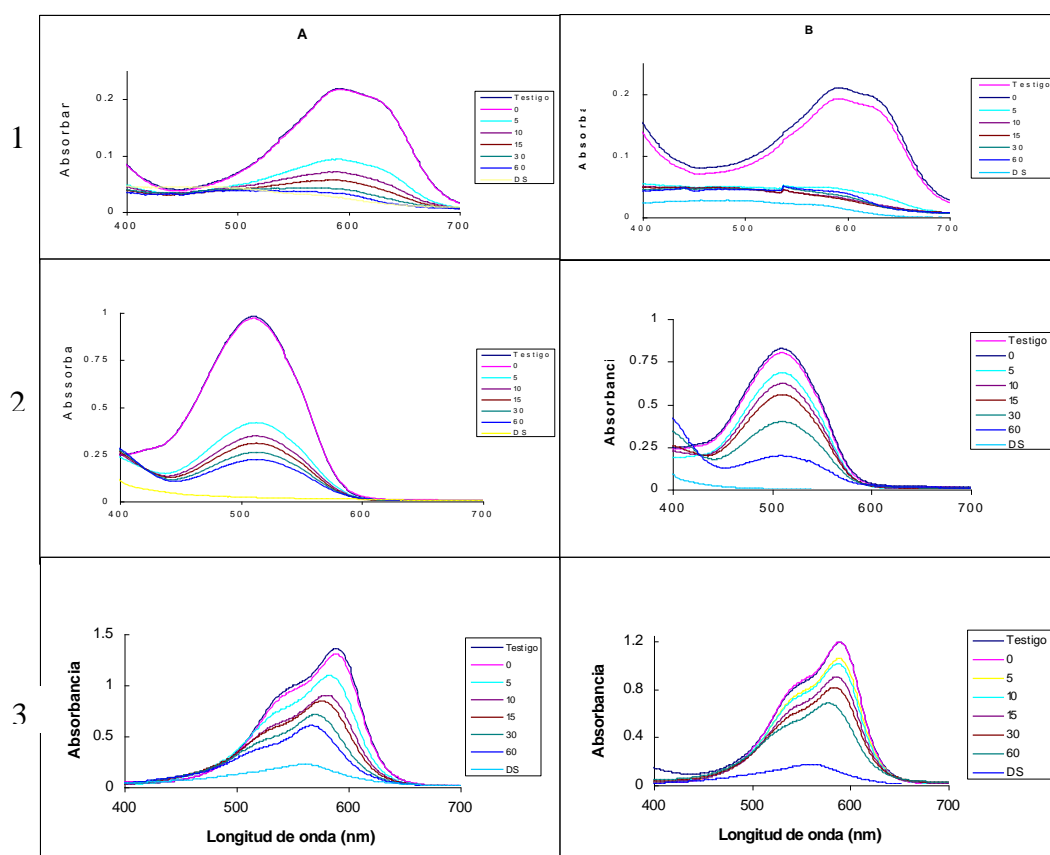


Fig. 5. Curvas de disminución de absorbancia de los colorantes RBBR (1), AR44 (2) y CV (3) con muestras de cultivos de LE95 (A) y CS63 (B). Soluciones acuosas al 0.002% aplicando 100 μ l de una muestra de cultivo en un volumen final de 3 ml y siguiendo el cambio de absorbancia a los 5, 10, 15, 30, 60, 120, 240, 360 min y a las 24 h. El testigo fue la muestra de cultivo tratada con calor. Los ensayos se realizaron por triplicado y en todos los casos la desviación estándar fue menor al 5%.

de la absorbancia debida a la capacidad decolorante extracelular de los dos hongos a lo largo de 24 h. Un efecto hipsocrómico (desplazamiento hacia la izquierda del pico de absorción) debido a la acción decolorante se aprecia en el CV. Los resultados expresados como porcentajes de decoloración a lo largo de este tiempo y medidos como la pérdida de absorbancia con respecto al pico de máxima absorción para cada colorante se aprecian en la Tabla X y gráficamente en la Figura 6. Los resultados demuestran que la capacidad decolorante varía en cada hongo de acuerdo al tipo de colorante. Todas las cepas nativas mostraron mejor capacidad que la de referencia *B. adusta*. El RBBR resultó el colorante más difícil de decolorar bajo estas condiciones.

Tabla X. Porcentajes de decoloración obtenidos con muestras de 100 µl de cultivos de 12 días de BAD, LE13, LE95 y CS63. Los ensayos por triplicado tuvieron valores de desviación estándar inferiores a 5%.

Tiempo (min)	BAD			LE13			LE95			CS63		
	RBBR	AR44	CV	RBBR	AR44	CV	RBBR	AR44	CV	RBBR	AR44	CV
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
5	3.9	3.8	1.2	61.2	13.5	8.5	52.1	41.4	15.9	72.7	10.7	11.6
10	4.2	5.4	2.1	70.8	20.3	15.7	63.9	51.4	32.7	81.4	19.0	15.1
15	5.2	5.3	2.6	71.2	24.6	29.0	71.3	56.8	40.1	82.4	27.4	24.7
30	6.8	6.5	12.2	71.0	51.3	49.1	79.3	63.6	56.3	79.3	48.2	32.5
60	6.4	7.1	19.0	73.7	78.3	62.8	83.4	68.9	67.3	76.3	74.3	46.8
120	7.8	8.5	29.9	73.1	95.8	71.5	81.0	76.9	76.6	74.8	95.0	61.4
240	11.0	9.1	34.5	74.8	96.8	81.1	86.8	93.1	84.3	78.8	96.2	72.8
360	15.0	7.0	42.7	87.2	97.2	78.8	87.1	95.0	88.4	76.1	94.9	79.4
24 h	37.3	15.6	72.0	81.5	97.9	91.1	87.2	97.3	93.7	91.4	100.0	91.0

Para confirmar que la pérdida de color podía atribuirse a la actividad enzimática, se realizaron diferentes pruebas con muestras de cultivos. En la primera prueba, las muestras fueron sometidas a un tratamiento con calor, colocándolas 10 minutos en agua a punto de ebullición, dejándolas enfriar antes de agregarlas a una mezcla de reacción conteniendo amortiguador de acetato de sodio y colorante. Mientras en las mezclas con los extractos no tratados ocurría decoloración, en aquéllas sometidas al tratamiento con calor se perdió la capacidad decolorante (Testigos en la Figura 5).

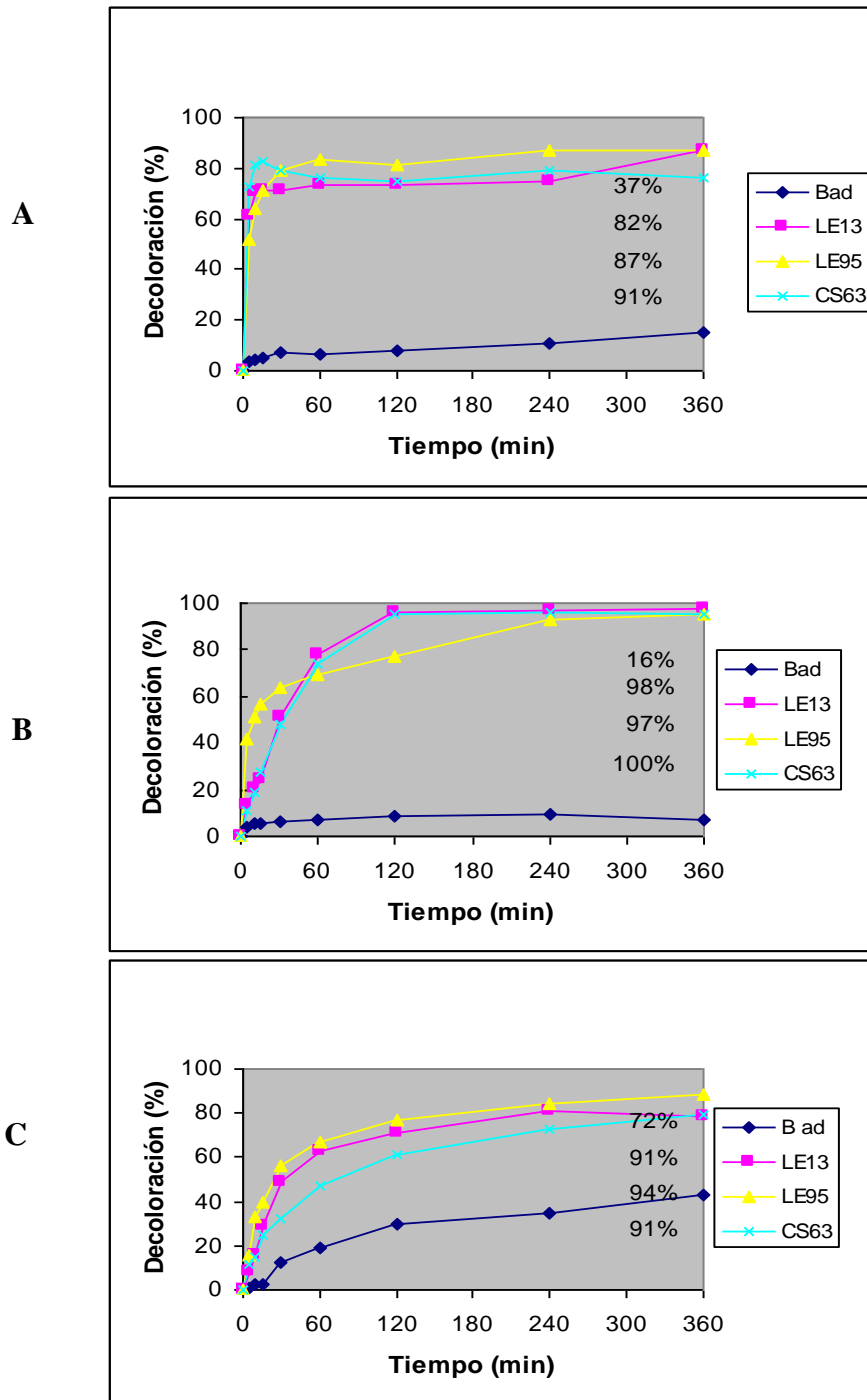


Fig. 6. Decoloración de A) RBBR, B) AR44 y C) CV por muestras de cultivos de *B. adusta*, LE13, LE95 y CS63. Las gráficas se elaboraron con los datos de la Tabla X y comprenden hasta las 6 horas. La concentración de los colorantes utilizada fue 20 ppm. Los porcentajes frente al cuadro de leyenda son las decoloraciones alcanzadas a las 24 horas. Los ensayos se realizaron por triplicado y en todos los casos la desviación estándar fue menor al 5%.

En otro experimento de decoloración con muestras de cultivos (sobrenadantes) se hizo evidente que entre los colorantes ensayados, algunos eran más susceptibles que otros de decolorar, pudiéndose distinguir tres grupos (Fig. 7). En el primero las absorbancias caían abruptamente durante las primeras 24 h perdiendo más del 50% del color rápidamente, por lo que se podrían considerar de fácil decoloración, es el caso de RBBR, AR44, CV, ABF, AG27 e IN. El segundo grupo es degradado paulatinamente conforme transcurre el tiempo y es decolorado finalmente en un menor grado (50-80%) que los del primer grupo (que alcanzan finalmente un 85-100%). En este segundo grupo que incluye al OII, BK5 y BBR los dos últimos sufren una transformación, cambiando su color original sin ser clarificados en su totalidad (por ejemplo, BK5 cambia de azul oscuro a purpúreo). En un último grupo estaría el AR183, el cual después de una decoloración inicial se tornó recalcitrante al proceso de decoloración.

Este experimento se realizó en un volumen de 3 ml con 300 microlitros de cultivos de 12 días y 0.002% de colorante en agua. Las actividades de LAC para LE95 y CS63 fueron respectivamente de 29.5 UI⁻¹ y 220 UI⁻¹. LE95 decoloró en alrededor de un 95% los colorantes Indigo, RBBR, AG27 y ABF en 24 h. De los colorantes restantes 3 fueron decolorados en más de un 50%: BK5 (89%), BBR (71%), OII (61%) mientras el AR183 prácticamente no sufrió decoloración. Los colorantes IN, ABF, AG27, RBBR fueron decolorados en un porcentaje superior al 95% en 24 h por CS63, mientras el BK5 y OII en un 78 y 52 % respectivamente en el mismo periodo y el AR183 y BBR fueron los menos susceptibles al ataque de los principios químico enzimáticos ya que sus curvas de decoloración se aplanaron en 44 y 36 % en 24 h y ya no cayeron más.

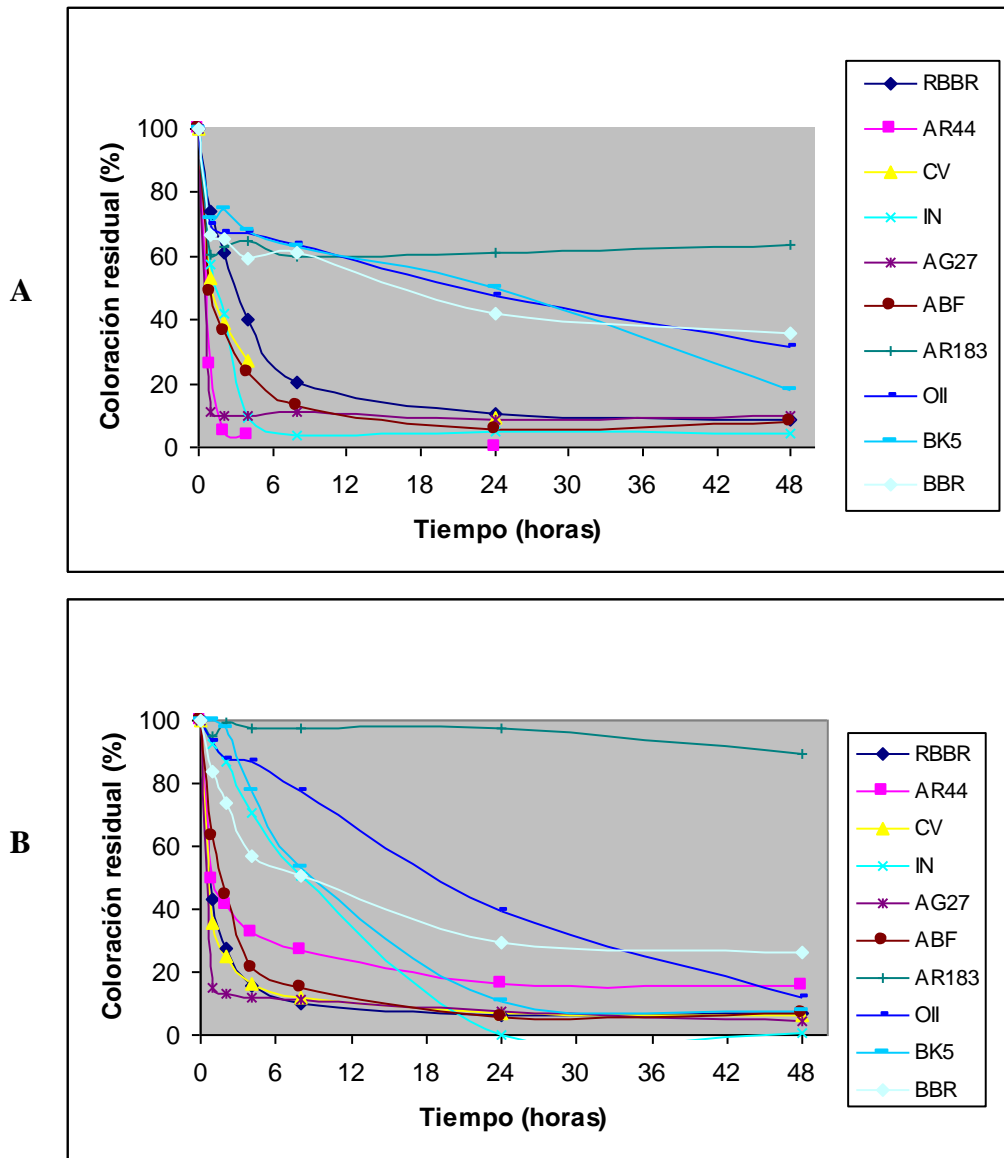


Fig. 7. Pérdida de color por diferentes colorantes debido a la acción de los sobrenadantes de A) CS63 y B) LE95. Los ensayos se realizaron por triplicado y en todos los casos la desviación estándar fue menor al 5%.

(ver también **Apéndice G**).

En la segunda prueba, se trató de determinar si el efecto decolorante dependía de la proporción de los principios decolorantes en la muestra de cultivo (sobrenadante) y como le afectaba la concentración de colorante. La Figura 8 muestra los resultados con el colorante OII, manteniendo una concentración fija de este colorante mientras se incrementaba la proporción de la actividad enzimática tipo

lacasa y al aumentar la concentración del colorante, manteniendo fijo el valor de las unidades de actividad. El colorante se seleccionó debido a que su decoloración es menor y más lenta que los usados en ensayos anteriores (RBBR, AR44 y CV) y es decolorado por ambos aislados. Al haber una mayor actividad enzimática ocurrió una mayor decoloración (grupos de barras). Mientras que al aumentar la concentración de colorante la capacidad aumenta para después disminuir (comportamiento de una misma barra entre grupos). Resultados similares se obtuvieron para LE95.

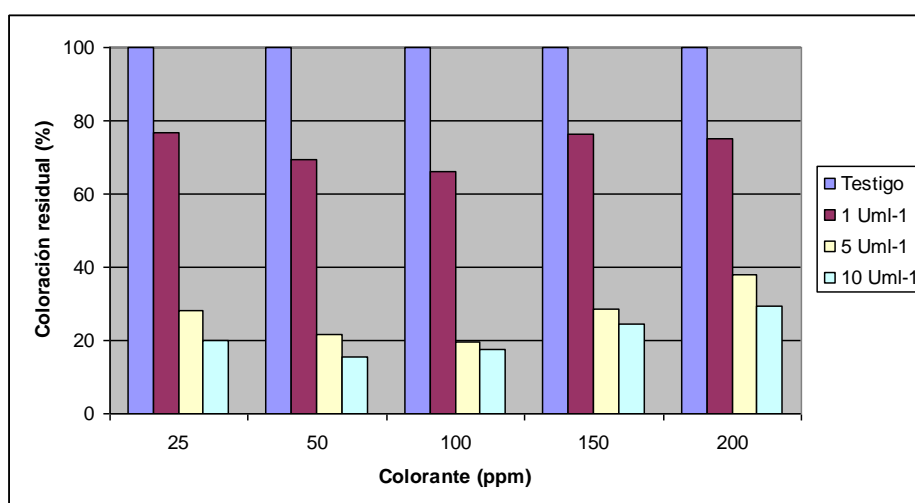


Fig. 8. Efecto de la concentración de colorante y las unidades de actividad tipo lacasa de cultivos de CS63 en el proceso de decoloración del OII. Los ensayos se realizaron por triplicado y en todos los casos la desviación estándar fue menor al 5%.

En una tercera prueba se observó el efecto de tres agentes químicos que poseen efectos inhibidores de la actividad de las lacasas y otras enzimas oxidativas. Para ellos se utilizaron muestras de extractos crudos de cultivos de LE95 y CS63 con 10 U de actividad y se comparó la decoloración al cabo de 2 horas sobre una concentración de 200 ppm de cada uno de los colorantes RBBR, AR44 y CV, en ausencia y presencia de 10 mM de cada uno de los inhibidores azida de sodio, ácido tioglicólico y EDTA. La tabla XI resume los resultados, en los cuales la azida de sodio y el ácido tioglicólico inhibieron la decoloración, mientras la presencia del EDTA solo lo hizo parcialmente.

Tabla XI. Porcentajes de decoloración por extractos de cultivos de LE95 y CS63 (10 U Lac) sobre los colorantes RBBR, AR44 y CV (200 ppm) en ausencia (Testigo) y presencia de 10 mM de inhibidores enzimáticos después de 2 h.

Aislado	Colorante (0.02%)	Testigo (0 mM)	Azida de Sodio (10 mM)	Ac. Tioglicólico (10 mM)	EDTA (10 mM)
CS63	RBBR	80	0	0	72
	AR44	95	0	0	86
	CV	83	0	0	75
LE95	RBBR	90	0	0	46
	AR44	73	0	0	37
	CV	92	0	0	45

Las Figuras 9 y 10 resumen los resultados de los ensayos en que se intentó relacionar el crecimiento micelial con la producción enzimática y los incrementos de ésta con la capacidad decolorante. Los ensayos corresponden solamente al aislado CS63 y se escogió este aislado sobre LE95 por poseer las ventajas de presentar un crecimiento más rápido, una mayor producción enzimática y debido a que no requiere de la adición de cofactores (manganeso o peróxido de hidrógeno) en sus procesos oxidativos. En la primera gráfica se observa que al volverse asintótica la curva de crecimiento medida en función de la biomasa de los cultivos (alrededor de 3.5 g l^{-1}), se inició la producción enzimática y siguió incrementándose a lo largo de todo el ensayo (valor máximo $3,000 \text{ UI}^{-1}$). En la segunda gráfica se repite la curva de actividad y se observa que al incrementarse los valores de la misma aumentó la capacidad decolorante sobre RBBR e IN (hasta un 73 y 15% respectivamente). Del mismo gráfico podemos concluir que estos colorantes fueron más susceptibles de decoloración por CS63 que CV o AR44.

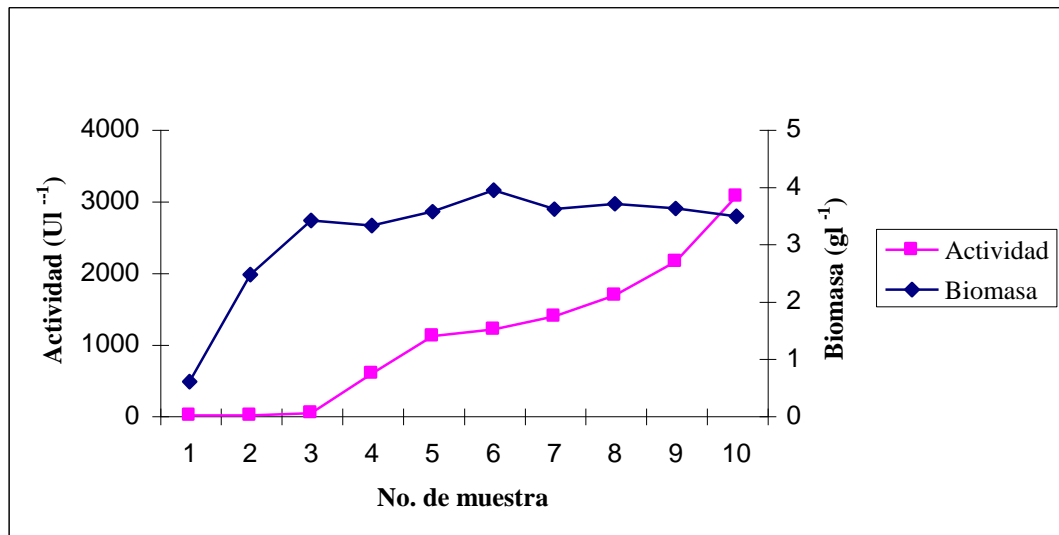


Fig. 9. Curvas de actividad lacasa y producción de biomasa de *Trametes hirsuta* CS63 a lo largo de 30 días de cultivo en medio Tien y Kirk modificado. Los números de muestra corresponden a tomas realizadas cada tercer día. A partir de la muestra 4 se extrajeron matraces con cultivos y se obtuvieron sus extractos crudos y biomasa. Los ensayos se realizaron por duplicado y en todos los casos la desviación estándar fue menor al 5%.

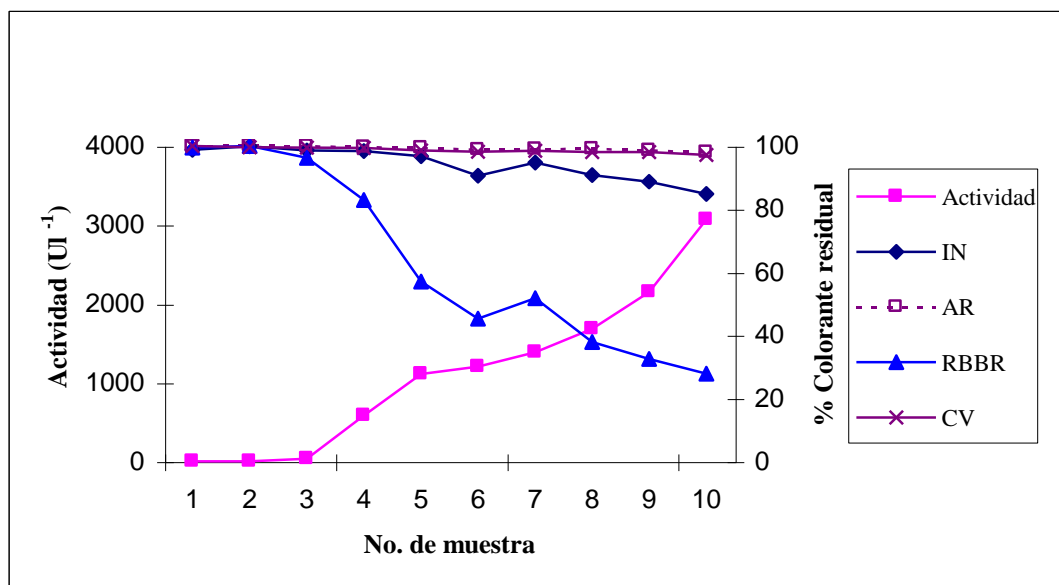


Fig. 10. Curvas de actividad lacasa en cultivos de *T. hirsuta* CS63 a lo largo de 30 días de cultivo en medio Tien y Kirk modificado y el efecto decolorante de sus extractos crudos sobre 4 colorantes. Los números de muestra corresponden a tomas realizadas cada tercer día. A partir de la muestra 4 se extrajeron matraces con cultivos, se obtuvieron sus extractos crudos, se les determinó actividad enzimática y con ellos se corrieron los ensayos de decoloración. Los ensayos se realizaron por duplicado y los valores tuvieron una desviación estándar inferior al 5%.

7.4.2 Uso de sustratos enzimáticos específicos y retiro de cofactores

La Tabla XII resume los ensayos realizados para caracterizar el tipo de actividad enzimática en extractos crudos de cultivos de CS63 y LE95 en medio de Bran Flakes obtenidos a los 12 días de crecimiento. Los resultados de las pruebas fueron iguales para ambos aislados. Empleamos inicialmente para determinar el tipo de actividad enzimática los sustratos siringaldazina para lacasa, alcohol veratrílico para lignino peroxidasa y el ácido malónico y sulfato manganoso para manganeso peroxidasa, todos ellos sustratos específicos de cada tipo de actividad enzimática. Los resultados con estos sustratos indicaron que el tipo de actividad presente en cultivos jóvenes siempre correspondía a lacasa y sólo para LE95 en cultivos maduros, a MnP. Nunca pudimos detectar bajo nuestras condiciones algún tipo de actividad LiP. Sin embargo, al emplear pares de sustratos específicos para confirmar la ausencia de peroxidases, los resultados positivos con el par DMAB + MBTH hicieron sospechar la presencia de MnP y aquéllos con AAP y DCP la presencia de LiP. Por lo que para confirmar la lacasa como única actividad decolorante en los cultivos de CS63 y los jóvenes de LE95 utilizamos DMOP y retiramos los cofactores necesarios para la actividad oxidante de las peroxidases, reafirmando la presencia de la actividad lacasa como única responsable en el proceso.

Tabla XII. Resultados de ensayos con diferentes sustratos y en presencia y ausencia de cofactores para confirmar el tipo de actividad presente en extractos crudos de cultivos de LE95 y CS63 en medio TK. Los resultados fueron idénticos para ambos aislados.

Sustrato	Reactivos en la mezcla de reacción				R	Presencia presuntiva de		
	Cofactor		Catalasa	EDTA		Lac	MnP	LiP
	H ₂ O ₂	Mn ⁺⁺						
SYR	-	-	-	-	+	+	-	-
Malonato	+	+	-	-	+	-	+	-
AV	+	-	-	-	-	-	-	-
DMAB+MHBT	-	-	-	-	+	-	+	-
AAP+DCP	-	-	-	-	+	-	-	+
DMOP	+	+	-	-	+	+	+	+
DMOP	+	-	-	+	+	+	-	+
DMOP	-	-	+	+	+	+	-	-

R resultado, + - presencia o ausencia del cofactor, el reactivo o la actividad enzimática en la mezcla de reacción. Ensayos realizados por triplicado.

7.4.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida y zimogramas

Hasta aquí los experimentos apuntaban a que la capacidad decolorante del hongo podía atribuirse a un agente extracelular termolábil, de peso molecular superior a 10 kDa, con actividad oxidante, de potencial redox aparentemente elevado y muy probablemente de tipo lacasa.

Como una prueba contundente de que la actividad lacasa era la única responsable del proceso decolorante registrado por los extractos crudos de los aislados, se decidió emplear electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). En un gel en presencia de SDS separamos las proteínas de una muestra desnaturalizada de acuerdo a peso molecular y carga iónica y establecimos su posición relativa en el gel, revelándolas con azul de coomasie y comparando su posición relativa con la de marcadores de masa conocida. Este gel lo comparamos con zimogramas en los que las proteínas de una muestra nativa fueron separadas y reveladas por su actividad decolorante sobre el gel nativo previamente teñido con AG27 y RBBR. El razonamiento fue que al efectuar la separación de las proteínas nativas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, eliminamos completamente la posibilidad que estuvieran presentes mediadores que pudiesen contribuir a la oxidación de sustrato o a la decoloración y si las bandas reveladas por la oxidación del sustrato DMOP coincidían en posición con las bandas de decoloración, estaríamos confirmando sin lugar a dudas que la lacasa era la enzima responsable del proceso decolorante. Los resultados se muestran en la Figura 11 donde se revela la actividad lacasa de LE95 como un grupo de bandas (isoformas) que migran entre los marcadores ovalbúmina y fosforilasa b (45 y 97 kDa) y la de CS63 como una banda única que migra entre la anhidrasa carbónica y ovalbúmina (31 y 45 kDa). Las bandas decoloradas coincidieron con las bandas de zimogramas en los que la actividad lacasa fue evidenciada por la oxidación de DMOP.

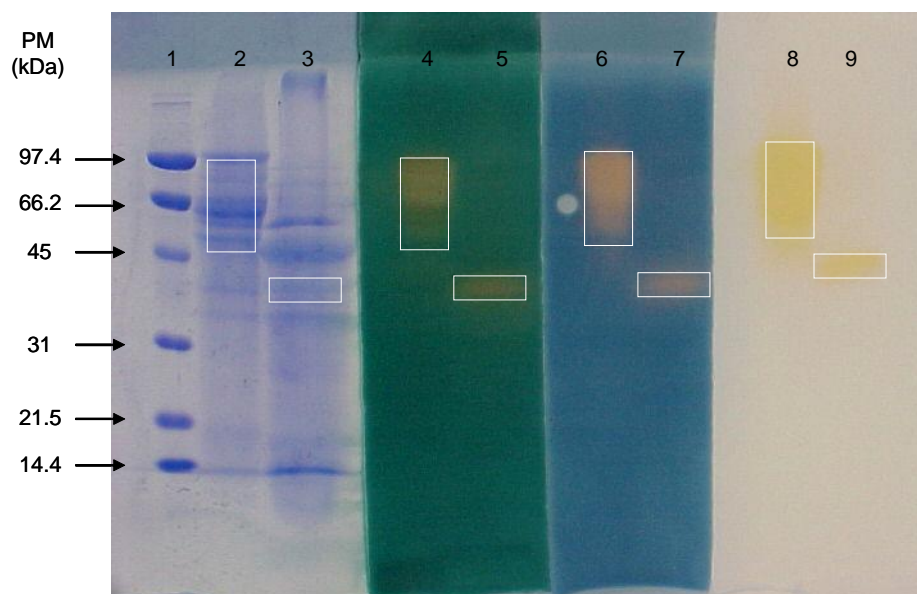


Fig. 11. Análisis mediante gel de poliacrilamida al 12% de la actividad decolorante. A la izquierda los pesos moleculares correspondientes a los estándares de peso molecular en kDa. Los carriles corresponden a: 1 estándares de bajo peso molecular Biorad®, 2 y 3 proteínas de LE95 y CS63 desnaturalizadas y reveladas con Coomassie, 4 y 5 actividad lacasa de LE95 y CS63 revelada por su acción decolorante sobre AG27, 6 y 7 las mismas actividades sobre RBBR, 8 y 9 reveladas por la oxidación de DMOP. Ensayo realizado por duplicado.

Esto último se observó también en el resultado de la electroforesis correspondiente a la Figura 12. En ella aparecen a la izquierda del gel los pesos moleculares correspondientes a los marcadores de peso molecular preteñidos Kaleidoscope® cargados en el carril 1 y las bandas proteicas y de actividad lacasa de LE95 (48-105 kDa) en los carriles 2 y 4, y de CS63 (45 kDa) en los carriles 3 y 5 respectivamente. Las actividades de las lacasas fueron reveladas con DMOP.

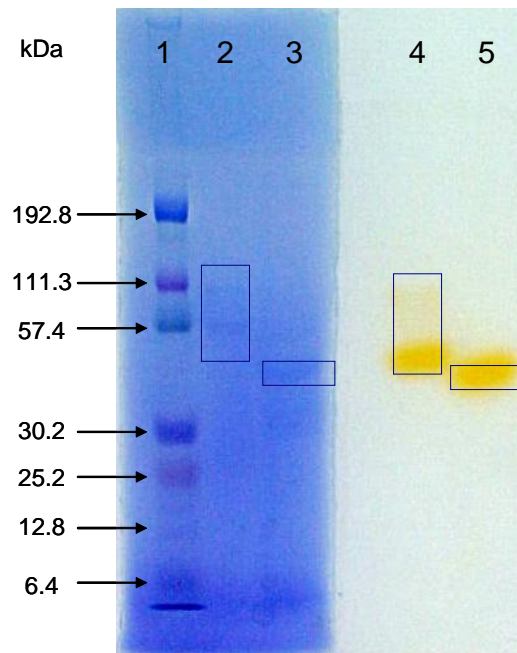


Fig. 12. Actividad lacasa revelada en ausencia de cofactores mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%. Las muestras en los carriles corresponden a: 1 estándares de peso molecular Kaleidoscope®, 2 y 3 extractos de LE95 y CS63 desnaturalizados, 4 y 5 extractos de los mismos cultivos no tratados con calor y revelados con DMOP. Nótese el bandeado debido a la presencia de isoformas en LE95. Ensayo realizado por duplicado.

En otro ensayo realizado para demostrar que la única actividad enzimática presente era la lacasa y que esta actividad era la responsable de la decoloración, se reveló la actividad y al mismo tiempo se demostró el efecto decolorante mediante zimogramas, utilizando los colorantes Azul , RBBR y AG27 y los sustratos SYR, DMOP, ABTS y DMAB-MBTH. La figura 13 muestra la presencia de bandas decoloradas y reactivas en posiciones similares después de efectuada la electroforesis. Ya que esta actividad oxidante ocurrió después de retirar toda presencia de cofactores, la decoloración de los colorantes y el desarrollo de color con los sustratos solo pudo deberse a la actividad lacasa. Estos resultados también demuestran que las lacasas de ambas cepas tienen la capacidad de ocasionar el acople oxidativo del par DMAB-MBTH, por lo que podrían tratarse de isoformas de lacasa con alto potencial redox.

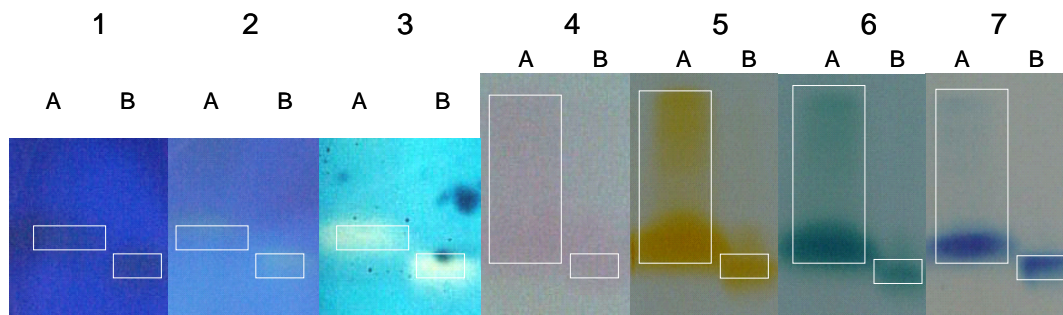


Fig. 13. PAGE nativos de lacasas de LE95 (A) y CS63 (B). Geles 1-3 efecto decolorante sobre Reactive Blue 19, RBBR y AG27. Geles 4-7 actividades reveladas con SYR, DMOP, ABTS y DMAB-MBTH respectivamente. Ensayo realizado por duplicado.

Esto confirmó nuestros resultados anteriores que apuntaban a la lacasa como única actividad enzimática presente y responsable de la decoloración.

7.4.4 Determinación de los valores de pH y temperaturas óptimos para la actividad y la estabilidad enzimática

Con el objeto de conocer las características funcionales de la actividad lacasa se desarrollaron ensayos para determinar su temperatura y pH óptimos, así como su estabilidad a diferentes concentraciones de iones hidrógeno y temperaturas. Las Figuras 14 A y B son resultados de ensayos de actividad tipo lacasa realizados a diferentes valores de pH en amortiguador de acetato de sodio. En ellas se observa la variación de los valores de la actividad tipo lacasa para extractos crudos de cultivos de CS63 y LE95 en el medio lignocelulósico y el limitado en nutrientes. Los resultados muestran que los valores óptimos de pH en los que se registraron máximos de actividad tipo lacasa fueron de 4.0 para CS63 y de 3.5 para LE95.

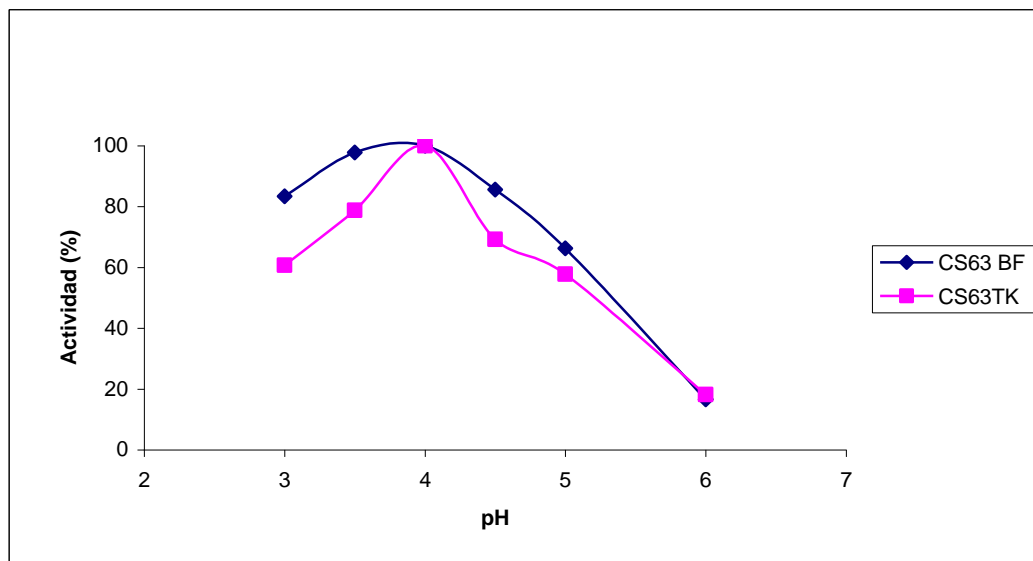


Fig. 14A. Curvas de actividad enzimática tipo Lac de CS63 en función del pH regulado con amortiguador de acetato de sodio 200 mM, registradas por extractos crudos obtenidos de cultivos en medios BF y TK. Ensayos por triplicado con valores de desviación estándar inferiores a 5%.

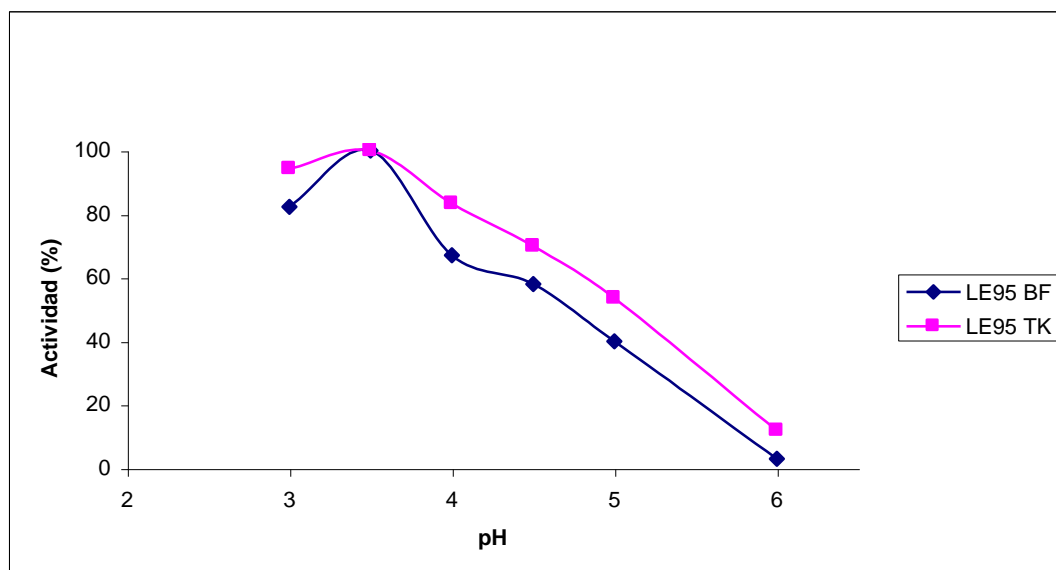


Fig. 14B. Curvas de actividad enzimática tipo Lac de LE95 en función del pH regulado con amortiguador de acetato de sodio 200 mM, registradas por extractos crudos obtenidos de cultivos en medios BF y TK. Ensayos por triplicado con valores de de desviación estándar inferiores a 5%.

En la Fig. 15 se observa que los resultados anteriores fueron similares a los obtenidos con los de extractos crudos de cultivos en Bran Flakes, al utilizar amortiguador de citrato y fosfato de sodio en lugar de acetato de sodio.

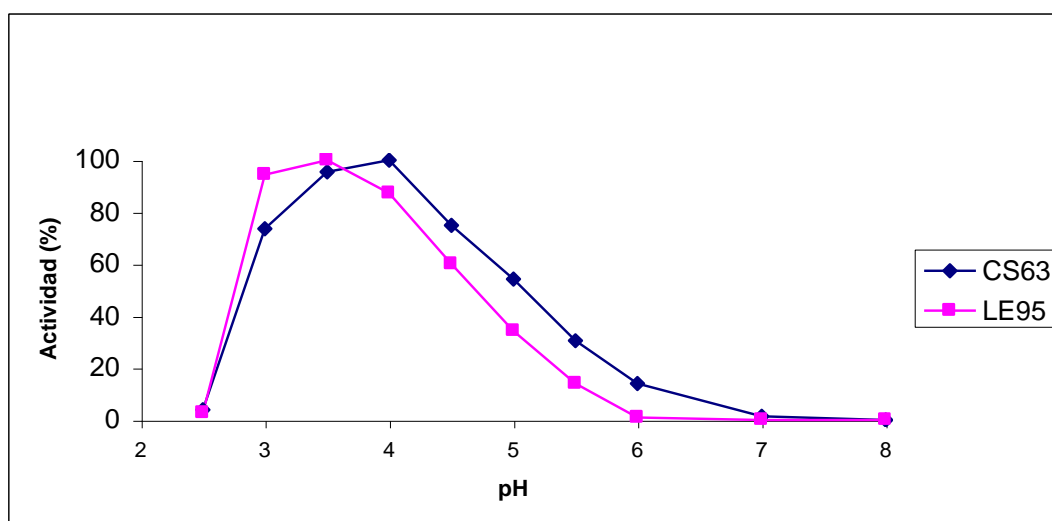


Fig. 15. Curvas de actividad enzimática tipo Lac de CS63 y LE95 en función del pH regulado con amortiguador citrato-fosfato (50:100), registradas por extractos crudos obtenidos de cultivos en medio BF. Ensayos por triplicado con valores de desviación estándar inferiores a 5%.

Los valores de pH determinados como óptimos para las actividades enzimáticas de los aislados se mantuvieron constantes en los ensayos en los que se determinaron las temperaturas óptimas de actividad de los aislados. Para ello se utilizó 0.1 ml de DMOP en una mezcla de reacción de 3 ml utilizando amortiguador de acetato de sodio y 10 μ l del concentrado de cultivo. Los resultados en medio BF se muestran en la figura 16A, donde se observa una actividad por arriba del 90% en el rango de temperaturas comprendido entre los 50 y 70°C para CS63, mientras la actividad arriba del 90% se registró entre los 70 y 80°C para LE95. En medio TK, la actividad arriba de 90% se registró entre los 60 y 80°C para CS63 y entre los 50 y 80°C para LE95 (Fig. 16B).

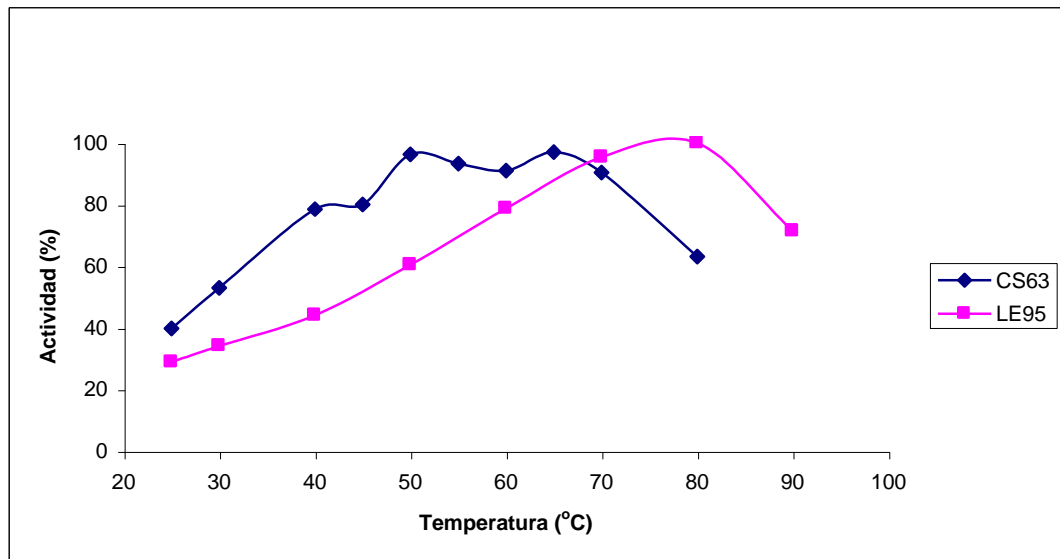


Fig. 16A. Curvas de actividad enzimática tipo Lac de CS63 y LE95 en función de la temperatura registradas por extractos crudos obtenidos de cultivos en medio BF. Ensayos por triplicado con valores de desviación estándar menores a 5%.

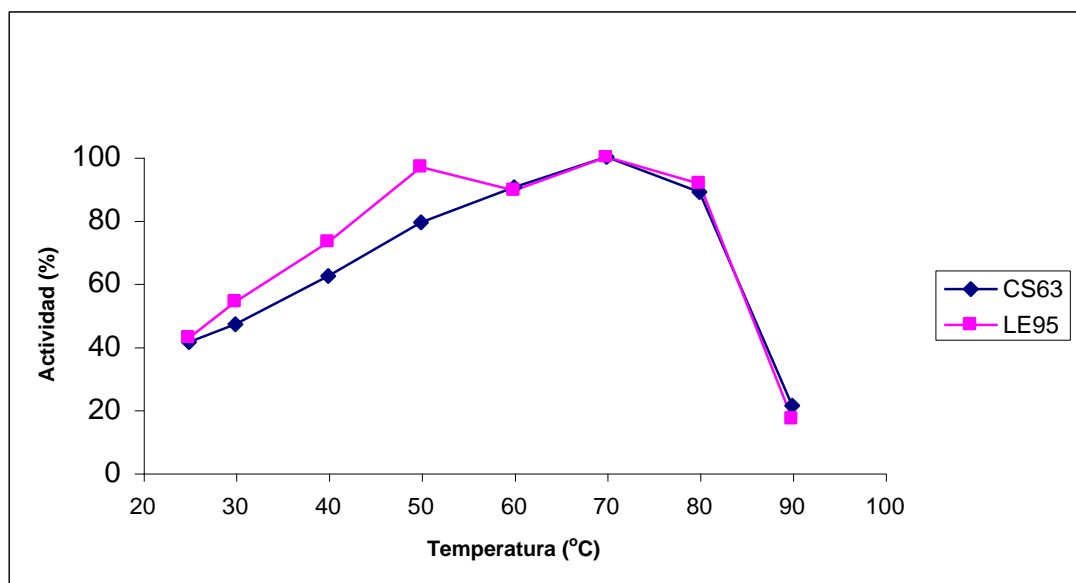


Fig. 16B. Curvas de actividad enzimática tipo Lac de CS63 y LE95 en función de la temperatura registradas por extractos crudos obtenidos de cultivos en medio TK. Ensayos por triplicado con desviaciones estándar menores a 5%.

La estabilidad térmica fue determinada para extractos crudos de cultivos en medio Bran Flakes para ambos aislados, utilizando DMOP como sustrato y amortiguador de acetato de sodio a los valores óptimos de pH determinados para cada aislado. El concentrado de cultivo de CS63 (Fig. 17A).

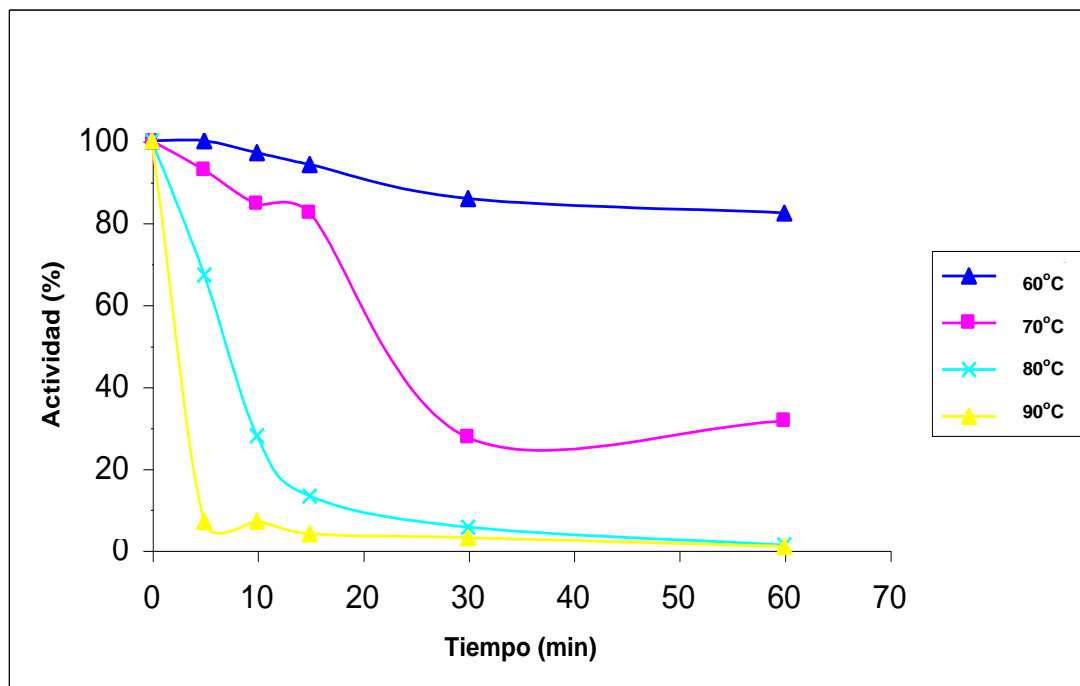


Fig. 17A. Curvas de estabilidad de la actividad enzimática tipo Lac en función de la temperatura de CS63 registradas por extractos crudos obtenidos de cultivos en medio BF. Ensayos por triplicado, valores con desviaciones estándar menores a 5%.

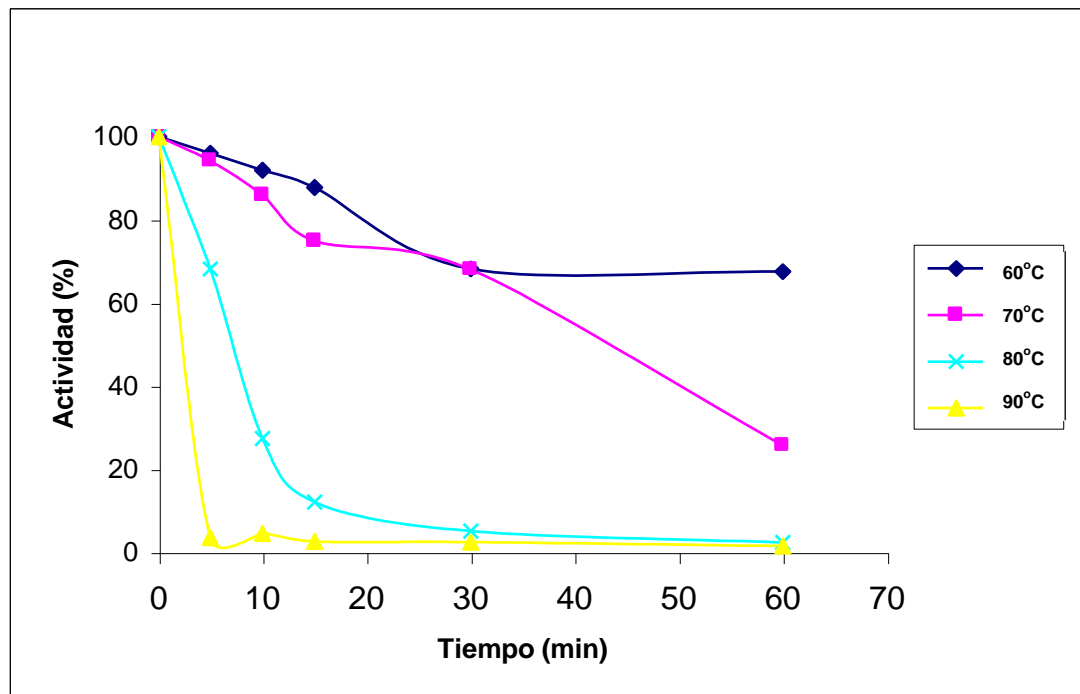


Fig. 17B. Curvas de estabilidad de la actividad enzimática tipo Lac en función de la temperatura de LE95 registradas por extractos crudos obtenidos de cultivos en medio BF. Ensayos por triplicado, valores con desviaciones estándar menores a 5%.

retuvo más del 80% de su actividad después de incubarlo por 1 h a 60°C, mientras que a los 70°C esta actividad duró sólo 15 min, después de 10 min de incubación a 80°C se perdió alrededor del 70% de actividad y a los 5 min de incubación a 90°C prácticamente se perdió la totalidad. El aislado LE95 (Fig. 17B) perdió un 30% de su actividad enzimática después de una hora a 60°C y de 30 min a 60°C. Más del 70% de la actividad se perdió al incubarlo a 80°C por 10 min y la actividad fue nula a los 5 minutos de incubación a 90°C.

Las figuras 18 y 19 muestran los resultados de la estabilidad de la actividad enzimática de los extractos crudos de cultivos crecidos en medio BF después de incubarlos a diferentes valores de pH. Para apreciar mejor la separación de los puntos solo se presentan los resultados para la primera hora, pero en este periodo es claro que la estabilidad de la actividad enzimática se incrementó para ambos aislados al aproximarse el pH a la neutralidad y que la actividad de LE95 fue más estable al variar el pH que la de CS63. Esta tendencia se conservó durante las 3 h de incubación del ensayo (resultados no mostrados).

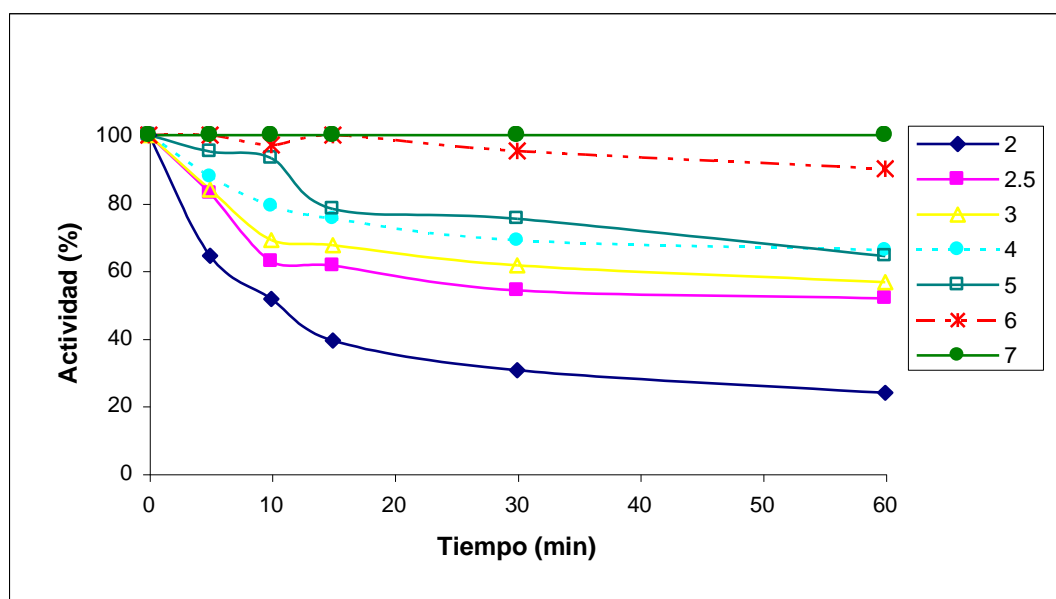


Fig. 18A. Curvas de estabilidad de extractos crudos de cultivos de CS63 en BF a diferentes valores de pH. Ensayos por triplicado, valores con desviaciones estándar menores a 5%.

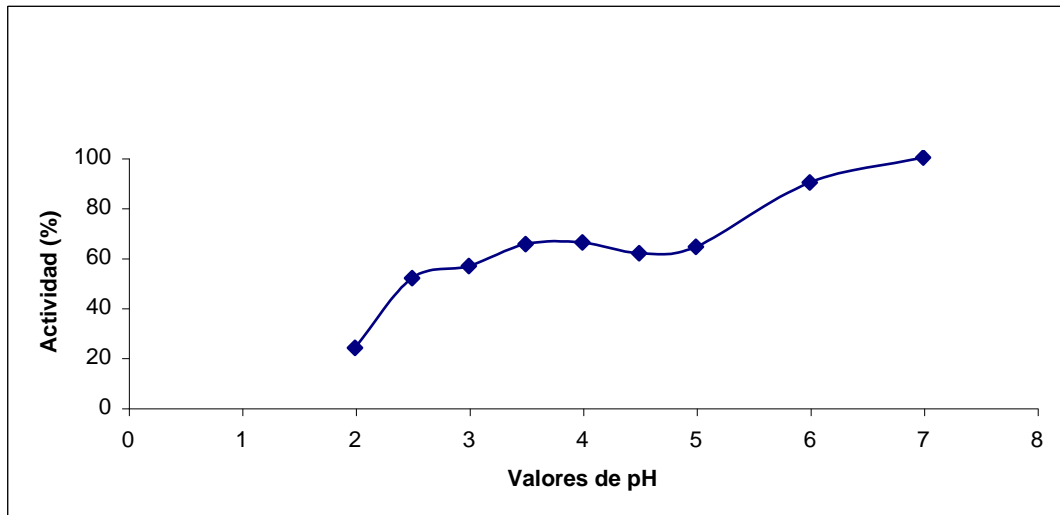


Fig. 18B. Comportamiento de la actividad Lac de extractos crudos de cultivos de CS63 en BF a diferentes valores de pH a los 60 min de incubación. Los ensayos por triplicado tuvieron valores menores al 5% en la desviación estándar.

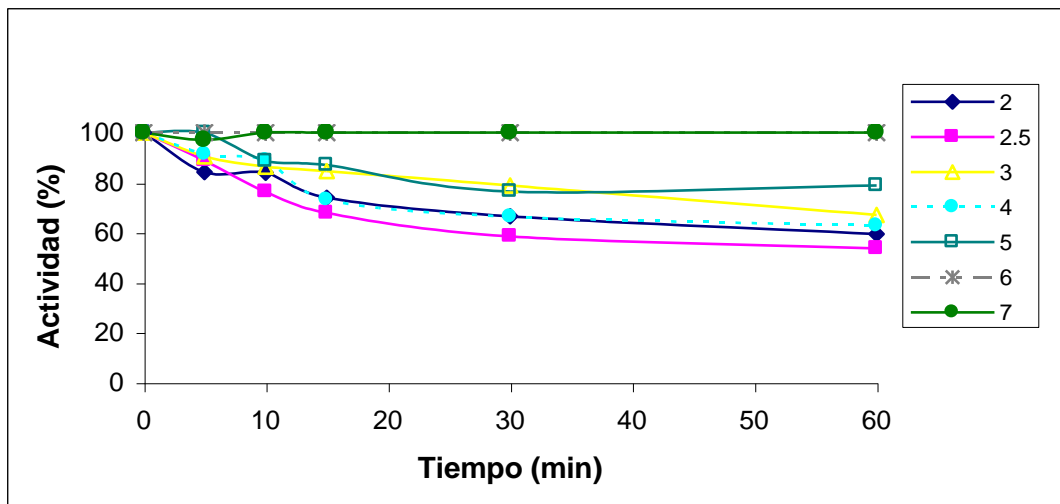


Fig. 19A. Curvas de estabilidad de extractos crudos de cultivos de LE95 en BF a diferentes valores de pH. Ensayos por triplicado, valores con desviaciones estándar menores a 5%.

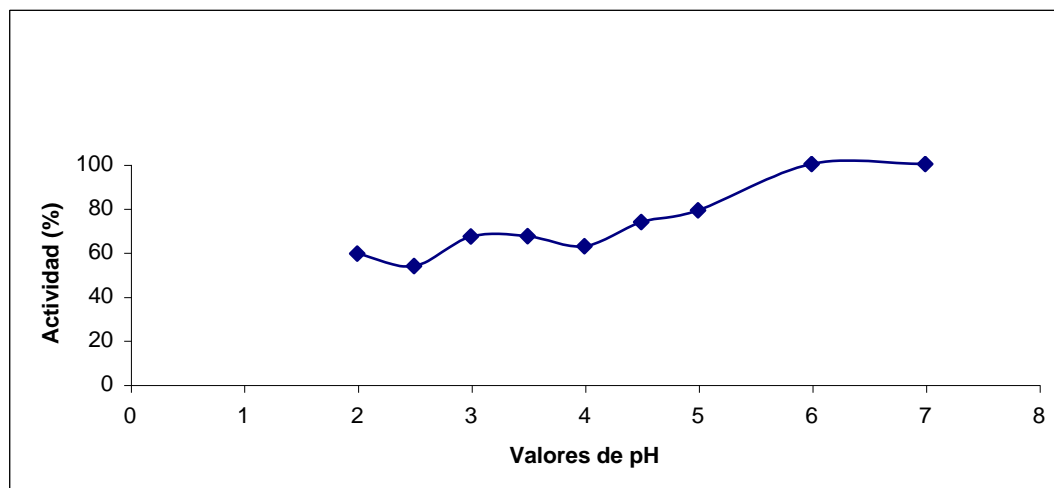


Fig. 19B. Comportamiento de la actividad Lac para extractos crudos de cultivos de LE95 en BF a los 60 min de incubación a diferentes valores de pH. Ensayo por triplicado, valores con desviaciones estándar menores a 5%.

7.4.5 Efecto de inhibidores sobre la actividad enzimática

Las Figuras 20 a 22 muestran los resultados del comportamiento de la actividad enzimática tipo lacasa en presencia de tres conocidos inhibidores enzimáticos. El EDTA y el ácido tioglicólico tienen un efecto quelante que influye en estas oxidasas metálicas por su efecto sobre los iones cobre presentes en el sitio activo de las lacasas. El ácido tioglicólico y la azida de sodio son referidos como agentes secuestrantes de especies activas de oxígeno. Además, la azida de sodio detiene el paso de electrones del sitio T1 al T2 inhibiendo la actividad enzimática.

La azida de sodio demostró un efecto inhibitorio completo a concentraciones de 0.1 mM, seguida por el ácido tioglicólico a concentraciones de 10 mM, mientras el EDTA redujo la actividad enzimática en un 75% o más en ambos aislados, pero no logró inhibirla completamente.

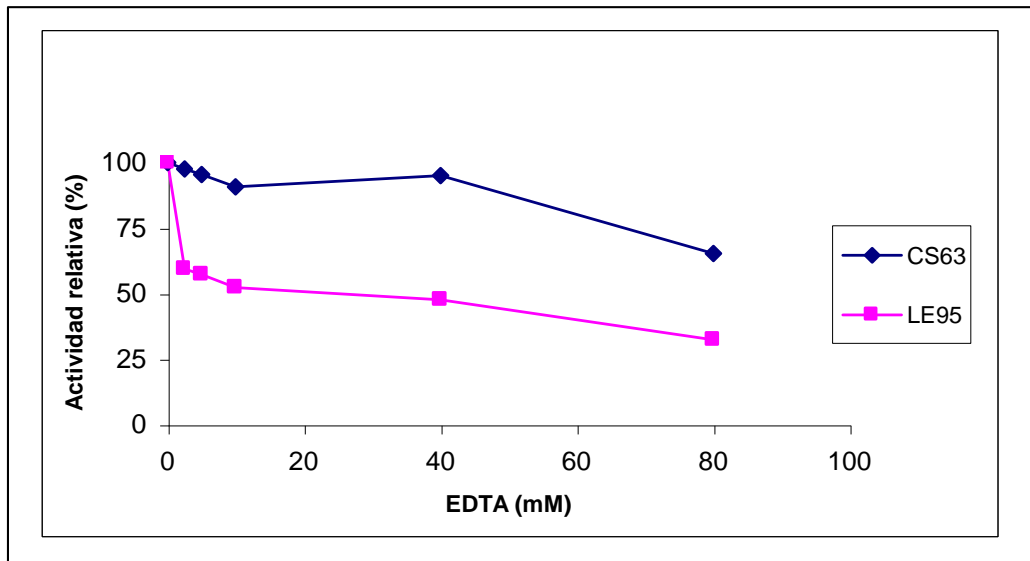


Fig. 20. Efecto de diferentes concentraciones de EDTA sobre la actividad enzimática tipo Lac en extractos crudos de cultivos en medio BF. Ensayo por triplicado cuyos valores tuvieron desviaciones estándar menores a 5%.

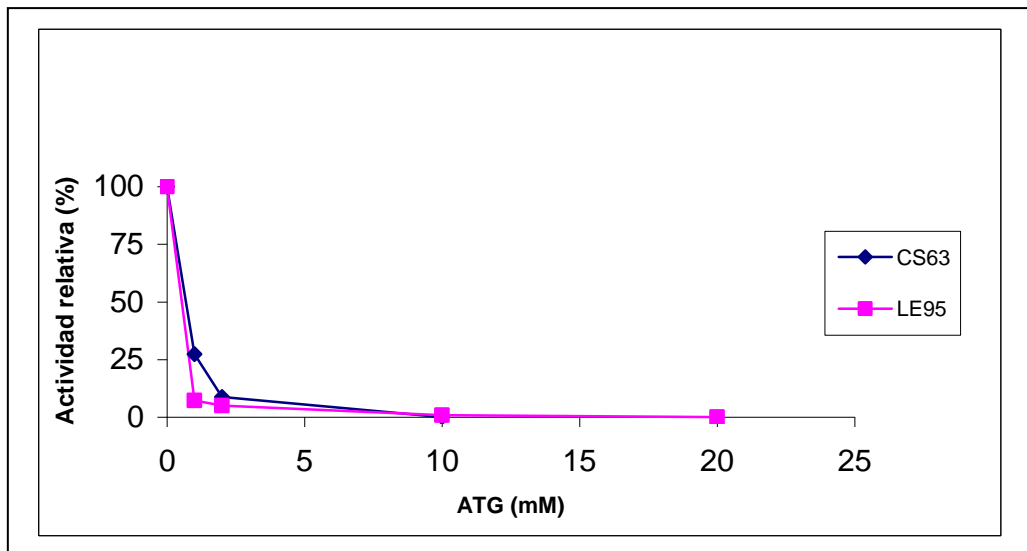


Fig. 21 Efecto de diferentes concentraciones de Ácido tioglicólico sobre la actividad enzimática tipo Lac en extractos crudos de cultivos en medio BF. Ensayos por triplicado, valores con desviaciones estándar menores a 5%.

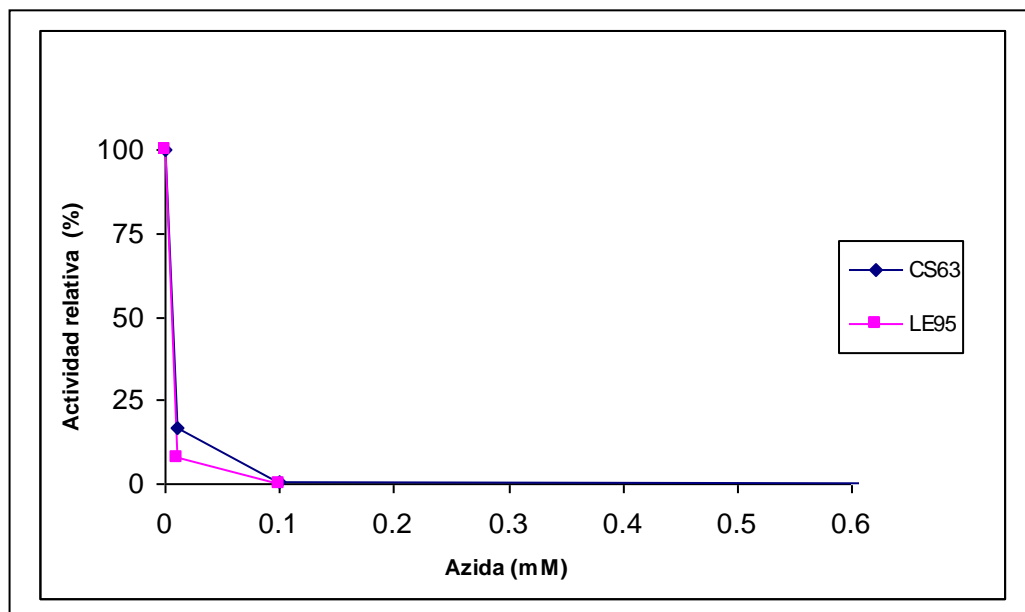


Fig. 22 Efecto de diferentes concentraciones de Azida de Sodio sobre la actividad enzimática tipo Lac en extractos crudos de cultivos en medio BF. Ensayos por triplicado, valores con desviaciones estándar menores a 5%.

7.4.6 Mediadores

En la Tabla XIII se muestran los porcentajes de actividad de extractos de cultivo de C63 y sus fracciones de alto (superior a 10 kDa) y bajo (inferior a 10 kDa) peso molecular medidos con el sustrato DMOP en amortiguador de acetato de sodio 200 mM a pH 4. Al comparar la actividad del extracto nativo (619.18) con aquella de un volumen igual de la fracción retenida y del filtrado, se observó un factor de aumento en 9.5 veces en la primera (5,853.76), mientras el filtrado solamente presentó un 0.15% de la actividad del extracto (0.93). Al reconstruir el extracto con una parte proporcional de cada una, la actividad registrada fue muy similar a la original (600.60). Al reconstituir las fracciones diluyendo en 9.5 veces el retenido en agua destilada y utilizando un volumen 9.5 veces mayor del filtrado, la actividad se restituyó a un valor similar al del extracto original en el primero (595.12), mientras la actividad en el mayor volumen del retenido, apenas llegó al 1.4% del original, lo cual indicó que no había mediadores presentes en la fracción de bajo peso molecular.

Tabla XIII. Porcentajes de actividad Lac del concentrado de cultivo de CS63 y sus fracciones de pesos moleculares superior e inferior a 10 kDa. Experimento realizado por triplicado con desviaciones estándar inferiores a cinco por ciento. La actividad lacasa original (extracto nativo) así como la registrada después de concentrar en la membrana por el sistema Amikon por el retenido y el filtrado (nativos) y la obtenida después de calcular los volúmenes proporcionales correspondientes a 100 microlitros del extracto original se reportan en Unidades por litro.

Fracción de Cultivo	Actividad UI ⁻¹		Porcentajes de actividad
	Nativo	Reconstituido	
Extracto	619.18	600.60	97.0
Retenido	5853.76	595.12	96.1
Filtrado	0.93	8.84	1.4

Al utilizar 100 µl del concentrado nativo (Fig. 23C), un volumen del retenido disuelto en agua destilada y con actividad Lac final igual al extracto nativo (Fig. 23B) y 950 µl del filtrado (Fig. 23A) para decolorar AG27, que es uno de los colorantes del grupo 1 (de fácil decoloración), los resultados de los espectros indicaron un comportamiento similar entre el retenido reconstituido y el extracto nativo (Fig. 23B y 23C), mientras el espectro de decoloración del AG27 con el filtrado mostró un efecto decolorante menor (Fig. 23A). Al observar estos resultados en porcentajes de decoloración (Fig. 24) resulta evidente que la mayor proporción de principios decolorantes quedó concentrada en la fracción de elevado peso molecular y que los valores del extracto y el retenido reconstituido son similares y están en función a la actividad Lac, lo cual confirma la ausencia de mediadores decolorantes en la fracción de bajo peso molecular (filtrado) y que esta actividad en el filtrado posiblemente se deba al paso de Lac a través del filtro. El testigo (agua con el colorante) registró una caída en absorbancia a las 24 horas debido a que el pigmento se quedó visiblemente adherido en las paredes del tubo de ensayo, lo que provocó una lectura menor en la celda.

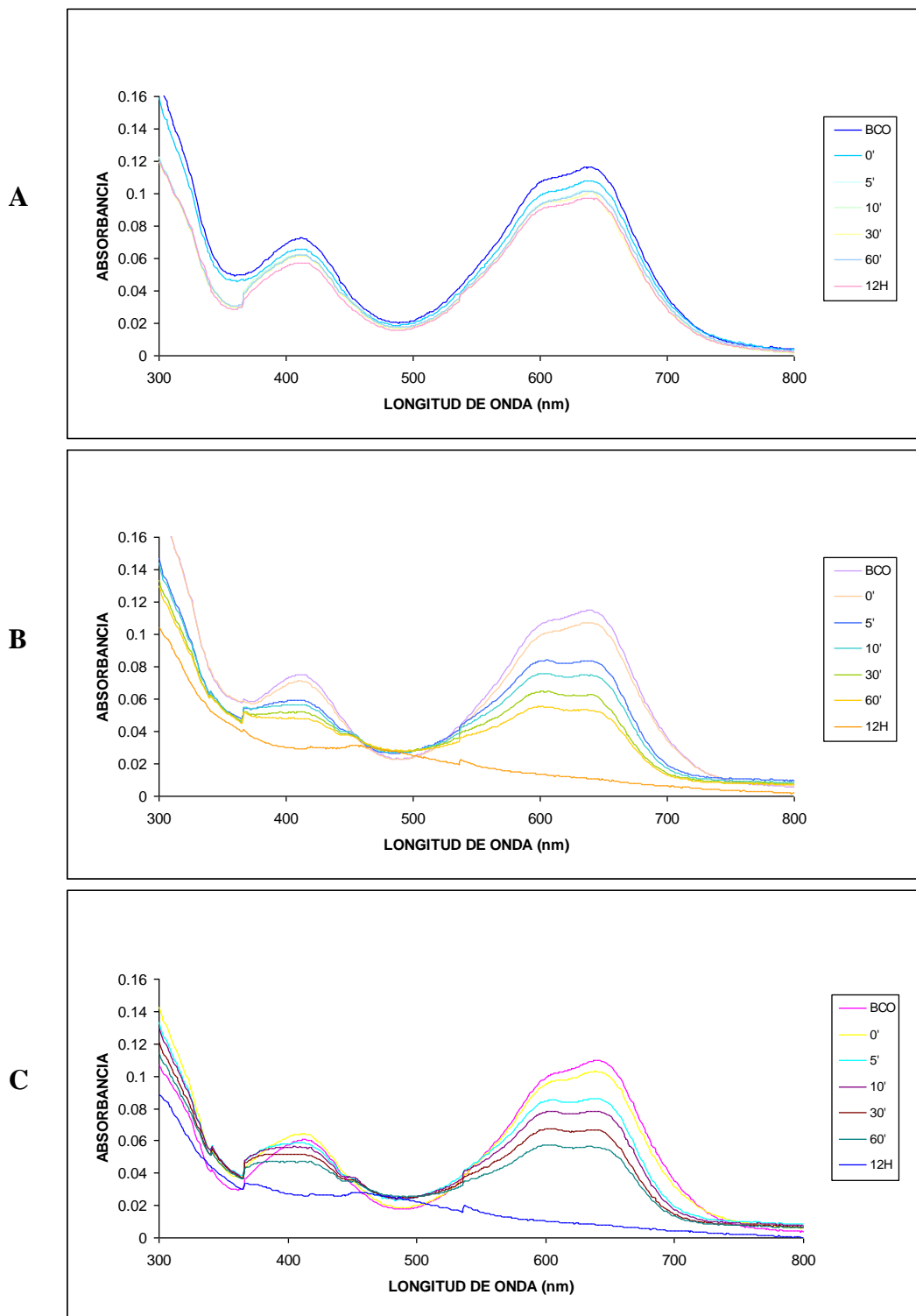


Fig. 23. Espectros de decoloración de AG27 obtenidos con C) extractos crudos de cultivos de CS63 y sus fracciones B) superior y A) inferior a 10 kDa.

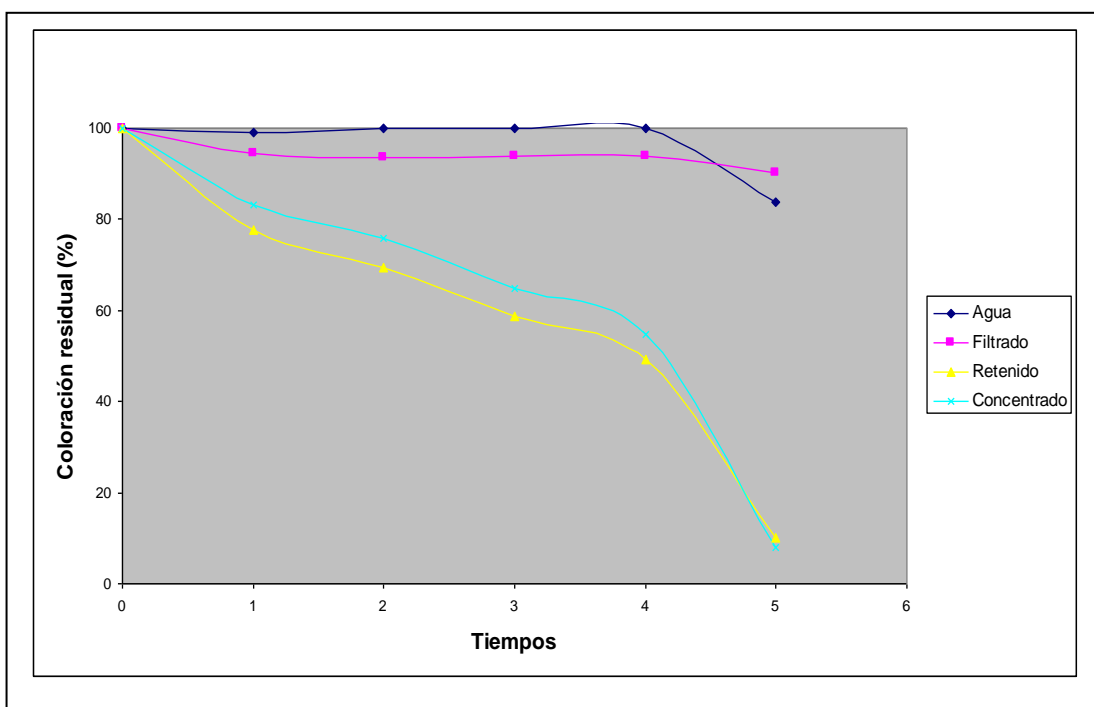


Fig. 24. Porcentajes de color residual de AG27 obtenidos en mezclas de reacción con extractos crudos de cultivo de CS63 y sus fracciones superior e inferior a 10 kDa. Los tiempos 0 a 5 corresponden a 0, 5, 10, 20 y 30 min y 12 h. La mezcla de reacción corresponde a un volumen de 3 ml con 0.1 ml del concentrado de cultivo o el volumen proporcional en actividad del retenido o con 950 µl del filtrado y 200 ppm del colorante.

8. DISCUSIÓN

8.1 Aislamiento y selección de los aislados nativos con mejor capacidad decolorante

8.1.1 Método de aislamiento

Aún con la acidificación del medio con ácido tartárico para evitar la contaminación por bacterias y el empleo de Benomyl contra hongos ascomicetes (excepto pleosporales) y mitospóricos (Carlile *et al.*, 2001), es frecuente que aparezcan colonias de bacterias, levaduras, *Penicillium* y *Trichoderma* durante los aislamientos. Por lo tanto se recomienda lavar la superficie exterior del carpóforo con algún detergente, antes de seccionarlo. Para obtener el fragmento de carpóforo para aislarlo Lodge *et al.* (2004), recomiendan la cercana al pileo, pero la zona basal, comúnmente de crecimiento más activo resultó mejor en muchos casos. Estos autores sugieren intentar el aislamiento a partir de puntas de hifas, lo cual puede hacerse a las 24 h de crecimiento en agar, observando bajo el microscopio (método personal del Dr. Raúl Rodríguez del INIFAP, adoptado exitosamente) y transfiriéndolas a cajas con medio PDA o YMGA. Es recomendable el evitar contaminantes añadiendo ácido láctico. Se sugiere la obtención de cultivos puros de micelios crecidos a partir de las puntas de hifas, ya que garantizan el monocultivo y la uniformidad genética necesarias para la identificación por técnicas moleculares.

8.1.2 Sistema de selección en placa utilizado

La evolución de los sistemas de selección en placa, para de una forma confiable encontrar rápidamente, económicamente y con un mínimo de riesgos a la salud, hongos capaces de degradar compuestos tóxicos y recalcitrantes, se basa en el empleo de sustratos que revelen la presencia de agentes químicos fúngicos mediante un simple cambio de color, al usar sustratos de estructura química similar al compuesto tóxico, pero más inocuo que este, cuya degradación pueda ser registrada por observación directa o fácilmente por algún método químico analítico. Se considera que el sistema de selección en placa para detectar actividad ligninolítica y decolorante seguido en este estudio es robusto, pues: incorpora a) los sustratos cromogénicos guayacol y *o*-anisidina para la detección de peroxidasas y oxidasas (Tekere *et al.*, 2001), los cuales son menos irritantes que los tradicionalmente usados ácidos tánico y gálico (Kiiskinen *et al.*, 2004), b) los colorantes poliméricos RBBR y Poly R478 que han demostrado ser más confiables en estudios de identificación del tipo de pudrición causada por hongos de la madera (Cookson, 1995) así como c) colorantes de los tres grupos químicos más importantes en la industria (azo, triarilmetano y antraquinónico), además de que d) se emplea principalmente en hongos lignícolas y no en ectomicorrícicos que comúnmente no dan reacción con guayacol (Thorn *et al.*, 1996), e) los resultados son evidentes a simple vista y f) evita el manejo de sustancias contaminantes más irritantes y potencialmente carcinogénicas. Por el bajo riesgo en su empleo y el éxito para aislar y detectar cepas decolorantes eficientes, se recomienda éste sobre otros sistemas.

8.1.3 Selección de aislados con mejor capacidad decolorante

La selección en placa de los hongos con mejor actividad ligninolítica y capacidad decolorante consistió en tres etapas. Un total de diez aislados nativos fueron escogidos en la preselección basada en los resultados de las pruebas contra tres cepas de referencia de los aislados de la colección en el sistema de tres sustratos y tres colorantes o con nuevos aislados en la decoloración del sustrato polimérico PR

y el colorante CV. Seis aislados fueron seleccionados en la segunda etapa basada en la decoloración de RBBR, AR y CV en dos medios, uno limitado en nutrientes y otro lignocelulósico. Los seis mostraron una capacidad decolorante igual o superior a aquella de las cepas de referencia en igualdad de condiciones de cultivo. La última selección basada en la decoloración de siete colorantes, permitió escoger los aislados CS63, CU1, CS5 y LE 95 en base a producción de pigmento en placa, velocidad de crecimiento, inhibición del crecimiento por CV y capacidad decolorante, ya que en ninguna de ellas se inhibe su crecimiento en los colorantes ensayados o se presenta pigmentación natural en su micelio. Entre estas cuatro que mostraron una decoloración más eficiente frente a una mayor diversidad de colorantes, se seleccionaron solamente CS63 y LE95 para la caracterización de los principios responsables de su habilidad decolorante. Existen reportes previos de cepas nativas con mejor actividad decolorante que las cepas de referencia en países como África (Tekere *et al.*, 2001); Argentina (Saparrat *et al.*, 2002; Levin *et al.*, 2004); Brasil (Okino *et al.*, 2000) y las cepas seleccionadas igualan los resultados en placa de estos reportes.

8.2. Identificación taxonómica

La identidad taxonómica de los cuatro hongos seleccionados como mejores decolorantes determinada inicialmente en base a sus características morfológicas y confirmada por técnicas moleculares resultó ser *Trametes (Funalia) trogii* CS63, *Trametes pubescens* LE95, *Trametes hirsuta* CS5, *Trametes (Cerrena) maxima* CU1. Ryvarden (1991), reconoce a *Trametes* como un género válido (existe un ejemplar de herbario cuya diagnosis en latín fue publicada después de la fecha de partida para la nomenclatura de Hongos [1-05-1753] y difundida a la comunidad científica) y legítimo (se nombró con estricto apego a las reglas nomenclaturales del Código Internacional de Nomenclatura Botánica) dentro de la familia Polyporaceae y a *Funalia* y *Coriolus* como sinónimos de *Trametes*. Este género se relaciona morfológicamente con los géneros causantes de la pudrición blanca *Pycnoporus*, *Hexagonia* y *Coriolopsis*, pero se les distingue por el color rojo del primero y el pardo en los otros dos, también morfológicamente se le relaciona con *Lenzites* pero

se le separa por el himenóforo lamelado de este otro género. Según Prewitt *et al.* (2008), su análisis de la secuencia de nucleótidos de la región espaciadora interna transcrita (ITS) del RNAr permite afirmar que *Trametes* y *Phanerochaete* son taxa hermanos y ambos lo son del género *Gloeophyllum*. *Trametes* y *Phanerochaete* causan podredumbre blanca mientras *Gloeophyllum* provoca una podredumbre parda en la madera, aunque en *G. trabeum* se ha encontrado una secuencia de DNA similar a la de lacasas de los hongos de la podredumbre blanca y el hongo posee la capacidad de oxidar el ABTS (D'Souza *et al.*, 1996). Los resultados de la identificación taxonómica de las especies de *Trametes* de este trabajo están apoyados por análisis moleculares realizados por peritos en el área, aún así, la morfología de los carpóforos se traslapa con descripciones anatómicas de otras especies y la comparación de las secuencias nucleotídicas tiene hasta un 5% de margen de error, esto indica que la morfología de los carpóforos de las especies de este género son tan variables que es difícil distinguirlas y más aún, que la separación de las especies de regiones tropicales por medio de ITSs aún requiere más información en las bases de datos, pero es más confiable que la obtenida por análisis de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLPs), la cual según Prewitt *et al.* (2008), no es confiable para la separación de especies, también debido a que son insuficientes para esta tarea los registros en las bases de datos (NCBI Genbank) y a que se necesita la incorporación de más cebadores específicos para basidiomicetos. La conclusión es que para evitar confusiones entre las especies del género distribuidas en México, se requiere un estudio que genere una base de datos que deberá incluir las características morfológicas y las secuencias ITS para cada una.

8.3 Producción enzimática

Las diferencias en el tipo de actividad enzimática entre CS63 y LE95 y en las cantidades bajo diferentes condiciones de cultivo coinciden con resultados similares encontrados para otras especies con sistemas modificadores de lignina. Los sistemas enzimáticos exhiben características diferenciales dependiendo de la especie, cepa y condiciones de cultivo (Rogalski *et al.*, 1991). *Phanerochaete chrysosporium* tiene mejor crecimiento y mejor producción en condiciones alternadas de reposo y agitación o de reposo con adiciones esporádicas de oxígeno al medio, mientras otros hongos lo hacen de forma óptima en condiciones de agitación constante. La

producción enzimática encontrada para ambos aislados es inferior a la reportada para las mismas especies en la literatura. En el caso de *T. trogii*, existen reportes de un aislado tunecino que alcanza 110 Uml^{-1} de producción al añadirse como inductores al medio Soytone®, etanol (3% V/V) y Cu^{++} ($350 \mu\text{M}$) (Dhouib *et al.*, 2005), mientras para *T. pubescens* los reportes indican una mayor producción (740 Uml^{-1}) en un cultivo de lote alimentado a base de peptona, glucosa y sulfato de magnesio, usando cobre como inductor (Galhaup *et al.*, 2002). El comportamiento de CS63 concuerda con los resultados de Pickard *et al.* (1999) y otros autores después de ellos, quienes afirman que el mejor medio para la producción de enzimas ligninolíticas es el medio BF. Ya que existen reportes que indican que ambas especies poseen la capacidad de una mayor producción enzimática, se sugiere continuar las investigaciones intentando maximizar la producción enzimática, optimizando el medio y las condiciones de cultivo. Ensayar el medio Soytone usado por Dhouib *et al.* (2005) o el BF para CS63, y el medio de Galhaup *et al.* (2002), para LE95, agregando inductores enzimáticos como el etanol y el sulfato de cobre para ambos aislados. Este último se ha postulado que posiblemente induce la expresión de genes de metalotioneinas (implicadas en almacenamiento de metales y procesos de desintoxicación y cuya regulación opera vía una metaloproteína regulatoria que funciona tanto como receptora del metal como factor de transcripción). Tal vez xilidina para CS63 (que activa elementos de respuesta a xenobióticos o elementos de respuesta antioxidante que se conoce median la activación de la transcripción por sustancias aromáticas en eucariotas) (Galhaup *et al.*, 2002). Otra línea de investigación futura podría contemplar el cultivar *T. pubescens* modificando la fuente de carbono, el tipo de inductor, el material de soporte y el suministro de nitrógeno, intentando obtener mezclas con diferentes proporciones de las enzimas Lac y MnP con el fin de decolorar colorantes recalcitrantes al ataque de las enzimas individuales, como se ha reportado para *Ceriporiopsis subvermispora* (Babic y Pavko, 2007).

Mediante los ensayos enzimáticos realizados con los extractos crudos o con muestras de los cultivos sumergidos, pudimos detectar solamente la presencia de actividad lacasa en CS63 y en el caso de LE95 se detectó principalmente esta actividad, pero también algo de actividad MnP a medida que envejecía el cultivo. Los ensayos demostraron que la actividad enzimática podía ser detectada hasta después de finalizada la fase de crecimiento micelial y se incrementaba con el envejecimiento del cultivo, es decir, coincide con el establecimiento de la idiofase y

al parecer es resultado del metabolismo secundario del hongo. Así, los tiempos de producción concuerdan con reportes previos en los que la primera enzima en ser detectada es la Lacasa y posteriormente la MnP y afirman que las enzimas que participan en el sistema modificador de la lignina son producidas hasta que el hongo se ha establecido en el cultivo (Chen *et al.*, 2003; Saparrat *et al.*, 2007).

Nerud y Mizurkova afirmaron en 1966 que rara vez las tres enzimas modificadoras de lignina son producidas simultáneamente en cultivos sumergidos y coinciden con otros autores (Tekere *et al.*, 2001) en señalar a la combinación MnP-Lac como la más frecuente en los HPB, las cuales por separado o en conjunto pueden degradar la lignina.

Sin embargo, también existen hongos que producen lacasa como única enzima ligninolítica, como el caso de *Pycnoporus sanguineus* (Eggert *et al.*, 1996). Considerando lo anterior, el haber detectado solamente actividad lacasa en CS63 no es de extrañar, sobre todo porque al parecer es una Lac de elevado potencial redox y por ende muy probablemente capaz por si sola de atacar la lignina. Aunque su presencia única difiere con los reportes que indican que esta especie también produce pequeñas cantidades de MnP (Levin *et al.*, 2005) y aún de LiP (Levin y Forchiassin, 2001), la primera enzima solamente ha sido detectada en cultivos ricos en nitrógeno y la segunda solamente cuando se agrega aserrín al medio. Para LE95 existen reportes que concuerdan en la presencia de las dos enzimas encontradas en los cultivos de este hongo y su secuencia de producción: Lac y MnP (Galhaup *et al.*, 2002).

8.4 Caracterización de los principios decolorantes

8.4.1 Ensayos de decoloración en cultivos líquidos y con muestras de cultivos

Los ensayos de decoloración en cultivos líquidos y con muestras de cultivos permitieron demostrar que los principios químico enzimáticos participantes en el proceso decolorante eran metabolitos extracelulares que no requerían la participación del micelio. Para atribuir el efecto decolorante a la actividad enzimática detectada en

los cultivos, en una primera prueba se trataron con calor las muestras, demostrándose que el principio era termolábil al cesar la actividad decolorante en las muestras tratadas (Testigos Fig. 5). En una segunda prueba se demostró que la capacidad decolorante de los cultivos dependía de la actividad enzimática de los mismos (tipo lacasa) ya que ocurrió una decoloración más rápida como consecuencia del aumento de las unidades enzimáticas utilizadas en los ensayos de decoloración y su comportamiento al elevar la concentración de colorante (sustrato) correspondía a aquél típico de una reacción enzimática en la que la capacidad decolorante aumentaba para después disminuir, probablemente como consecuencia de la saturación de la enzima por el sustrato o posiblemente debido a un efecto inhibitorio del colorante sobre aquélla (Fig. 7). Por último se demostró que la presencia de conocidos agentes inhibidores de enzimas oxidativas provocaba un decremento o la pérdida total de la capacidad decolorante de los sobrenadantes de los cultivos, sin importar el grupo del colorante (Tabla XI).

8.4.2 Uso de sustratos enzimáticos específicos y retiro de cofactores

Si bien la actividad tipo LiP nunca fue detectada con alcohol veratrílico bajo nuestras condiciones de cultivo, al tratar de confirmar la ausencia de esta actividad utilizando el par específico de sustratos AAP-DCP y la de MnP con el par DMAB-MBTH en los cultivos tiernos de CS63 y LE95, obtuvimos reacciones positivas que hicieron sospechar la presencia de estas enzimas. Siguiendo la estrategia de Jordaan y Leukes (2003), se descartó su presencia mediante el retiro de los cofactores necesarios para que estas enzimas lleven a cabo el acoplamiento de estos pares de sustratos por mecanismos oxidativos. La estrategia consistió en remover el peróxido de la mezcla de reacción por la adición de catalasa y el Manganeso por la adición del agente quelante EDTA (Tabla XII), por lo que al obtener una reacción positiva con DMOP la actividad oxidativa solo podría atribuirse a la presencia de lacasa y ésta debía ser de elevado potencial redox, al reaccionar con sustratos exclusivos de peroxidasas (Castillo *et al.*, 1994; Ramachandra *et al.*, 1988).

8.4.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida y zimogramas

La electroforesis en gel de poliacrilamida fue utilizada para separar las proteínas de muestras de los extractos de los cultivos de CS63 y LE95 y obtener bandas que al ser reveladas con un sustrato específico (SYR) o uno inespecífico (DMOP) en ausencia de todo cofactor requerido por peroxidasas, confirmarían la actividad lacasa como la única presente. Mediante la comparación de las bandas de actividad lacasa reveladas con DMOP (Fig. 12) y con SYR, DMOP, ABTS y DMAB-MBTH (Fig. 13) en los zimogramas con aquéllas reveladas por decoloración de geles teñidos con los colorantes AG27, RBBR (Fig. 11) y Reactive Blue 19 (Fig. 13) se logró demostrar que la única actividad presente era la lacasa y que esta era la única responsable de la actividad decolorante, lo cual concuerda con reportes previos en otras especies de *Trametes*, como *T. hispida* (Rodríguez *et al.*, 1999) y *T. hirsuta* (Abadulla *et al.*, 2000).

Mediante el análisis de muestras de cultivo desnaturalizadas por SDS-PAGE, se logró tener una estimación de los pesos moleculares relativos de las bandas protéicas que presentaron actividad lacasa. La presencia de varias bandas con actividad indica la presencia de isoformas. Este resultado por si mismo, nos proporciona la justificación para realizar prospecciones en regiones desérticas, pues es en estas regiones geográficas de condiciones secas y estresantes, donde la diversidad genética debido a la reproducción sexual de las cepas silvestres, provoca altos niveles de variación en sus isoenzimas, como el caso particular de *P. eryngii* en Israel (Cohen *et al.*, 2002). Así una especie puede exhibir para una enzima una diversidad regional de formas, causada por la necesidad de adaptarse a su ambiente y otra diferente en otra región climática.

8.4.4 Parámetros funcionales de la lacasa. Óptimos de temperatura y pH. Estabilidad de la actividad a pH y temperatura. Estimación de la masa molecular. Efecto de inhibidores.

La lacasa de *Trametes (Funalia) trogii* CS63 presentó valores óptimos actividad a pH 4 y en el rango de temperatura entre 50 y 70°C mientras la de *Trametes pubescens* LE95 lo hizo a pH 3.5 y entre 50 y 80°C (dependiendo del

medio del cultivo). De acuerdo al número de bandas reveladas con Coomassie en los geles SDS-PAGE y la extensión del barrido revelado en los zimogramas de actividad, aparentemente hay una mayor cantidad de isoformas en LE95 que en CS63. Baldrian (2005), afirma que la mayoría de los hongos poseen más de una isoenzima de lacasa. Los pesos moleculares estimados en los geles SDS-PAGE con muestras desnaturalizadas para CS63 fueron entre 31 y 45 kDa y entre 45-97 kDa para LE95 los cuales corresponden a proteínas monoméricas (Claus, 2003). Las isoformas de ambas enzimas mantuvieron una estabilidad arriba del 60% a 60°C, perdieron un 70% de la misma a 70°C y prácticamente se inactivaron por arriba de esta temperatura, después de una hora. La actividad enzimática fue más estable para ambos aislados al aproximarse el pH a la neutralidad y mayor en LE95 que en CS63. Los valores de talla molecular entre 50-110 kDa), óptimos de pH (ácidos) y temperatura (50-70°C), así como los de termoestabilidad (termoestables a 60°C), concuerdan con lo reportado para otras lacasas del género *Trametes* (Yaver *et al.*, 1996; Koroljova-Skorobogat'ko *et al.*, 1998; Galhaup *et al.*, 2002; Xiao *et al.*, 2004) y hongos en general (Claus, 2003; Baldrian, 2005). Sin embargo, la mayor estabilidad a pH alrededor de la neutralidad, difiere de lo reportado comúnmente para lacasas de hongos de la podredumbre blanca, las cuales comúnmente son más estables a valores de pH ácido. Aunque esto es relativo, ya que el rango de estabilidad a pH se puede extender más allá de la neutralidad. La conclusión de las gráficas de estabilidad es que para ambos aislados al incubar los extractos crudos a potenciales de hidrógeno superiores a 4.0 conservan mejor su actividad inicial. Por lo que para conservar por más tiempo su actividad, las enzimas podrían almacenarse a potenciales de hidrógeno mayores a 4.0 y utilizarse a los pHs óptimos de actividad respectivos: 4.0 para CS63 y 3.5 para LE95.

Los valores de potenciales redox reportados en la literatura para lacasas de *T. trogii* y *T. pubescens* son elevados, lo cual apoyaría la capacidad de oxidación de sustratos considerados exclusivos de peroxidasas, sin embargo es indispensable realizar un estudio electroquímico posterior para confirmar que las lacasas de estas cepas corresponden a formas de alto potencial redox, como sugieren nuestros resultados.

La inhibición por pequeñas concentraciones de agentes quelantes del cobre, como la azida de sodio, concuerda con los resultados de ensayos reportados en la literatura y reafirma a este compuesto como un efectivo inhibidor de oxidasas

metálicas, lo mismo sucede con el ácido tioglicólico, el cual aunque menos efectivo que la azida de sodio, se sabe que junto con el dietiltiocarbamato y otros compuestos orgánicos con radicales sulfhidrilo, se unen al cobre del centro catalítico de esta enzima inhibiéndola (Cu Tipo I). Contrario al efectivo desempeño de estos dos inhibidores, la presencia de EDTA no inactivó totalmente la lacasa, aún a una concentración del doble o más de aquélla a la que el ácido tioglicólico causó un cese total de la actividad (20 mM). Esta es una respuesta común a la presencia de este inhibidor (Kiiskinen *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2007; Lorenzo *et al.*, 2005).

8.4.5 Enzimas de *Trametes*

Una de las teorías sobre el origen filogenético del tipo de podredumbre en hongos, apunta a que tanto la parda como la blanca tuvieron su origen en un ancestro heterobasidiomicete capaz de aprovechar tanto la celulosa como la lignina y las especies que permanecieron asociadas a coníferas refinaron la degradación de celulosa y se transformaron en hongos de la podredumbre parda (característica polifilética avanzada), mientras los adaptados a angiospermas desarrollaron la habilidad de degradar en la misma proporción lignina y celulosa (Ryvarden, 1991). Actualmente, la mayoría de los basidiomicetos con actividad ligninolítica enzimática, secretan lacasa y MnP simultáneamente y la lacasa, además de tener una presencia generalizada en todo el reino Fungi, se ha reportado como principal actividad ligninolítica en algunos hongos de la podredumbre blanca principalmente en especies tropicales.

Para el género *Trametes* se han reportado como principales enzimas ligninolíticas la lacasa (Lac, EC 1.10.3.2) y la Manganese peroxidasa (MnP, EC 1.11.1.13) las cuales se producen en múltiples isoformas que se expresan en diferentes condiciones de cultivo, la celobiosa deshidrogenasa (CDH, EC 1.1.99.18) y la piranosa 2-oxidasa (P2O, EC 1.1.3.10) se presentan en menor proporción (Nyanhongo *et al.*, 2007) y la actividad LiP ha sido reportada exclusivamente para algunas cepas dicariotes de *T. versicolor*, *T. hirsuta* y *T. ochracea* (Tomsovský y Homolka, 2003) o en escasa cantidad en cultivos de *T. trogii* en medio de Kirk modificado (Dhouib *et al.*, 2005). Sin embargo, existen reportes de cultivos de *T.*

maxima (Sánchez-López *et al.*, 2008) en los que la única actividad ligninolítica detectada fue lacasa y otros para *T. trogii* en los que la principal enzima fue la lacasa y solamente se encontraron escasas cantidades de peroxidasa (Dhouib *et al.*, 2005). La presencia de actividad lacasa y manganeso peroxidasa en los cultivos de *Trametes pubescens* (LE95) concuerda con estudios previos (Galahup *et al.*, 2002) donde se concluye que esta combinación es más frecuente que la de LiP-Lac o LiP-MnP. Por otra parte, aunque la presencia de lacasa como única actividad encontrada en *T. trogii* (CS63), difiere de lo reportado por otros investigadores, quienes detectan Lac, MnP y aún LiP. Sin embargo, existen reportes de *T. trogii* en los que la única actividad ligninolítica detectada fue lacasa (Zouari-Mechichi *et al.*, 2006)

8.4.6 Mediadores

Bajo nuestras condiciones no fue detectada la presencia de mediadores o evidencia de que estuviesen presentes. Sin embargo, la adición de mediadores artificiales o la presencia de colorantes antraquinónicos en las mezclas de colorantes, al parecer si tuvo una influencia positiva sobre la actividad decolorante.

La continua detección de la lacasa como enzima principal en diferentes hongos ensayados en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas (*T. trogii*, *T. pubescens*, *T. hirsuta*, *T. maxima* y *Pycnoporus sanguineus*), el revelado de diferentes isoformas en los geles obtenidos en PAGE con muestras de sus cultivos o extractos libres de células, la variabilidad ocasional en los resultados de decoloración en placa a pesar de la uniformidad genética de los aislados (obtenidos a partir de puntas de hifas), así como los reportes de la lacasa como enzima principal (*Coriolopsis gallica*) o única (*P. cinnabarinus*) principalmente en ambientes tropicales (*T. maxima*), nos lleva a proponer que algunos hongos de zonas tropicales y subtropicales, al crecer sobre sustratos recalcitrantes (o que representan riesgo de toxicidad), producen diferentes isoenzimas de lacasa en diferentes periodos del crecimiento. Aquéllas con un elevado potencial redox podrían inicialmente atacar sustratos complejos, descomponiéndolos en subproductos más simples, los cuales podrían funcionar como mediadores para un nuevo tipo de isoenzimas de menor potencial redox, producidas en una segunda etapa del desarrollo (o en la misma etapa

pero con el fin de agilizar el ataque iniciado por las de alto potencial redox). La actividad oxidativa para degradar sustratos podría cesar al interrumpirse la producción de lacasas, mientras se desvía la actividad metabólica hacia la diferenciación del micelio en el cuerpo fructífero o al volverse tóxico el ambiente por la acumulación de los productos de la degradación del sustrato. Este sistema lacasa-mediador tendría la capacidad de oxidar sustratos de elevado potencial redox, que las isoenzimas de bajo potencial de la enzima por si solas no podrían, complementando la actividad de aquéllas de alto potencial. Una forma de demostrar lo anterior sería aislando, purificando y caracterizando las isoenzimas producidas en diferentes etapas de desarrollo del hongo, otra forma sería evidenciarlas mediante zimogramas con extractos de cultivos obtenidos en diferentes periodos del crecimiento y revelados con colorantes o sustratos de potencial redox diferente. Se sabe que las enzimas de los sistemas ligninolíticos no requieren de inductores, por lo que es lógico pensar que los hongos que producen mayormente lacasas podrían producir constitutivamente principalmente lacasas de elevado potencial redox en su medio natural y poseer en su arsenal diferentes isoenzimas que ampliarían la especificidad de sustratos, de modo que su degradación estaría dinámicamente regulada de acuerdo a las necesidades en tiempo real del hongo, de esta forma pocos sustratos resistirían el ataque enzimático, lo que le aseguraría al hongo el flujo de nutrientes durante su crecimiento (Shleev *et al.*, 2007; Dong *et al.*, 2005).

8. 5 Decoloración

Los colorantes que fueron ensayados pertenecen a cuatro grupos químicos diferentes y poseen estructuras similares a los más comúnmente empleados en la industria, sin embargo, el hecho que un aislado muestre capacidad de decoloración sobre un colorante de un grupo químico particular, no es garantía de que será capaz de decolorar cualquier colorante de este grupo. Esto se debe a que cada colorante impone un reto estructural, estérico y electrostático para la maquinaria enzimática decolorante, dependiente en parte de los sustituyentes en los anillos de benceno (Chivikula y Renganathan, 1995; Kim *et al.*, 1995; Knapp *et al.*, 1995; Pasti-Grigsby *et al.*, 1992). Por lo tanto el empleo de los hongos en procesos de biorremediación

implica poseer una amplia colección de especies procedentes de diferentes regiones geográficas o microhabitats, conocer de cada cepa fúngica las características de cultivo bajo las que expresa sus enzimas constitutivas y la mayoría de sus enzimas inducibles o proceder al ensayo del sustrato problema contra cada una de las cepas disponibles y bajo diferentes condiciones de crecimiento, o bien, probar un conjunto de enzimas comerciales y seleccionar la más adecuada para cada proceso. Afortunadamente la relación entre contaminantes y enzimas no es biunívoca, mucho menos entre contaminantes y cepas fúngicas. Por ello la estrategia para este trabajo fue tratar de encontrar aquéllos aislados regionales que decoloraran la mayor cantidad de colorantes de cada grupo químico, en diferente medio de cultivo. Los ensayos en placa mostraron que al menos 6 aislados nativos tienen un desempeño decolorante comparable a las cepas de referencia comúnmente reportadas con potencial para ser utilizadas con éxito en procesos de biorremediación de colorantes (Tabla VI). La eficiencia decolorante de los aislados CS63 y LE95 no fue igual sobre todos los colorantes, lo cual permitió formar tres grupos diferentes en función a la susceptibilidad a ser decolorados por ambos hongos (Fig. 7). En el primero, de fácil decoloración, se encuentran los colorantes antraquinónicos RBBR, AG27, monoazo AR44, triarilmetano CV, ABF e indigoide IN, que fueron atacados rápidamente y decolorados en 24 h en más de un 85%. En el segundo la decoloración fue más lenta y menor, alcanzando de un 50 a un 80% en 24 h; este grupo incluye al monoazo OII, diazo BK5 y triarilmetano BBR. En el tercer grupo estaría el monoazo AR183, el cual después de una decoloración inicial se tornó recalcitrante al proceso de decoloración. Similarmente a lo reportado por Jarosz–Wilkolazka *et al.* (2002), nuestros resultados indican que el azo AR183 es un colorante difícil de degradar tanto en placa como en medio líquido. Estos autores atribuyen este fenómeno a la presencia de los grupos azo y sulfo en la estructura del colorante. Del mismo modo, Baldrian y Snajdr (2006), consideran que el BK5 es difícil de degradar por lo inaccesible de sus grupos OH⁻ y NH₂⁻, coincidiendo con Spadaro *et al.* (1992), Chandler *et al.* (2004) y Asgher *et al.* (2006).

La diferencia en las capacidades decolorantes entre aislados ha sido atribuida por diferentes investigadores a diferencias fisiológicas (Reddy, 1995; Chandler *et al.*, 2004), el tipo de sistema enzimático, a las propiedades catalíticas específicas de las enzimas (Claus *et al.*, 2002), así como a su patrón de isoenzimas (Asgher *et al.*, 2006). Pointing (2001), explica la variabilidad en la habilidad decolorante como el

resultado de la expresión diferencial de isoformas enzimáticas en diferentes taxa o en una misma cepa debido a variaciones en las condiciones de cultivo. Esto se debe a que diferentes isoformas poseen diferentes especificidades (Ten Have y Teunissen, 2001). Zhang (2006), ha encontrado esta expresión diferencial trabajando con cocultivos.

También nuestros resultados coinciden con los muchos reportes que señalan que los colorantes antraquinónicos son más susceptibles y rápidos de degradar que los azo. Nyanhongo *et al.* (2002), lo atribuyen o bien a la diferencia en sus potenciales redox (más elevado que el del Centro de Cobre Tipo I) o a que estos colorantes no pueden llegar a este centro en el sitio activo, debido a su estructura estérica. Ya que los grupos funcionales fenólico, amino, acetamida y 2-metoxifenol, favorecen su degradación (Spadaro *et al.*, 1992; Chandler *et al.*, 2004) se ha propuesto preferentemente el emplear colorantes azo carboxílicos sobre los sulfónicos (Martins *et al.*, 2003).

El colorante antraquinónico RBBR fue el más fácil de decolorar como lo reportan Abadulla *et al.* (2000), para *T. hirsuta* y Novotný (2001), para *Irpex lacteus*. Aunque existen ensayos con RBBR que lo catalogan como un colorante difícil de decolorar, posiblemente porque algunos aislados solamente lo transforman y no lo aclaran totalmente, dejando un fondo color paja a violáceo en el medio. Algo similar encontramos para el BK5 y el BBR, los cuales pierden el color e intensidad originales pero dejan un residuo purpurino y parduzco respectivamente tanto en los ensayos en placa como en los cultivos sumergidos. Estudios adicionales serán necesarios para establecer la estructura y toxicidad de estos productos de degradación.

Finalmente, un comentario sobre el aspecto legal. La norma vigente que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas residuales en aguas y bienes nacionales (NOM-001-ECOL-1996) debería contemplar un nivel máximo permisible de color, ya que actualmente no lo establece a pesar de que éste es un factor antiestético y la presencia de los colorantes que lo causan en los cuerpos de agua, representa un posible riesgo a la salud.

9. CONCLUSIONES

Existen cepas de hongos ligninolíticos nativas de Nuevo León CS5, CU1, LE13, CS63 y LE95, que en igualdad de condiciones exhiben mejor capacidad decolorante que las de referencia *P. chrysosporium*, *T. versicolor* y *B. adusta*.

El sistema modificador de lignina de *Trametes trogii* CS63 pertenece al grupo Lac, mientras el de *Trametes pubescens* LE95 es del grupo Lac-MnP.

Los principios químico-enzimáticos responsables de la capacidad decolorante en *Trametes trogii* y *Trametes pubescens* corresponden a lacasas, probablemente de alto potencial redox.

Las lacasas de CS63 y LE95 decoloran mejor los colorantes IN, RBBR, CV, AR44 y ABF que a BK5, OII o BBR y muy pobremente el AR183.

La acción decolorante de ambos aislados nativos no requiere la presencia de mediadores, pero no se descarta la participación de ellos para la ligninólisis en condiciones naturales.

La lacasa de *T. trogii* es una proteína monomérica de masa molecular alrededor de los 45 kDa, que posee valores óptimos de pH de 4 y temperatura en el rango de 50 y 80°C. Es una proteína estable a valores de pH alrededor de la neutralidad y temperaturas inferiores a 60°C, cuya actividad es inhibida efectivamente por la azida de sodio y el ácido tioglicólico pero solo parcialmente por el EDTA.

La lacasa de *T. pubescens* es una proteína monomérica que presenta varias isoformas de masa molecular entre los 48 y 105 kDa, que posee valores óptimos de pH de 3.5 y temperatura en el rango de 50 y 80°C. Su estabilidad es mayor a temperaturas por debajo de 60°C y valores de pH cercanos a la neutralidad su actividad es inhibida

efectivamente por la presencia de la azida de sodio y el ácido tioglicólico pero solo parcialmente por el EDTA.

APÉNDICE A

CLASIFICACIÓN DE LOS COLORANTES POR SU USO SEGÚN EL WORLD BANK GROUP

Clasificación de los colorantes por su uso según el World Bank group (1998), modificado con información de The New Enciclopedia Británica y Wikipedia.

- Directos: su fijación es directa sobre fibras de lana, seda o algodón, aunque pueden usarse para cuero, papel o nylon. Se utiliza un baño neutro o ligeramente alcalino, a temperatura de ebullición o en un punto cercano a ella y añadiendo cloruro o sulfato de sodio, agentes fijadores y compuestos metálicos de cromo y cobre. Ej. Incluyen colorantes azo y algunos indicadores de pH y colorantes biológicos.
- Indirectos: requieren de un mordiente para fijarse a la fibra.
- Dispersos o no iónicos: Desarrollados en 1923 teñir para las fibras de acetato de celulosa y aplicados después en fibras sintéticas como nylon, acrílico y poliéster. Son bastante insolubles en agua, por lo que se expenden en polvo o pasta de partículas muy finas, lo que permite una mayor área de contacto con la fibra e incrementa la solubilidad, el agente dispersante influye en la velocidad del teñido, para lo cual a veces es necesario elevar la presión y la temperatura hasta 130°C.
- Ácidos: Usados para teñir fibras animales como seda y lana, fibras de acrílico modificadas y de nylon, en soluciones neutras a ácidas (contienen ácido sulfúrico, acético, sulfonato de sodio y surfactantes) en combinación con una proteína anfotérica. El color se fija al formarse la sal entre los grupos aniónicos del colorante y catiónicos de la fibra.
- Básicos: Colorantes catiónicos a base de sales alcalinas que se fijan en fibras (usan derivados amino, ácido acético y agentes suavizantes) usados principalmente para papel y fibras acrílicas, pero tienen algún uso en lana y seda.
- Neutros: tiñen en soluciones neutras las fibras animales y vegetales mordentadas con taninos.
- Rápidos (azoicos): Un compuesto diazonio se acopla en solución alcalina al b-naftol (utilizado desde 1880) o al Naftol AS (en uso desde 1912) y origina un

colorante insoluble sobre la fibra (contienen el grupo azo, ácido fórmico, sosa cáustica, compuestos metálicos y nitrato de sodio) su aplicación es especialmente para algodón.

- A la cuba o tina: No tiñen directamente. Su leucoforma (sal metálica) tiene afinidad por la fibra, bajo condiciones reductoras alcalinas son solubilizados e impregnados dentro de las fibras y luego reoxidados a un color insoluble. Ej. el índigo de los blue jeans.
- Sobre mordentes: El mordente mejora la resistencia al lavado, transpiración y luz, así como altera el color final. La mayoría de los colorantes naturales son de este tipo, así como los cromo mordentes que comprenden el 30% de los colorantes para lana (muchos de los mordentes caen en la categoría de metales pesados, como el dicromato de potasio, las fibras mordentadas son teñidas con hidróxidos metálicos, formando precipitados de sales o lacas).
- Reactivos: El cromóforo contiene un sustituyente capaz de reaccionar con la fibra sustrato. Los enlaces covalentes que se forman los colocan entre los de mayor permanencia. Los colorantes reactivos en frío se aplican a temperatura ambiente, se usan para teñir algodón y otras fibras de celulosa en casa y por artistas. Ej. Cibacron F, Drimarene K, Porción MX.
- Lacas o pigmentos: generalmente retienen su forma cristalina o particulada durante su aplicación, formando compuestos insolubles con aluminio, bario o cromo sobre sales de molibdeno, los precipitados son usados en pinturas y tintas. Los hay a la cuba y de desarrollo sobre la fibra o al hielo.
- Azufrosos o sulfurosos: Utilizados para teñir algodón con colores oscuros, como en los calcetines. El teñido se hace en dos partes, el primer baño produce un color pálido que al oxidarse produce un negro oscuro.
- Diazoicos: Se obtienen tratando una fibra con componentes acoplantes y diazoicos que al reaccionar producen un colorante sobre o dentro de ella. Ajustando las condiciones del baño los dos componentes, de cuya elección depende el color final, reaccionan para dar el colorante azo insoluble. Aportan tonos pálidos con resistencia a la luz, al lavado y ácidos, pero sensible a la luz y cloro.

APÉNDICE B

CLASIFICACIÓN QUÍMICA DE LOS COLORANTES DE ACUERDO A SUS
GRUPOS FUNCIONALES Y PRECURSORES, FÓRMULAS GENERALES Y
EJEMPLOS

Clasificación química de los colorantes de acuerdo a sus grupos funcionales y precursores, fórmulas generales y ejemplos (Stainsfile, 2005).

- Colorantes azo. Poseen la fórmula general ($R-N=N-R'$) donde el grupo funcional $N=N$ llamado imida o azo es el cromóforo, R y R' pueden ser alifáticos o aromáticos y el auxocromo puede ser ácido (-OH) o básico (-NH₂, -N(CH₃)₂). Los hay mono, dis, tris y tetrakisazo. Dentro de los monoazo se encuentra el naranja G, el Ponceau 2R, el Naranja II (Orange II, OII), los Rojos Ácido 44 y 183 (Acid Red 44, AR44 y Acid Red 183, AR183). Como disazo se tiene el Negro Reactivo 5 (Reactive Black 5), Amido Black 10B (Acid Black 1) y Biebrich Escarlata (Acid Red 66) y los liposolubles lisocromos o colorantes grasos. Ejemplo de tetrakisazo es el Sirius Red F3B (Direct red 80).
- Los colorantes de antraquinona. Derivan del antraceno, el cromóforo es un anillo quinoide con grupos hidroxilo o amino fijos a la estructura general, los que tienen grupos hidroxilo son las hidroxiantraquinonas como la alizarina, la alizarina rojo S y el antraceno azul SWR. Dentro de las aminoantraquinonas se incluye el rojo rápido nuclear, el Azul Brillante Reactivo de Remazol (Remazol Brilliant Blue Reactive, RBBR), Verde Ácido 27 (Acid Green 27, AG 27).
- Colorantes diaril y triaril metano. Derivan del metano, los átomos de hidrógeno se sustituyen por anillos arilo, llamados también fenilo, por lo que se conocen también como colorantes fenilmetano. Los colorantes triarilmetano son de uso común. Cuando tienen grupos sulfónicos fuertemente aniónicos, hacen la carga neta de la molécula negativa y se vuelven colorantes ácidos como la fuscina ácida y el azul de metilo. Cuando en la molécula aparecen grupos hidroxilo se denominan hidroxitriaril metanos y tienen carácter básico como el eriocromo cyanina R. El Cristal Violeta (Basic Violet 3), tiene la estructura típica, el Azul Brillante Reactivo (Brilliant Blue Reactive, BBR) y Azul de Bromofenol (ABF) son otros ejemplos.

- Colorantes de acridina. Derivan de la acridina. Su fórmula general muestra el cromóforo como un anillo quinoide. La molécula tiene carga positiva, en el átomo de nitrógeno fijo al anillo quinoide por lo que los colorantes son básicos. Son colorantes con características fluorescentes. Los ejemplos más comunes son el naranja de acridina y la acriflavina.
- Colorantes indigoides y tioindigoides. Se obtienen a partir de la anilina mediante reacciones con cianuro de sodio y formaldehído y cambiando la fenilglicina formada a indoxil con sodamida y potasa, el indoxil se oxida a índigo (Vat Blue D); otro ejemplo es el Índigo Carmín.
- Los colorantes nitro. Son derivados nitrados o polinitrados de fenoles que presentan al menos un grupo el cromóforo nitro ($-\text{NO}_2$) en posición orto o para. Son invariablemente ácidos y sus electrones están delocalizados y se integra con anillos arilo causando absorción en el rango visible. Colorantes comunes son el ácido pícrico y el Martius Yellow (Acid yellow 24).
- Los colorantes nitrosos. Contienen un grupo funcional nitroso ($-\text{N}=\text{O}$).
- Las ftalocianinas se obtienen por calentamiento de un compuesto derivado del anhídrido ftálico con una sal cuprosa. Son fórmulas complejas, muchas veces halogenadas. Son poco numerosos pero de uso común. Azul de Alciano (Ingrain Blue 1) y Verde de Alciano, Azul Rápido Luxol (Azul Solvente 38).
- Los colorantes de quinona-imina. Tienen un precursor teórico en la paraquinona di-imina. Hay varios subgrupos, las indoaminas, los indofenoles, las azinas, las oxazinas y las thiazinas. Las azinas se subdividen en eurodinas, safraninas e indulinas. Las primeras con grupos amino se ilustran por el rojo neutro. Las safraninas, con un anillo aril fijo al nitrógeno central incluyen la safranina O. La nigrosina representa a las indulinas. Las oxazinas incluyen la Galocianina, el Azul de Galamina y el Azul Celestino B. Las thiazinas son colorantes comunes, como los homólogos del Azul de Metileno (Azul de Metileno, Azul de Toluidina O, Azure A, B y C, Thionina).
- Los compuestos de tetrazolium no son colorantes en un sentido estricto; su estructura característica es un anillo de 5 miembros, 1 carbón y 4 átomos de nitrógeno. Pueden contener una o dos de estas estructuras, las cuales al aceptar un hidrógeno se reducen a sus formazanos de colores intensos pero insolubles, por lo

que precipitan al formarse. Ejemplos de ellos son el Iodonitrotetrazolium y el Azulnitrotetrazolium.

- Los compuestos tiazólicos contienen este anillo en la fórmula general. Incluyen la Tioflavina T con el grupo indamina $-N=$ como cromóforo.
- Los colorantes derivados del xanteno se dividen en 3 subgrupos: fluorenos (se llaman Eosinas y derivan del fluorescieno), rhodoles y fluorones. Los fluorenos se subdividen en pironinas (Pironina Y y Pironina B), rodaminas (Rodamina B), succineinas, sacareinas y rosaminas.

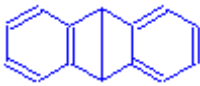
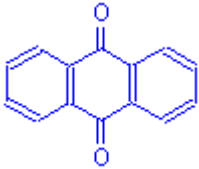
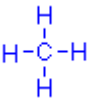
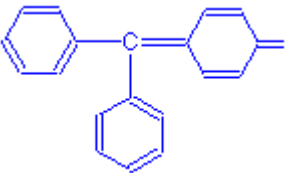
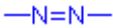
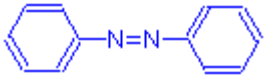
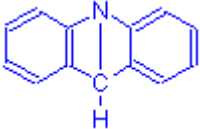
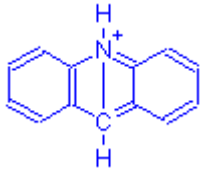
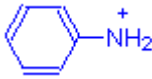
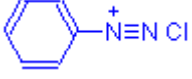

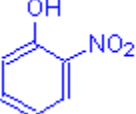
Tabla XIV. Clasificación de algunos colorantes por su tipo

(DI) AZO	FTALOCIANINA	COMPLEJO METÁLICO	(POLI) ANTRAQUINÓNICO	TRIFENIL METANO	INDIGO DE	ACRÍLICO BÁSICO	HETERO CÍCLICO
Amaranto Amarillo Brillante Amarillo de clorazol Amarillo de Everzol 4GL Amarillo Mordente 10 Azul Navione Azul Negro Naftol Azul Turquesa de Everzol G Cibacrón Amarillo Brillante 3G-P (Amarillo Reactivo 2) Cibacrón Rojo Brillante 3B-A (Rojo Reactivo 4) Crisofenina Naranja de Remazol Naranja II Naranja K-GL Naranja Reactivo 96	Amarillo Everzol 4GL Amarillo Supra Everdirect PG Azul Reactivo 15 Azul Reactivo 38 Azul Turquesa de Everzol G Azul Turquesa de Remazol Naranja K-GL Rojo Everzol RBN	Sal de Tetrasodio del Acido Tetrasulfónico de ftalocianina de Cobre	Azul Brillante de Remazol Reactivo Azul Reactivo 5 Poly R-478 Verde Ácido 27	Azul de Bromofenol Cristal Violeta Rojo Cresol Verde Brillante Verde Malaquita	Indigo Carmin	Rojo 2AB	Rojo Neutro

Tabla XIV. Clasificación de algunos colorantes por su tipo (Continuación)

(DI) AZO	FTALOCIANINA	COMPLEJO METÁLICO	(POLI) ANTRAQUINÓNICO	TRIFENIL METANO	INDIGO DE	ACRÍLICO BÁSICO	HETERO CÍCLICO
Negro de Remazol Negro Marínado Negro Reactivo 5 Nueva Coccina Pardo a la Cuba Reactofix Amarillo Dorado Reactofix Azul HE ₂ R Reactofix Naranja Rojo Ácido 106 Rojo al Azufre Rojo Brillante de Remazol BB Rojo Congo Rojo de Everzol RBN Rojo de Metilo Supra Amarillo- Everdirect PG Tartrazina Tropaeolin O Verde al Azufre Violeta Reactivo 5							

Precursores, clases químicas y fórmulas estructurales de los colorantes.

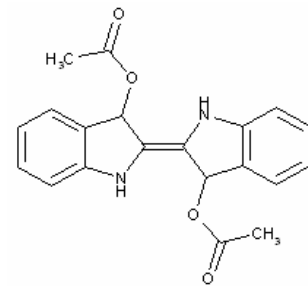
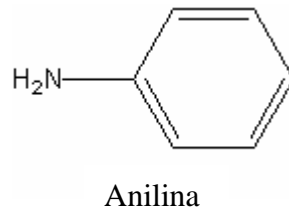
CLASE	PRECURSOR	FÓRMULA GENERAL
Antraquinónico	 Antraceno	 Anillo quinoide
Triaril (fenil) metano	 Metano	 Anillos arilo o fenilo
Azoico	 Cromóforo azo	 Monoazo
Acridina	 Anillo quinoide básico	 Anillo quinoide básico
Diazonio	 Arilamina	 Estado cargado de la sal de diazonio
Nitro	 Cromóforo nitro	

CLASE

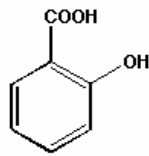
PRECURSOR

FÓRMULA GENERAL

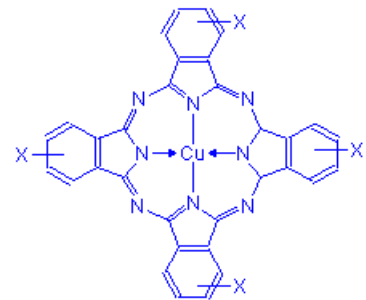
Indigoide



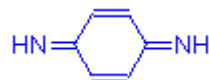
Ftalocianinas



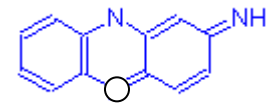
Anhídrido ftálico



Quinona-imina

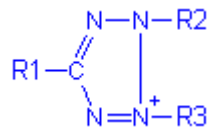


Precursor teórico
Paraquinonadiimina

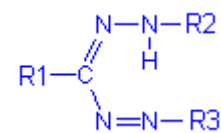


○ = N azina
○ = O oxazina
○ = S tiazina

Tetrazolium

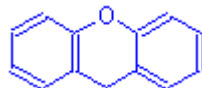


Tetrazolium
anillo 1C 4N

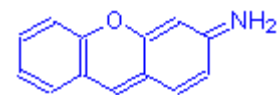


Formazano

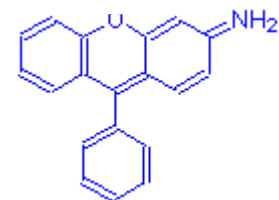
Derivados de
xanteno



Xanteno



Pironina



Rodamina

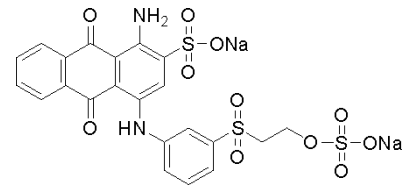
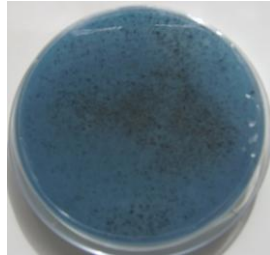
APÉNDICE C

NOMBRES Y FÓRMULAS QUÍMICAS DE LOS SUSTRATOS ENZIMÁTICOS Y COLORANTES UTILIZADOS

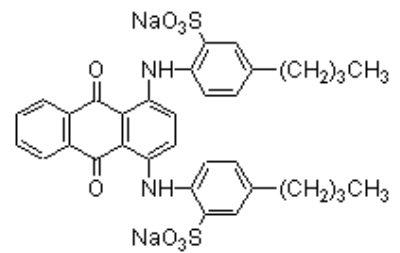
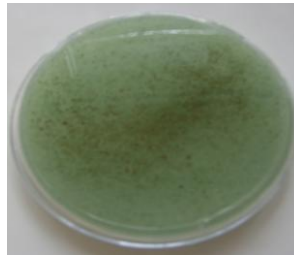
Nombre, grupo y fórmula de los colorantes sintéticos empleados

ANTRAQUINÓNICOS

AZUL BRILLANTE DE REMAZOL REACTIVO

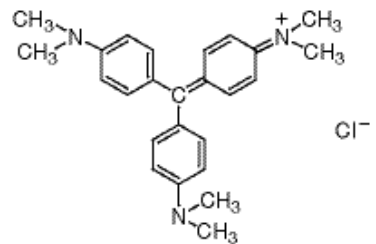
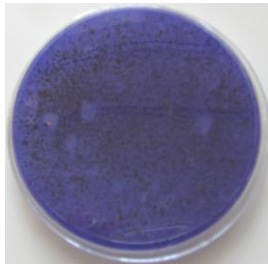


ACID GREEN 27

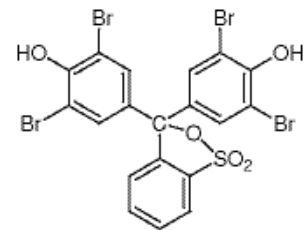


TRIFENILMETANOS

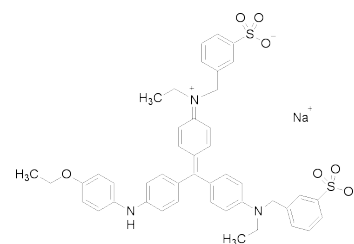
CRISTAL VIOLETA



AZUL DE BROMOFENOL

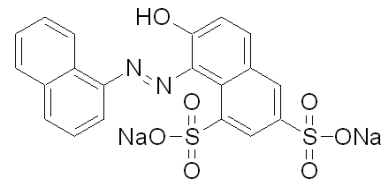


AZUL BRILLANTE REACTIVO

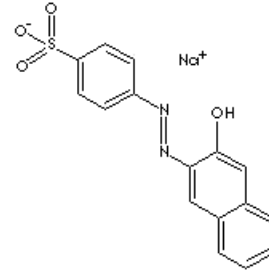


MONOAZOICOS

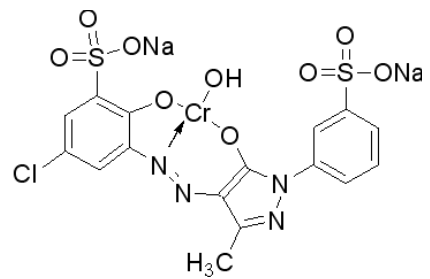
ACID RED 44



ORANGE II

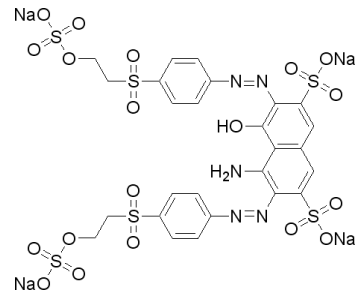


ACID RED 183



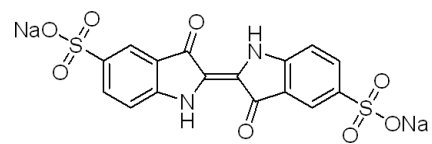
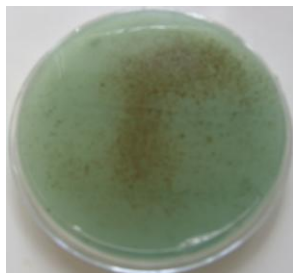
DIAZOICO

NEGRO REACTIVO 5



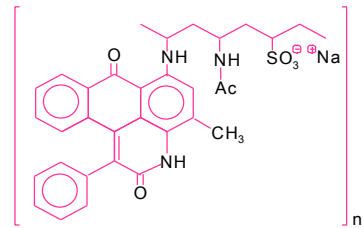
INDIGOIDE

INDIGO CARMÍN

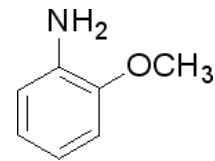
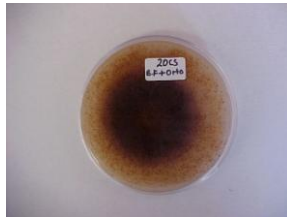


Sustratos cromogénicos: nombre, reacción positiva y fórmula.

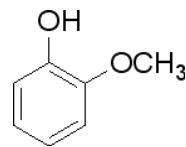
POLY R-478



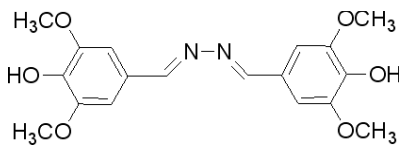
O-ANISIDINA



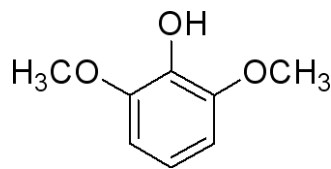
GUAYACOL



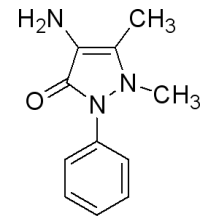
Reactivos



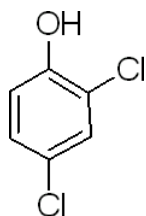
SIRINGALDAZINA



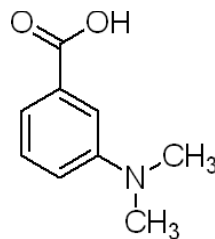
2, 6-DIMETOXIFENOL



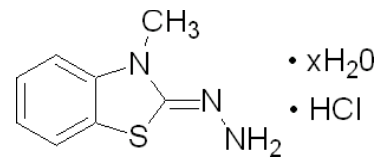
4-AMINOANTIPIRINA



2, 4-DICLOROFENOL



ÁCIDO 3-DIMETILAMINO BENZOICO

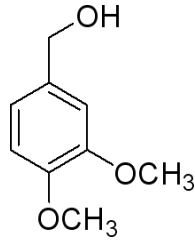


3-METIL,2-BENZOTRIAZOLINONA HIDRAZONA

• xH₂O
• HCl

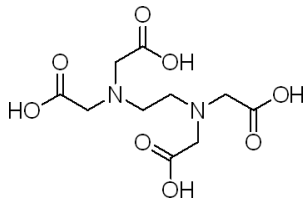
Reactivos (continuación)

ALCOHOL
VERATRÍLICO

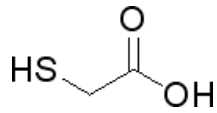


ION
MANGANOSO Mn^{+2}

Inhibidores



EDTA

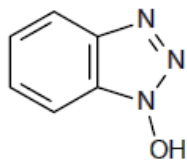


ÁCIDO
TIOGLICÓLICO

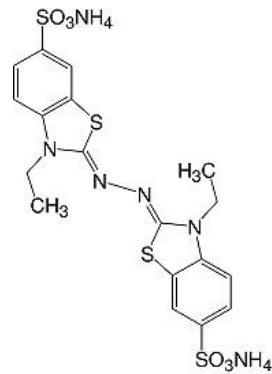
NaN_3

AZIDA DE SODIO

Mediadores



1-HIDROXIBENZOTRIAZOL



SAL DIAMONIO DEL
ÁCIDO 2,2'- AZINOBIS
(3-ETILBENZOTIAZOLIN-
6-SULFÓNICO) = ABTS

APÉNDICE D

DIFERENTES HONGOS DE LA PODREDUMBRE BLANCA REPORTADOS
COMO DEGRADADORES DE COLORANTES SINTÉTICOS

APÉNDICE D

Diferentes hongos de la podredumbre blanca reportados como degradadores de colorantes sintéticos

Organismo	Colorante	Referencia
<i>Bjerkandera adusta</i>	Naranja Reactivo 96, Violeta Reactivo 5, Negro Reactivo 5, Azul Reactivo 1.5, Azul Reactivo 38, Rojo Reactivo 198 RBBR, Poly R-478 Violeta Reactivo 5, Negro Reactivo 5, Azul Reactivo 38 Azul Básico 22	Heinfling <i>et al.</i> (1997) Novotny <i>et al.</i> (2001) Heinfling <i>et al.</i> (1998 a,b) Jarosz-Wilkolaska <i>et al.</i> (2002)
<i>Bjerkandera fumosa</i>	Amaranto	Swamy & Ramsay (1999)
<i>Bjerkandera</i> sp. BOS 55	Naranja II, Azul Reactivo 38, Poly R-478	Moreira <i>et al.</i> (2000)
<i>Ceriporia metamorphosa</i>	RBBR, Poly R-478	Novotny <i>et al.</i> (2001)
<i>Collybia dryophila</i>	Poly B-411, RBBR, Negro Reactivo 5	Baldrian & Snajdr (2006)
<i>Coriolus hirsutus</i>	Melanoidinas	Miyata <i>et al.</i> (1998)
<i>Datronia concentrica</i>	Poly R-478	Tekere <i>et al.</i> (2001)
<i>Daedalea flavida</i>	Verde Brillante, Rojo Cresol, Cristal Violeta	Gill <i>et al.</i> (2002)
<i>Daedalea quercina</i>	Azul Cielo Chicago, RBBR, Azul de Tripano, Azul Reactivo 2, Poly B-411, Negro Reactivo 5	Baldrian (2004)
<i>Daedaleopsis confragosa</i>	RBBR, Poly R-478	Novotny <i>et al.</i> (2001)
<i>Dichomitus squalens</i>	Verde Brillante, Cristal Violeta, Rojo Cresol, Rojo Congo, Naranja II	Gill <i>et al.</i> (2002)
<i>Flavodon flavus</i>	Naranja G, RBBR	Eichlerova <i>et al.</i> (2005)
<i>Fomes lividus</i>	Azure B 96 II, Verde Brillante, Rojo Congo, Cristal Violeta, Poly B, Poly R, RBBR	Raghkumar (2000)
<i>Funalia trogi</i>	Naranja G, Rojo Congo, Negro Armido 10B, efluente Cristal Violeta	Selvam <i>et al.</i> (2003)
<i>Ganoderma lucidum</i>	RBBR, Azul Dimaren Cl.-BR	Yesilada (1995)
<i>Geotrichum candidum</i>	Amarillo Brillante de Remazol 3GL, Azul Porcion PX-5R, Azul Cibacron P-3RGR	Erkurt <i>et al.</i> (2007)
<i>Geotrichum</i> sp.	Azul Reactivo 5	Ashger <i>et al.</i> (2006)
<i>Ischnoderma resinosum</i>	Negro Reactivo 5, Rojo Reactivo 158, Amarillo Reactivo 27	Kim & Shoda (1999)
<i>Irpex lacteus</i>	Naranja G, RBBR, Azul Reactivo 19	Maximo <i>et al.</i> (2003)
	RBBR	Eichlerova <i>et al.</i> (2005)
	RBBR, Azul de Bromofenol, Ftalocianina-Cu, Rojo de Metilo, Rojo Congo, Negro Azul de naftol, Poly R-478	Kokol <i>et al.</i> (2007) Bhatt <i>et al.</i> (2000) Novotny <i>et al.</i> (2001)

<i>Lentinius edodes</i>	Azul Reactivo	Mimussi <i>et al.</i> (2001)
<i>Lentinius tigrinus</i>	Naranja II, Azul Reactivo 38, Poly R-478	Moreira <i>et al.</i> (2000)
<i>Micoactia nothofagi</i>	RBBR, Poly R-478	Novotny <i>et al.</i> (2001)
<i>Mycena inclinata</i>	Poly B-411, RBBR, Negro Reactivo 5	Baldrian & Snajdr (2006)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Polimérico B-411, Polimérico R-481, Polimérico Y-606 Naranja Reactivo 96, Violeta Reactivo 5, Negro Reactivo 5, Azul Reactivo 15, Azul Reactivo 38 Cristal Violeta Azul Turquesa de Remazol Azo, Azul Azure, Rojo Cresol, Cristal Violeta, Azul de Bromofenol Azul Turquesa de Everzol G, Amarillo de Everzol 4GL, Rojo de Everzol RBN, Naranja K-GL, Supra Amarillo Everdirect PG Orange II Azul de Metileno Rosa de Bengala Poly R-481 Poly R-478 Ácido 3,5-dimetil-4-aminobencensulfónico, Ácido 3,5-dimetil-4-hidroxibencensulfónico, Reactofix Naranja, Reactofix Amarillo Dorado, Reactofix Azul HE ₂ R, Negro Marinado, Verde Azufre, Rojo Azufre, Azul Navione, Pardo a la Cuba Naranja Disperso 3 Amarillo disperso 3 Indigo Carmin, Cristal Violeta, Verde Ácido 27, Verde Brillante, Naranja II, Cibacrón Amarillo Brillante 3G-P (Amarillo Reactivo 2), Cibacrón Rojo Brillante 3B-A (Rojo Reactivo 4), Ftalocianina-Cu, Rojo Neutro, Rojo Ácido 106, Amarillo Mordente 10, Amarillo Brillante, Crisofenina, Amarillo de Clorazol Rojo 2B Naranja II, Azul Reactivo 38, Poly R-478 Verde Brillante, Cristal Violeta, Rojo Cresol, Rojo Congo, Naranja II Amaranto, Negro B de Remazol, Naranja de Remazol, RBBR, Azul Reactivo, Tropaocolin O Azul de Bromofenol, Rojo Congo, Azul de Metileno, Verde de Metilo, Naranja de metilo, Poly R-478, RBBR, Azul de Toluidina O, Poly S-119, Poly T-128 Amarillo Ácido 9 Indigo Carmin, Azul Reactivo 15, Violeta Ácido 7, Azul Ácido 25, Negro Ácido 24 Negro Ácido 194, Azul Disperso 56, Negro Azufre 1, Azul a la Cuba 6, Azul Crisol BH Amaranto, Nueva Coccina, Naranja G, Tartrazina Azul Reactivo Spg (diaz), Cm-s (diaz) RBBR Indigo	Glenm & Gold (1983) Heintfling <i>et al.</i> (1997) Bumpus & Brock (1998) Conneely <i>et al.</i> (1999) Cameron <i>et al.</i> (2000) Kapdan <i>et al.</i> (2000a) Cripps <i>et al.</i> (1990), Mielgo <i>et al.</i> (2001) Kling & Neto (1991) Gogna <i>et al.</i> (1991) Gogna <i>et al.</i> (1991) Greene & Gould (1986) Couto <i>et al.</i> (2000) Capalash & Sharma (1992) Spadaro <i>et al.</i> (1992) Spadaro & Renganathan (1994) Knapp <i>et al.</i> (1995) Jain <i>et al.</i> (2000) Moreira <i>et al.</i> (2000) Gill <i>et al.</i> (2002) Swamy & Ramsay (1999) Ollikka <i>et al.</i> (1993) Pasczynski <i>et al.</i> (1991) Young & Yu (1997) Rodríguez <i>et al.</i> (1999) Chagas & Durrant (2001) Mimussi <i>et al.</i> (2001) Martins <i>et al.</i> (2001) Novotny <i>et al.</i> (2001) Balan & Monteiro (2001)

	Azul de Remazol RR, Rojo de Remazol Amarillo Brillante de Remazol 3GL, Azul Porcion PX-5R, Azul Cibacron P-3RGR, Naranja Dimareno K-GI	Toh <i>et al.</i> (2003) Ashger <i>et al.</i> (2006)
<i>Phanerochaete betulinus</i>	Indigo Carmin	Knapp <i>et al.</i> (1995)
<i>Phanerochaete sordida</i>	Naranja II, Azul Reactivo 38, Poly R-478	Moreira <i>et al.</i> (2000)
<i>Phellinus gilvus</i>	Orange II Indigo	Mielgo <i>et al.</i> (2001) Balan & Monteiro (2001)
<i>Phellinus pseudopunctatus</i>	RBBR, Poly R-478	Novotny <i>et al.</i> (2001) Gill <i>et al.</i> (2002)
<i>Phlebia brevispora</i>	Verde Brillante, Rojo Cresol, Cristal Violeta	Kirby <i>et al.</i> (2000)
<i>Phlebia (Merulius) tremellosa</i>	Rojo Cibacron, Naranja Cibacron, Amarillo dorado de Remazol, Azul de Remazol, Azul Marino de Remazol, Azul Turquesa de Remazol, Negro Remazol B, Rojo de Remazol, Mezcla	Gill <i>et al.</i> (2002)
<i>Phlebia fascicularia</i>	Verde Brillante, Cristal Violeta, Rojo Cresol, Rojo Congo, Naranja II	Gill <i>et al.</i> (2002)
<i>Phlebia floridensis</i>	Verde Brillante, Cristal Violeta, Rojo Cresol, Rojo Congo, Naranja II	Gill <i>et al.</i> (2002)
<i>Phlebia radiata</i>	Naranja II, Azul Reactivo 38, Poly R-478	Moreira <i>et al.</i> (2000) Gill <i>et al.</i> (2002)
	Cristal Violeta, Rojo Congo, Naranja II	
<i>Piptoporus betulinus</i>	Indigo Carmin, Cristal Violeta, Verde Ácido 27, Verde Brillante, Naranja II, Cibacron Amarillo Brillante 3G-P (Amarillo Reactivo 2), Cibacron Rojo Brillante 3B-A (Rojo Reactivo 4), Ftalocianina-Cu, Rojo Neutro, Rojo Ácido 106, Amarillo Brillante, Crisofenina, Amarillo de Clorazol	Knapp <i>et al.</i> (1995)
<i>Pleurotus calypttratus</i>	Naranja G, RBBR	Eichlerova <i>et al.</i> (2005)
<i>Pleurotus eryngii</i>	Violeta Reactivo 5, Negro Reactivo 5, Azul Reactivo 38	Heinfling <i>et al.</i> (1998 a,b)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	RBBR Indigo Carmin, Cristal Violeta, Verde Ácido 27, Verde Brillante, Naranja II, Cibacron Amarillo Brillante 3G-P (Amarillo Reactivo 2), Cibacron Rojo Brillante 3B-A (Rojo Reactivo 4), Ftalocianina-Cu, Rojo Neutro, Rojo Ácido 106, Amarillo Brillante, Crisofenina, Amarillo de Clorazol	Vyas & Molitoris (1995) Knapp <i>et al.</i> (1995)
	Negro Ácido 194, Azul Ácido 185, Azul Disperso 56, Negro Azufre 1, Azul de Cubeta 6, Azul Orisol BH, Amarillo Disperso 54, Azul Reactivo 19, Azul Reactivo 158, Rojo de Cubeta 10, Rojo de Cubeta 46, Turquesa Orisol JL	Rodriguez <i>et al.</i> (1999)
	Amarillo Brillante de Remazol 3GR, Azul Porcion PX-5R, Azul Cibacron P-3RGR, Naranja Dimareno K-GI	Ashger <i>et al.</i> (2006)
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	RBBR, Azul Dimaren CL-BR	Erkurt <i>et al.</i> (2007)
	Indigo, Azul de Cubeta I Amaranto, Nueva Coecina, Naranja G, Tartrazina	Balan & Monteiro (2001) Chagas & Durrant (2001)
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Negro Amido, Rojo Congo, Azul de Tripano, Verde de Metilo, RBBR, Violeta de Metilo, Violeta de Etilo, Azul de Cresilo Brillante	Zilly <i>et al.</i> (2002), Tychanowicz <i>et al.</i> (2004)
<i>Polyporus ciliatus</i>	Naranja II, Azul Reactivo 38, Poly R-478	Moreira <i>et al.</i> (2000)
<i>Polyporus sanguineus</i>	Cristal Violeta, Rojo Congo, Verde Brillante	Gill <i>et al.</i> (2002)

<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Chicago Sky Blue	Schliephake <i>et al.</i> (2000)
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Poly R-478 Amaranto, Naranja G, Azul de Bromofenol, Verde Malaquita Índigo, Azul de Cubeta I	Tekere <i>et al.</i> (2001) Pointing & Vrijmoed (2000) Balan & Monteiro (2001)
<i>Stereum hirsutum</i>	Naranja II, Azul Reactivo 38, Poly R-478 Verde Malaquita, Índigo Carmin, Ponceau 2R	Moreira <i>et al.</i> (2000) Mouso <i>et al.</i> (2007)
<i>Stereum rugosum</i>	RBBR, Poly R-478	Novotny <i>et al.</i> (2001)
<i>Stropharia rugoso-annulata</i>	Rojo Ácido 183 Poly B-411, RBBR, Negro Reactivo 5	Jarosz-Wilkolaska <i>et al.</i> (2002) Baldrian & Snajdr (2006)
<i>Trametes versicolor</i> (<i>Coriolus versicolor</i>)	Amaranto, Negro de Remazol B, Naranja de Remazol, RBBR, Azul Reactivo, Tropaeolin O Índigo Carmin, Azul Reactivo 15, Azul Ácido 25, Negro Ácido 24 Verde Ácido 27, Violeta Ácido 7, Índigo Carmin Cristal Violeta Índigo Carmin, Cristal Violeta, Verde Ácido 27, Verde Brillante, Naranja II, Cibacrón Amarillo Brillante 3G-P (Amarillo Reactivo 2), Cibacrón Rojo Brillante 3B-A (Rojo Reactivo 4), Ftalocianina-Cu, Rojo Neutro, Rojo Ácido 106, Amarillo Brillante, Crisofenina, Amarillo de Clorazol Pigmento Violeta 12 Naranja II Naranja Reactivo 96, Violeta Reactivo 5, Negro Reactivo 5, Azul Reactivo 15, Azul Reactivo 38 Amaranto, Negro de Remazol, RBBR, Naranja de Remazol, Azul Reactivo 15, Tropaeolin O, Rojo Brillante de Remazol BB Azul Turquesa de Everzol G, Amarillo de Everzol 4GL, Rojo de Everzol RBN, Naranja K-GL, Supra Amarillo Everdirect PG Azul Reactivo RBBR, Poly R-478 Azul de Metileno Amaranto, Tropaeolina, Azul Reactivo 15, Rojo Congo, Negro Reactivo 5 Amarillo Brillante de Remazol 3GL, Azul Porcion PX-5R, Azul Cibacron P-3RGR, Naranja Dimareno K-GL RBBR, Azul Dimaren CL-BR Poly R-478	Swamy & Ramsay (1999) Young & Yu (1997) Wang & Yu (1988) Yesilada (1995) Knapp <i>et al.</i> (1995) Itoh <i>et al.</i> (1998) Sam & Yesilada Heinfling <i>et al.</i> (1997) Swamy and Ramsay (1999) Minussi <i>et al.</i> (2001) Novotny <i>et al.</i> (2001) Mazmanci <i>et al.</i> (2002) Ramsay & Nguyen (2002) Ashger <i>et al.</i> (2006) Erkurt <i>et al.</i> (2007) Tekere <i>et al.</i> (2001)
<i>Trametes cingulata</i>	Negro Ácido 194, Azul Ácido 185, Negro Directo 22, Azul Disperso 79, Azul Reactivo 158, Azul Disperso 56, Azul Reactivo 19, Negro Azufre 1, Negro Orisol 2V, Azul Orisol BH, Turquesa Orisol JL	Rodriguez <i>et al.</i> (1999)
<i>Trametes hispida</i>	Poly R-478	Tekere <i>et al.</i> (2001)
<i>Trametes pocas</i>	Azul Reactivo	Minussi <i>et al.</i> (2001)
<i>Trametes villosa</i>		

APÉNDICE E

ÍNDICES DE ACTIVIDAD LIGNINOLÍTICA Y DECOLORANTE (I_{AL} Y D) DE
LOS AISLADOS NATIVOS EN LA COLECCIÓN DEL LABORATORIO
DE ENZIMOLOGÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS CALCULADOS CON LOS RESULTADOS
DE GUTIÉRREZ SOTO (2004)

Apéndice E. Resultados del cálculo del Índice de Actividad Ligninolítica y Decolorante de los aislados nativos en la Colección del Laboratorio de Enzimología, FCB, UANL (Gutiérrez Soto, 2006).

CEPA	GUA	OA	PR	RBBR	AR44	CV	I _{ALyD}
CS1	1	1	0	0	0	0	2.0
CS2	1	1	1	2	2	2*	8.0
CS5	1	1	1	2	2	2	9.0
CS5*	1	1	1	2	2	2	9.0
CS6	1	1	1	2	2	2	9.0
CS9	1	1	0	1	0	0	3.0
CS11	0	0	0	0.5	0.5	0	1.0
CS19	1	1	0.5	1	1	0	4.5
CS20	1	1	1	2	2	2*	9.0
CS21	1	1	0	0	0	0	3.0
CS22	1	1	0	1	0	0	3.0
CS24	1	1	0	1	0	0	3.0
CS25	1	1	0	0	0	0	2.0
CS27	1	1	1	2	2	0.5	7.5
CS31	1	1	0.5	1	1	0	4.5
CS39	1	1	0	0.5	0.5	0	3.0
CS41	0	1	0.5	1	1	1	4.5
CS43	1	1	0	2	0	1	5.0
CS44	1	1	0	0	0	0	2.0
CS48	1	1	1	2	2	1	8.0
CS50	0	0	0	0	0	0	0.0
CS52	1	1	0.5	0.5	0	0	3.0
CS54	1	1	0.5	2	2	2	8.5
CS60	1	1	0	0.5	2	1	5.5
CS61	1	1	1	2	2	2*	9.0
CS62	1	1	0.5	2	2	2	8.5
CS63	1	1	1	2	2	2	9.0
CS64	1	1	1	2	2	2	9.0
CS65	1	1	0	0	0	0	2.0
CS66	1	1	0	0	0	0	2.0
CS67	0	0	0	0	0	0	0.0
CS77	?	?	?	?	?	?	?
CS78	1	1	0.5	1	1	1	5.5
LE5	1	1	1	2	2	2	9.0
LE7	1	1	0.5	2	2	1	7.5
LE13	1	1	1	2	2	2	9.0
LE16	1	1	0	0	0	0	2.0
LE24	1	1	0	1	1	1	5.0
LE31	1	1	1	2	2	1	8.0

CEPA	GUA	OA	PR	RBBR	AR44	CV	I _{ALyD}
LE32	1	1	0.5	2	2	1	8.0
LE33	0	0	0	0	0	0	0.0
LE34	1	1	0.5	2	0.5	0	5.0
LE35	1	1	0.5	2	2	1	7.5
LE44	1	1	0	0	0	0	2.0
LE45	1	1	1	2	2	1	8.0
LE48	1	1	0.5	1	1	1	5.5
LE50	0	0	0	0	0	0	0.0
LE52	1	1	0	0	0	1	3.0
LE54	1	1	1	2	1	1	8.0
LE55	1	1	1	2	2	1	8.0
LE56	0	0	0	0	0	0	0.0
LE57	1	1	0	2	0.5	1	5.5
LE58	1	1	0	0	0	0	2.0
LE61	1	1	0	0	0	0	2.0
LE63	1	1	0	0	0.5	0	2.5
LE64	0	0	0.5	0	0	0	0.5
LE65	1	1	0	1	1	0	4.0
LE66	?	?	?	?	?	0.5	0.5?
LE67	1	1	0.5	0.5	1	1	5.0
LE68	0	0	0	0	0	0	0.0
LE69	1	1	0.5	1	2	2	7.5
LE72	0	0	0	0	0	0	0.0
LE73	0	0	0	0	0	0.5	0.5
LE75	1	1	1	1	0	0.5	4.5
LE76	1	1	0.5	1	1	1	5.5
LE78	1	1	0.5	2	2	2	8.5
LE79	1	1	0.5	2	1	0.5	6.0
CU1	1	1	1	2	2	2	9.0
CP1	0	0	1	0	0.5	0	1.5
SM1	0	0	1	0	0	0	1.0
SM2	1	1	0	0	1	0	3.0
CF2	1	1	0.5	2	1	1	6.5
CF3	1	1	0	0	0	0	2.0
CF4	1	1	1	2	2	2	9.0
CF5	1	1	0.5	2	2	1	7.5
CF6	1	1	0	0	0	0	2.0
CF7	1	1	0.5	1	1	1	5.5
CF10	1	1	0.5	2	2	1	7.5
CF11	1	1	0.5	2	2	1	7.5
CF12	1	1	1	1	0.5	1	5.5
CV1	1	1	0.5	1	1	0	4.5
CV2	0	0	0	0	0	0	0.0
CV3	0	0	0	0	0	0	0.0

CEPA	GUA	OA	PR	RBBR	AR44	CV	I _{ALyD}
EM1	0	1	0	0	0	0.5	1.5
EM3	0	0	0	0	0	0	0.0
EM5	10	0	0	0	0	1	2.0
EM6	0	0	0	0.5	0	1	1.5
GA	1	1	1	1	1	0	5.0
LE	1	1	1	2	2	1	8.0
PSP	1	1	0.5	2	2	2	8.5
<i>Pch</i>	1	1	1	1	1	1	6.0
POS	1	1	0	0	0	0	2.0
BAD	1	1	0	0	1	1	4.0

? Resultado indistinguible por pigmentos del aislado

GA *Ganoderma aplanatum*

LE *Lentinus edodes*

PSP *Pleurotus* sp

Pch *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725

POS *Pleurotus ostreatus* ATCC 58053

BAD *Bjerkandera adusta* UAMH 8258

* Resultados de experimentos posteriores a esta tesis

APÉNDICE F

PROTOCOLO DE ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DE GELES DISCONTINUOS DE
POLIACRILAMIDA AL 12% (Garfin, 1990).

Preparación de reactivos de trabajo.

Solución de Acrilamida (30% monómero, 2.7% agente de entrecruzamiento):
Para preparar esta solución se agregaron 29.2 g de acrilamida y 0.8 g de bis-acrilamida a 70 ml de agua bidestilada. Cuando la acrilamida se disolvió por completo, se agregó agua a un volumen final de 100 ml. La solución se filtró a través de una membrana de 0.45 μm aplicando vacío y se almacenó en un frasco oscuro a 4°C.

Amortiguador para Gel de Separación (Tris-Cl 1.5 M, pH 8.8): Se disolvieron 18.2 g de Tris base en aprox. 80 ml de agua y se ajustó el pH a 8.8 con HCl, por último se llevó a un volumen final de 100 ml con agua. Se conservó en refrigeración a 4°C.

Amortiguador para Gel de Concentración de la Muestra (Tris- Cl 0.5 M, pH 6.8): Se disolvieron 6.1 g de Tris base en aproximadamente 80 ml de agua, se ajustó el pH a 6.8 con el HCl, y se agregó agua hasta completar un volumen final de 100 ml. Se conservó en refrigeración a 4°C.

Solución de Dodecil – Sulfato de Sodio al 10% (P/V): Se disolvieron 10 g de SDS en aproximadamente 60 ml de agua y se agregó agua hasta un volumen final de 100 ml.

Amortiguador para Preparación de la muestra (Tris – Cl 0.06 M, pH 6.8, SDS 2%, Glicerol 10%, Azul de Bromofenol 0.025%):

Agua	4.8 ml
Tris- Cl 0.5 M, pH 6.8	1.2 ml
SDS 10%	2.0 ml*
Glicerol	1.0 ml
Azul de Bromofenol 0.5% (p/v en agua)	0.5 ml

El amortiguador para muestras desnaturalizadas se preparó añadiendo 50 μ l de 2-mercaptoetanol a cada 0.95 ml del amortiguador de muestra, antes de usar. Para la desnaturalización se colocaron en baño maría por 4 min a 95°C. * el SDS se omite para muestras nativas.

Persulfato de amonio al 10% (APS 10%): Este catalizador se preparó de nuevo cada vez que se iba a usar, disolviendo 100 mg de Persulfato de Amonio en 1 ml de agua.

TEMED (N,N,N',N'-Tetrametil-etilendiamina): Este catalizador se empleó sin diluir tomándolo directamente del frasco. Su almacenamiento fue en un sitio oscuro, seco y fresco.

Amortiguador de cubeta para la separación electroforética (Tris 0.025 M, Glicina 0.192 M, SDS 0.1% (p/v), pH 8.3): Se elaboró diluyendo 0.3 g de Tris base, 1.4 de glicina y 1 ml de SDS 10% en agua y después de aforar a 100 ml, se confirmó que el pH final fuera 8.3 ± 0.2 , sin ajustarlo. Este amortiguador se puede preparar como un stock concentrado (5x). Consistiendo de 15 g de Tris base, 72 de Glicina y 5 g de SDS por litro. Esta solución se puede almacenar en recipientes de vidrio. Para su uso, se diluye con cuatro partes de agua.

Preparación de los geles.

Geles de separación de Poliacrilamida al 12%. En su elaboración para electroforesis de muestras nativas se omitió el SDS y el 2-mercaptoetanol en el amortiguador de la muestra, así como el tratamiento térmico a 95°C por 4 minutos de las mismas.

Para preparar la solución del monómero para el gel de separación al 12% se mezclaron los reactivos que aparecen en la tabla de abajo, excepto el Persulfato de amonio (APS) y TEMED, que se añadieron hasta que la mezcla fue uniforme y se estaba listo para verter entre los cristales de la cámara de electroforesis. En la tabla se indican cantidades para preparar 10 ml de gel de acrilamida, sin embargo cualquier volumen deseado de la solución puede prepararse usando múltiplos de la fórmula de

10 ml. Después de mezclar los primeros cuatro componentes la polimerización se inició con la adición del persulfato de amonio y el TEMED.

Formulación del Gel de Separación SDS – PAGE al 12%.

Componente	12%
Agua bidestilada	3.35 ml
Tris 1.5 M pH 8.8	2.5 ml
SDS 10%	0.1 ml
Acrilamida /Bis (30% / 2.7%)	4.0 ml
APS 10%	50 µl
TEMED	5 µl

Para 15 ml de gel de separación las cantidades que utilizamos fueron: 5.025 ml Agua bidestilada; 3.75 ml Tris-HCl 1.5 M pH 8.8; 0.050 ml SDS 10%; 6.0 ml Acrilamida/Bis (30%/2.7%); 100µl APS 10% y 10µl TEMED.

Gel de concentración de poliacrilamida al 4%. Para la preparación de 10 ml se mezclaron todos los ingredientes de la tabla siguiente excepto el persulfato de amonio (APS) y TEMED

Formulaciones de Geles de Concentración de la Muestra

Componente	10 ml
Agua bidestilada	6.1 ml
Tris 0.5 M, pH 6.8	2.5 ml
SDS 10%	0.1 ml
Acrilamida / Bis (30%/ 2.7%)	1.3 ml
APS 10%	50 µl
TEMED	5 µl

Carga de carriles, corrida de electroforesis y revelado de bandas protéicas.

Los carriles se cargaron con 20-25 µg de proteína contenidos en una muestra de la fracción retenida por una membrana de 10 kDa montada en el sistema de ultrafiltración AMICON. El primer carril de los geles se cargó con los estándares de peso molecular, los siguientes con muestras desnaturalizadas y los siguientes con muestras nativas para obtener los zimogramas

La electroforesis se realizó a 120 Volts. El Azul de Coomasie al 0.1% disuelto en una solución de 10% ácido acético y 40% Metanol fue utilizado en la tinción de las

bandas de proteína, para lo cual se sumergió el gel en la solución de colorante por una hora, al término de la cual se procedió a desteñir el gel mediante lavados practicados con la misma solución, sin el colorante. El mismo procedimiento se siguió con los zimogramas, sustituyendo el Azul de Coomasie por alguno de los colorantes o sustratos enzimáticos y reduciendo el tiempo de exposición a 30 min.

APÉNDICE G

EFFECTO DECOLORANTE DE MUESTRAS DE SOBRENADANTES DE
CULTIVOS SOBRE DIFERENTES COLORANTES

Efecto decolorante de muestras de sobrenadantes de cultivos sobre diferentes colorantes

En otro ensayo se comparó el desempeño decolorante de muestras de cultivos sumergidos de los dos aislados nativos seleccionados, entre sí y contra dos cepas de referencia y se trató de asociarlo con el tipo de actividad enzimática. Para realizarlo se utilizaron filtrados de cultivos de 14 días desarrollados en medio TK con inductores de actividad (Mn, AV, Cu) y agitación (150 rpm). La actividad tipo Lacasa, MnP y LiP fue medida por espectrofotometría antes del inicio de la determinación de la capacidad decolorante. La capacidad decolorante se registró como el porcentaje de color residual, midiendo la disminución de la absorbancia a lo largo del ensayo, a la longitud de onda máxima registrada para cada colorante. La mezcla de reacción consistió en una solución acuosa del colorante al 0.002% (BK5, AR183, BBR, OII) o al 0.02% (IN, AG27) y 100 µl de muestra de cultivo en un volumen total de tres ml. Las lecturas de absorbancia se tomaron a los tiempos 0, 5, 10, 15, 30, 60, 120 min y 24 h.

Ningún tipo de actividad enzimática fue detectada para la cepa de referencia *P. chrysosporium* y sólo MnP (18.32 Uml⁻¹) para *B. adusta*. En los aislados nativos se registró únicamente lacasa en CS63 (3.20 Uml⁻¹) y ambas lacasa y MnP en LE13 (1.46 y 20.39 Uml⁻¹) y LE95 (0.19 y 7.12 Uml⁻¹). La Tabla XV resume los resultados, los cuales indican que los colorantes BK5, AR183 y BBR fueron decolorados en menos de un 50% por todos los hongos. Las 2 cepas que mejor decoloraron el resto de los colorantes al cabo de una y 24 horas fueron: el AG27 por LE95 (85 y 82%) y LE13 (74 y 74%); el Indigo por LE95 (10 y 94%) y CS63 (54 y 89%); el ABF por LE95 (13 y 58%) y CS63 (15 y 70%); el OII por LE95 (13 y 57%) y LE13 (24 y 87%). En la tabla se han resaltado en color verde los dos valores menores de color residual al término del ensayo y en color amarillo el valor más bajo después de una hora de iniciado el ensayo. Los números rojos al final de las columnas representan el número de veces que el hongo tuvo mejor capacidad decolorante sobre los demás para todos los colorantes.

Por lo que la LE95 fué la más eficiente decolorando bajo estas condiciones, seguida por ambas LE13 y CS63.

Tabla XV. Resultados de decoloración por muestras de cultivos de las cepas de referencia *Bjerkandera adusta* y *Phanerochaete chrysosporium* y de los aislados nativos de LE95, CS63 y LE13 a los tiempos 0, 5, 10, 15, 30, 60, 120 min y 24 h sobre los colorantes AR183, AG27, BBR, IN, ABF, OII y BK5.

Tiempo (min)	LE95	CS63	LE13	LE13	Bad	P ch
	AR183	AR183	AR183	AR183	AR183	AR183
	%residual	%residual	%residual	%residual	%residual	%residual
0	100.00	100.00	100.00	100.06	100.00	100.00
5	99.80	98.81	98.84	97.08	100.00	98.49
10	100.00	97.91	98.84	96.46	100.00	98.42
15	99.28	96.02	98.45	95.83	99.71	98.06
30	97.77	95.72	99.03	93.83	97.76	97.19
60	99.21	93.98	97.62	93.71	99.43	96.90
120	100.00	94.33	96.52	94.68	96.15	97.62
24 h	100.00	98.31	100.00	100.00	100.00	100.00
	AG27	AG27	AG27	AG27	AG27	AG27
	%residual	%residual	%residual	%residual	%residual	%residual
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
5	31.14	62.63	33.40	36.16	94.24	73.06
10	16.69	64.39	33.02	32.57	89.95	66.89
15	15.75	61.62	31.49	30.78	86.49	64.50
30	15.16	65.91	29.58	29.48	84.08	60.73
60	15.39	65.40	28.96	29.64	79.48	59.25
120	14.92	67.17	28.24	36.64	74.87	56.96
24 h	11.75	59.60	26.34	32.52	55.18	42.24
	BBR	BBR	BBR	BBR	BBR	BBR
	%residual	%residual	%residual	%residual	%residual	%residual
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
5	94.39	98.36	99.13	100.00	95.26	97.67
10	90.31	94.95	96.12	99.04	94.35	94.54
15	86.37	92.57	93.43	96.51	92.79	90.39
30	79.13	89.11	89.82	92.01	90.28	86.20
60	74.11	87.14	85.76	88.10	88.95	nd
120	71.66	84.20	80.33	85.21	88.66	79.17
24 h	58.17	79.10	63.21	100.00	84.77	69.31
	Indigo	Indigo	Indigo	Indigo	Indigo	Indigo
	%residual	%residual	%residual	%residual	%residual	%residual
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
5	97.61	89.59	95.98	96.97	98.24	94.44
10	95.34	82.07	91.91	93.59	98.16	93.03
15	94.85	76.27	88.83	91.08	96.60	91.88
30	93.06	65.25	83.22	87.09	96.09	91.41
60	90.16	46.45	71.31	78.01	95.20	90.43
120	83.71	25.53	51.65	65.50	95.70	87.87
24 h	6.38	11.13	16.78	32.11	73.71	34.22
	ABF	ABF	ABF	ABF	ABF	ABF
	%residual	%residual	%residual	%residual	%residual	%residual
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
5	97.20	95.42	100.00	100.00	95.06	99.46
10	95.83	93.54	100.00	100.00	93.50	100.00
15	93.78	91.67	100.00	100.00	92.56	100.00
30	90.70	89.71	100.00	100.00	89.72	97.84
60	87.35	85.21	100.00	100.00	90.19	100.00
120	79.96	70.57	100.00	100.00	88.77	88.41
24 h	41.72	29.80	94.91	100.00	87.28	69.54

	OII %residual	OII %residual	OII %residual	OII %residual	OII %residual	OII %residual
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
5	95.35	90.39	94.25	95.60	96.92	93.42
10	93.36	88.20	91.86	92.85	95.38	91.72
15	92.24	88.20	88.52	90.23	93.77	91.54
30	89.61	87.25	83.67	85.42	92.18	90.10
60	87.35	84.85	76.32	77.55	91.70	87.40
120	83.55	82.20	64.03	65.42	89.95	85.61
24 h	42.55	53.14	12.86	31.36	87.98	79.04
	Black5 %residual	Black5 %residual	Black5 %residual	Black5 %residual	Black5 %residual	Black5 %residual
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
5	96.23	99.68	97.01	95.74	94.05	95.35
10	95.14	99.74	95.13	94.96	92.61	95.00
15	93.80	99.17	93.59	92.79	91.71	93.84
30	92.72	96.97	92.27	91.50	90.47	92.41
60	91.42	95.86	90.89	89.67	90.43	91.71
120	90.21	94.11	88.35	87.80	88.21	90.33
24 h	75.72	84.95	69.53	85.13	81.65	81.50
	7	5	5	4	0	0

LITERATURA CITADA

- Abadulla E, Robra KH, Gubitz GM, Silva LM, Cavaco-Paulo A. 2000. Enzymatic decolorization of textile dyeing effluents. *Textile Research Journal*. 70(5): 409-414.
- Aitken MD. 1993. Waste treatment applications of enzymes: opportunities and obstacles. *The Chemical Engineering Journal*. 52: B49-B58.
- Alanís Flores GJ, Cano y Cano G, Rovalo Merino M. 1996. Vegetación y flora de Nuevo León. Una guía botánico-ecológica. Impresora Monterrey, S. A. de C. V. México. 251 pp.
- Anliker R. 1979. Ecotoxicology of dye stuffs. A joint effort by industry. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 3(1): 59-74.
- Arana A, Téllez A, González T, González A. 2002. Aspectos generales de la biodegradación de la madera: aplicaciones industriales de las lacasas. *Biotecnología*. 7(3): 40-55.
- Arora D. 1985. *Mushrooms Demystified*. Ten Speed Press. Berkeley, CA. USA.
- Asgher M, Kausar S, Bhatti HN, Hassan Shah SA, Ali M. 2008. Optimization of medium for decolorization of Solar golden yellow R direct textile dye by *Schizophyllum commune* IBL-06. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 61(2): 189-193.
- Asgher M, Shah SAH, Ali M, Legge RL. 2006. Decolorization of some reactive textile dyes by white rot fungi isolated in Pakistan. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 22: 89-93.
- Aust SD, Benson JT. 1993. The fungus among us: use of white rot fungi to biodegrade environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives*. 101(3): 232-233.
- Azmi W, Sani RK, Banerjee UC. 1998. Biodegradation of triphenylmethane dyes. *Enzyme and Microbial Technology*. 22: 185-191.

- Babic J, Pavko A. 2007. Production of ligninolytic enzymes by *Ceriporiopsis subvermispota* for decolourization of synthetic dyes. *Acta Chimica Slovenica*. 54(4): 730-734.
- Baiocco P, Barreca, AM, Fabbrini M, Galli C, Gentili P. 2003. Promoting laccase activity towards non-phenolic substrates: a mechanistic investigation with some laccase mediator systems. *Organic Biomolecular Chemistry*. 1: 191-197.
- Balan DSL, Monteiro RTR. 2001. Decolorization of textile indigo dye by ligninolytic fungi. *Journal of Biotechnology*. 89: 141-145.
- Baldrian P. 2004. Increase of laccase activity during interspecific interactions of white-rot fungi. *FEMS Microbiology Ecology*. 50: 245-53.
- Baldrian P. 2006. Fungal laccases occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*. 30: 215-42.
- Banat IM, Nigam P, Singh D, Marchant R. 1996. Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review. *Bioresource Technology*. 58: 217-227.
- Barr DT, Aust SD. 1994. Mechanism white rot use to degrade pollutants. *Environmental Science and Technology*. 28(A): 78-87.
- Beijing RIC Information Consulting Co. Ltd. 2007. China dyestuff Industry Report, 2007-2008. 126 pp. Disponible en el sitio de red: <http://www.researchandmarkets.com/reports/c71113> [Revisado el 10 de Noviembre de 2007].
- Bennet JW, Wunch KG, Faison BD. 2002. Use of fungi biodegradation. In: *Manual of Environmental Microbiology*. Hurst, C. J. (ed). Second Edition. ASM Press. Washington, D. C. Chapter 89: 960-971.
- Bessette AE, Bessette AR, Fischer DW. 1997. *Mushrooms of Northeast North America*. 1st. Edition. Syracuse University Press. 640 pp.
- Bhatt M, Patel M, Rawal B, Novotny C, Molitoris HP, Šašek V. 2000. Biological decolorization of synthetic dye RBBR in contaminated soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 16: 195-198.
- Blanchette RA. 1984. Screening wood decayed by white rot fungi for preferential lignin degradation. *Applied and Environmental Microbiology*. 48 (3): 647-653.

- Bumpus JA, Brock BJ. 1988. Biodegradation of crystal violet by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology. 54: 1143–1150.
- Bumpus JA, Tien M, Eright D, Aust SD. 1985. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. Science. 228: 1434-1436.
- Camarero S, Ibarra D, Martínez MJ, Martínez AT. 2005. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. Applied Environmental Microbiology. 71(4): 1775-1784.
- Camarero S, Sarkar S, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, Matínez AT. 1999. Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. Journal of Biological Chemistry. 274: 10324-10330.
- Cameron MD, Timofeevski S, Aust SD. 2000. Minireview: enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. Applied Microbiology and Biotechnology. 54: 751-758.
- Campos R, Kandelbauer A, Robra KH, Cavaco-Paulo A, Gubitz GM. 2001. Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*. Journal of biotechnology. 89(2/3): 131-139.
- Capalash N, Sharma P. 1992. Biodegradation of textile azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. World Journal of Biotechnology and Biotechnology. 8: 309-312.
- Carlile MJ, Watkinson SC, Gooday GW. 2001. The Fungi. Second edition. Elsevier Academic Press. San Diego, CA., USA. 588 pp.
- Castillo MD, Stenström J, Andler P. 1994. Determination of manganese peroxidase activity with 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone and 3-(dimethylamino) benzoic acid. Analytical Biochemistry. 218(2): 399-404.
- Chagas EP, Durrant LR. 2001. Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajor-caju*. Enzyme Microbiology and Technology. 29: 473-377.
- Chander M, Arora DS, Bath HK. 2004. Biodecolourisation of some industrial dyes by white-rot fungi. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 31(2): 94-97.

- Chen S, Ma D, Ge W, Buswell JA. 2003. Induction of laccase activity in the edible straw mushroom *Volvariella volvacea*. FEMS Microbiology Letters. 218(1): 143-148.
- Chhabra M, Mishra S, Sreerishnan TR. 2008. Mediator-assisted decolorization and detoxification of textile dyes/dye mixture by *Cyathus bulleri* laccase. Applied Biochemistry and Biotechnology. En línea desde Mayo.
- Chivikula M, Renganathan V. 1995. Phenolic azo dye oxidation by laccase from *Pyricularia oryzae*. Applied Environmental Microbiology. 61(12): 4374 – 4377.
- Cho N-S, Shin W, Jeong S-W, Leonowicz A. 2004. Degradation of lignosulfonate by fungal laccase with low molecular mediators. Bulletin of the Korean Chemical Society. 25(10): 1551-1554.
- Chung K-T, Cerniglia CE. 1992. Mutagenicity of azo dyes: structure activity relationships. Mutation Research. 277: 201–220.
- Chung KT, Fulk GE, Egan M. 1978. Reduction of azo dyes by intestinal anaerobes. Applied and Environmental Microbiology. 35(3): 558-562.
- Cifuentes Z, Villegas M, García R, Vidal G, Sierra S, Valenzuela G, Pérez R, Morales E. 2004. Distribución de macromicetos: Una aproximación al análisis de áreas de endemismos. En: Biodiversidad de la Sierra Madre Oriental. Luna I., Morrone J. J. y Espinoza D. (eds). La Prensa de Ciencia, México, D. F. Pp. 355-374.
- Claus H, Faber G, König H. 2002. Redox mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. Applied Microbiology Technology. 59: 672-678.
- Claus H, Filip Z. 1997. The evidence of a laccase-like enzyme activity in a *Bacillus sphaericus* strain. Microbiological Research. 152:209–216.
- Cohen R, Persky L, Hadar Y. 2002. Biotechnological applications and potential of Wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. Applied Microbiology and Biotechnology. 58(5): 582-594.
- Conneely A, Smith WF, McMullan G. 2002. Study of the white-rot fungal degradation of selected phtalocyanine dyes by capillary electrophoresis and liquid chromatography. Analytica Chimica Acta. 451: 259-270.
- Cookson LJ. 1995. Reliability of Poly B-411, a polymeric anthraquinone-based dye, in determining the rot type caused by wood-inhabiting fungi. Applied and Environmental. Microbiology. 61(2): 801-803.

- Coonely A, Smyth WF, McMullan G. 1999. Metabolism of the phtalocyanine textile dye remazol turquoise blue by *Phanerochaete chrysosporium*. FEMS Microbiological Letters. 179: 333-337.
- Couto SR, Rivela I, Muñoz MR, Sanromán A. 2000. Stimulation of ligninolytic enzyme production and the ability to decolorize Poly R-478 in semisolid state cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. Bioresource Technology. 74: 159-164.
- Cripps C, Bumpus JA , Aust SD. 1990. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology. 56: 1114–1118.
- d'Acunzo F, Galli C, Masci B. 2002. Oxidation of phenols by laccase-mediator systems. Solubility and steric issues. European Journal of Biochemistry. 269: 5330-5335.
- Devore G, Muñoz Peña E. 1969. Química orgánica. Publicaciones Cultural, S. A. México. Capítulo 58. Pp. 644-651.
- Dhouib A, Hamza M, Zouari H, Mechichi T, H'midi R, Labat M, Martínez MJ, Sayadi S. 2005. Autochthonous fungal strains with high ligninolytic activities from Tunisian biotopes. African Journal of Biotechnology. 4 (5): 431-436.
- Dhuinnshleibhe LS. 2000. *A brief history of dyestuffs and dyeing*. Conference presented at Runestone Collegium, 19 Feb. [internet]. (c) 2000 H. McCloy. Disponible en el sitio de red: <http://kws.atlantia.sca.org/dyeing.html> [Revisado el 14 de Agosto de 2005].
- Diccionario enciclopédico Quillet. 1973. Tomo Segundo. B - Compraventa. Ed. Argentina Arístides Quillet, S. A. Buenos Aires. Pp. 607-608.
- Dong JL, Zhang YW, Zhang RH, Huang WZ, Zhang YZ. 2005. Influence of cultura conditions on laccase production and isozyme patterns in the white-rot fungus *Trametes gallica*. Journal of Basic Microbiology. 45(3): 190-198.
- D'Sousa TM, Merritt CS, Reddy CA. 1999. Lignin-Modifying Enzymes of the White Rot Basidiomycete *Ganoderma lucidum*. Applied and Environmental Microbiology. 65(12): 5307–5313.
- D'Souza TM, Boominathan K, Reddy CA. 1996. Isolation of laccase gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR. Applied and Environmental Microbiology. 62: 3739–3744.

- Eaton DC, Chang H-M, Kirk TK. 1980. Decolorization of kraft bleach plant effluents. *Tappi Journal*. 63: 103-106.
- Eggert C, Temp U, Ericksson KE. 1996. The ligninolytic system of the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*, purification and characterization of the laccase. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 1151-1158.
- Erkurt EA, Ünyayara A, H Kumbura. 2007. Decolorization of synthetic dyes by white rot fungi, involving laccase enzyme in the process. *Process Biochemistry*. 42(10): 1429- 1435.
- Fergus CL. 1960. *Illustrated genera of Wood decay fungi*. Burgess Publishing Co. Minn. USA. 132 p.
- Field JA, de Jong E, Feijoo-Costa G, de Bont JAM. 1993. Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Trends in Biotechnology*. 11(2): 44–49.
- Fu YZ, Viraraghavan T. 2001. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. *Bioresource Technology*. 79:251–62.
- Galhaup C, Wagner H, Hinterstoisser B, Haltrich D. 2002 Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme and Microbial Technology*. 30(4): 529-536.
- Galliano H, Gas G, Series JL, Boudet A. M. 1991. Lignin degradation by *Rigidoporus lignosus* involves synergistic action of two oxidizing enzymes Mn peroxidase and laccase. *Enzyme and Microbial Technology*. 13 (6): 478–482.
- Gandolfi Boer C, Obici L, Giatti Marques de Souza C, Peralta RM. 2004. Decolorization of synthetic dyes by solid state cultures of *Lentinula (Lentinus) edodes* producing manganese peroxidase as the main ligninolytic enzyme. *Bioresource Technology*. 94(2): 107-112.
- Garg SK, Modi DR. 1999. Decolorization of pulp-paper mill effluents by white rot fungi. *Critical Reviews in Biotechnology*. 19(2): 85-112.
- Gerhardt E, Avila J, Limona X. 2000. *Hongos de España y de Europa*. Ediciones Omega, S. A. Barcelona, España. 957 pp.
- Gianfreda L, Xu F, Bollag J-M. 1999. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal*. 3: 1–25.
- Gilbertson RL. 1980. Wood-rotting fungi of North America. *Mycologia*. 72: 1-49.

- Gill PK, Arora DS, Chander M. 2001. Biodecolourization of azo and triphenylmethane dyes by *Dichomitus squalens* and *Phlebia* spp. *Journal of Industrial Microbiology and Technology*. 28: 201-203.
- Glenn JK, Morgan MA, Mayfield MB, Kuwahara M, Gold MH. 1983. An extracellular H₂O₂ requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 114: 1077-1083.
- Glenn JK, Gold MH. 1983. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 45: 1741-1747.
- Glenn JK, Gold MH. 1985. Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 242: 329-341.
- Gogna E, Vohra R, Sharma P. 1992. Biodegradation of rose-bengal by *Phanerochaete chrysosporium*. *Letters in applied Microbiology*. 14(2): 58-60.
- Gold MH, Glenn JK, Alic M. 1988. Use of polymeric dyes in lignin biodegradation assays. *Methods in Enzymology*. 161: 74-78.
- Gomaa OM, Linz JE, Reddy CA. 2008. Decolorization of Victoria blue by the white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* en <http://www.springerlink.com/content/t03112516456q154/>
- Greene RV, Gould JM. 1986. H₂O₂-dependent decolorization of Poly R-481 by particulate fractions from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 136: 220-227.
- Guarro J, Gene J, Stchigel AM. 1999. Developments in Fungal Taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*. 12(3): 454-500.
- Gutiérrez Soto, JA. 2004. Aislamiento y selección de cepas nativas de basidiomicetos ligninolíticos con capacidad de degradar colorantes sintéticos. Tesis inédita carrera de Químico Bacteriólogo Parasitólogo. FCB, UANL. 73 pp.
- Guzmán G. 1978. Identificación de los hongos. Comestibles, venenosos y alucinantes. Ed. LIMUSA, S. A. México. 2ª. Reimpresión. 450 pp.

- Guzmán G. 1998. Inventorying the fungi of Mexico. *Biodiversity and Conservation*. 7(3): 369-384.
- Guzmán G. 2003. Los hongos de El Edén Quintana Roo (Introducción a la micobiota tropical de México). 1ª. Ed. Instituto de Ecología, A. C. y CONABIO. Xalapa, Ver. México. 316 pp.
- Hao O, Kim JH, Chiang P-C. 1999. Decolorization of wastewater. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 30(4): 449-505.
- Harazono K, Watanabe Y, Nakamura K. 2003. Decolorization of azo dye by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete sordida* and by its manganese peroxidase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 95: 455-459.
- Harkin JM, Obst JR. 1973. Syringaldazine, an effective reagent for detecting laccase and peroxidase in fungi. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 29(4): 381-387).
- Hass H, Taylor TN, Remy W. 1994. Fungi from the Lower Devonian Rhynie Chert - mycoparasitism. *American Journal of Botany* 81: 29-37.
- Hatakka A. 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiological Reviews*. 13: 125-135.
- Hatvani NE, Mécs I. 2002. Effect of the nutrient composition on dye decolorisation and extracellular enzyme production by *Lentinus edodes* on solid medium. *Enzyme and Microbial Technology*. 30: 381-386.
- Hawksworth DL. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*. 95: 641-655.
- Hawksworth DL, Kirk PM, Sutton BC, Plegler DN. 1995. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi. 8ª. Ed. IMI, CAB. Surrey. 616 p.
- Heinfling A, Bergbauer M, Szewzyk U. 1997. Biodegradation of azo and phthalocyanine dyes by *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 48: 261-266.
- Heinfling A, Martínez MJ, Martínez AT, Bergbauer M, Szewzyk U. 1998a. Purification and characterization of peroxidases from the dye decolorizing fungus *Bjerkandera adusta*. *FEMS Microbiological Letters*. 165: 43-50.
- Heinfling A, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, Bergbauer H, Szewzyk U, Martínez AT. 1998b. A study on reducing substrates of manganese-oxidizing peroxidases from *Pleurotus eringy* and *Bjerkandera adusta* *FEBS Lett*. 428: 141-146.

- Hernández-Luna CE, Gutiérrez-Soto G, Salcedo-Martínez SM. 2008. Screening and selection of ligninolytic basidiomycetes with decolorizing ability in Northeast Mexico. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24: 465-473.
- Higson FK. 1991. Degradation of xenobiotics by white rot fungi. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 122: 111-152.
- Hoegger PJ, Kilaru S, James TY, Thacker JR, Kues U. 2006. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase proteins. *FEBS Journal*. 273: 2308-2326.
- Hofrichter M. 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*. 30: 454-466.
- INEGI 2001. XV Censo Industrial. Censos Económicos 1999. Industrias manufactureras subsector 32. Producción de textiles, prendas de vestir e industria del cuero. Productos y materias primas. ISBN 970-13-3334-9. INEGI. México. 121 pp.
- Itho K, Kitade Y, Yatome C. 1998. Oxidative biodegradation of an anthraquinone dye, pigment violet 12, by *Coriolus versicolor*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 60: 786-790.
- Jaouani A, Sayadi S, Vanthournhout M, Penninckx MJ. 2003. Potent fungi for decolourisation of olive oil mill wastewaters. *Enzyme and Microbial Technology* 33: 802-809.
- Jarosz-Wilkolazka A, Kochmanska-Rdest J, Malarczyk E, Wardas W, Leonowicz A. 2002. Fungi and their ability to decolourize azo and anthraquinonic dyes. *Enzyme and Microbial Technology*. 30: 566-572.
- Jordaan J, Leukes W.D. 2003 Isolation of a thermostable laccase with DMAB and MBTH oxidative coupling activity from a mesophylic white rot fungus. *Enzyme and Microbial Technology*. 33(2): 212-219.
- Jordan M. 1995. *The encyclopedia of fungi of Britain and Europe*. David & Charles. Devon, UK. 384 pp.
- Junghansa C, Kraussa G, Schlosse D. 2008. Potential of aquatic fungi derived from diverse freshwater environments to decolourise synthetic azo and anthraquinone dyes. *Bioresource Technology*. 99(5): 1225-1235.
- Kamida HM, Durrant LR, Monteiro RTR, Armas ED. 2005. Biodegradação de efluente têxtil por *Pleurotus sajor-caju*. *Química Nova*. 28(4): 629-632.

- Kapdan IK, Kargi F, McMullan G, Marchant R. 2000a. Biological decolorization of textile dyestuff by *Coriolus versicolor* in a packed column reactor. *Environmental Technology*. 21: 231–236.
- Kapdan IK, Kargi, F, McMullan G, Marchant R. 2000b. Comparison of white-rot fungi cultures for decolorization of textile dyestuffs. *Bioprocess Engineering*. 22: 347-351.
- Kariminiaae-Hamedani H-R , Sakurai A, Sakakibara M. 2007. Decolorization of synthetic dyes by a new manganese peroxidase-producing white rot fungus. *Dyes and pigments*. 72(2): 157-162.
- Kasinath A, Novotný Č, Svobodová K, Patel KC, Šašek V. 2003. Decolorization of synthetic dyes by *Irpex lacteus* in liquid cultures and packed-bed bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology*. 32: 167-173.
- Khan B. 2003. Microbial decolorization of triphenylmethane dyes. Master in Science Thesis in Biotechnology. Thapar Institute of Engineering and Technology. Deemed University. Punjab, India. 36 pp.
- Khaira H, Madamwar D. 2002. Transformation of textile dyes by white rot fungus *Trametes versicolor*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 102: 99-108.
- Kersten PJ, Kalyanaraman B, Hammel KE, Reinhammar B, Kirk TK. 1990. Comparison of lignin peroxidase, horseradish peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzenes. *Biochemical Journal*. 268: 475-480.
- Kiiskinen L-L, Viikari L, Kruus K. 2002. Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59:198–204.
- Kim SJ, Shoda M. 1999. Decolorization of molasses and a dye by a newly isolated strain of the fungus *Geotrichum candidum* Dec. 1. *Biotechnology and Bioengineering*.62: 114-119.
- Kim SJ, Ishikawa K, Hirai M, Shoda M. 1995. Characteristics of a newly isolated fungus, *Geotrichum candidum* Dec 1, which decolorizes various dyes. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 79: 601-607.
- Kirby N, Mc Mullan G, Marchant R. 1995. Decolorization of an artificial textile effluent by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology Letters*. 17(7): 761-764.

- Kirby N, Marchant R, McMullan G. 2000. Decolourisation of synthetic textile dyes by *Phlebia tremellosa*. FEMS Microbiology Letters 188 (1): 93–96.
- Kirk P.M, Cannon PF, David JC, Stalpers JA. 2001. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi (9th Ed.). CAB International, Wallingford, United Kingdom. ISBN 0 85199 377X. 655p.
- Kirk TK. 1987. Enzymatic 'combustion': the microbial degradation of lignin. Ann. Rev. Microbiol. 41: 465–505.
- Kirk TK, Cowling EB. 1984. Biological decomposition of wood. In: Rowell R.M. (ed). The chemistry of solid wood. Advances in chemistry series 207. Washington, D. C. American Chemical Society. Chapter 12: 455-487.
- Kirk TK, Chang H-M. 1981. Potential applications of bioligninolytic systems. Enzyme and Microbial Technology. 3: 189-196.
- Kling SH, Neto JSA. 1991. Oxidation of methylene blue by crude lignin peroxidase from *P. chrysosporium*. Journal of Biotechnology. 21: 618-620.
- Kirk TK, Farrell RL. 1987. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. Annual Review of Microbiology. 41: 465–505.
- Klonowska A, Gaudin C, Fournel A, Asso M, Le Petit J, Giorgi M, Tron T. 2002. Characterization of a low redox potential laccase from the basidiomycete C30. Eur. J. Biochem. 269: 6119–6125.
- Knapp JS, Newby PS, Reece LP. 1995. Decolorization of dyes by wood-rotting basidiomycete fungi. Enzyme and Microbial Technology 17: 664-668.
- Knapp JS, Newby PS. 1999. The decolourisation of a chemical industry effluent by white rot fungi. Water Research. 33(2): 575-577.
- Koduri RS, Tien M. 1995. Oxidation of guaiacol by lignin peroxidase role of veratryl alcohol. The Journal of Biological chemistry. 270(38): 22254-22258.
- Koroljova-Skorobogat'ko OV, Stepanova EV, Gavrilova VP, Morozova OV, Lubimova NV, Dzchafarova AN, Jaropolov AI, Makower A. 1998. Purification and characterization of the constitutive form of laccase from the basidiomycete *Coriolus hirsutus* and effect of inducers on laccase synthesis. Biotechnology and Applied Biochemistry. 28: 47–54.
- Laing IG. 1991. The impact of effluent regulations on the dyeing industry. Review and Progress in Coloration. 21: 56–71.
- Largent DL, Baroni TJ. 1988. How to identify mushrooms to genus VI: Modern genera. Mad River Press, Inc. Eureka, Calif. USA. 277 pp.

- Lee J. 1997. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology*. 56: 1–24
- Leonowicz A, Matuszewska A, Luterek J, Ziegenhagen D, Wojtas-Wasilewska M, Cho N-S, Hofrichter M, Rogalski J. 1999. Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 27: 175-185.
- Leonowicz A, Cho N-S, Luterek J, Wilkolazka A, Wojtas-Wasilewska M, Matuszewska A, Hofrichter M, Wesenberg D, Rogalski J. 2001. Fungal laccase: properties and activity on lignin. *Journal of Basic Microbiology*. 41: 185–227.
- Levin L, Forchiassin F. 2001. Ligninolytic Enzymes of the White Rot Basidiomycete *Trametes trogii*. *Acta Biotechnologica*. 21(2): 179-186.
- Levin L, Forchiassin F, Viale A. 2005. Ligninolytic enzyme production and dye decolorization by *Trametes trogii*: application of the Plackett–Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. *Process Biochemistry*. 40(3/4): 1381-1387.
- Levin L, Forchiassin F, Ramos AM. 2002. Copper induction of lignin-modifying enzymes in the white rot fungus *Trametes trogii*. *Mycologia*. 94(3): 377-383.
- Levin L, Papinutti L, Forchiassin F. 2004. Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. *Bioresource Technology*. 94: 169-176.
- Li K, Xu F, Eriksson K-EL. 1999. Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(6): 2654-2660.
- Lindequist U, Niedermeyer THJ, Jülich W-D. 2005. The pharmacological potential of mushrooms. *eCAM*. 2(3): 285-299.
- Lodge DJ, Ammirati JF, O'Dell TE, Mueller GM. 2004. Collecting and describing macrofungi. In: Mueller, G. M., G. F. Bills and M. S. Foster (Eds.) *Biodiversity of Fungi. Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier Academic Press. San Diego, CA, USA: Pp. 132-141.
- López C, Moreira MT, Feijoo G, Lema JM. 2004. Dye decolorization by manganese peroxidase in an enzymatic membrane bioreactor. *Biotechnology Progress*. 20(1): 74-81.

- Lorenzo M, Moldes D, Rodríguez Couto S, Sanromán MaA. 2005. Inhibition of laccase activity from *Trametes versicolor* by heavy metals and organic compounds. *Chemosphere*. 60(8): 1124-1128.
- Lu L, Zhao M, Zhang B-B, Yu S-Y; Bian X-J, Wang W, Wang Y. 2007. Purification and characterization of laccase from *Pycnoporus sanguineus* and decolorization of an anthraquinone dye by the enzyme. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 74(6): 1232-1239.
- Machado KMG, Matheus DR, Bononi VLR. 2005. Ligninolytic enzymes production and remazol brilliant blue R decolorization by tropical Brazilian basidiomycetes fungi. *Brazilian Journal of Microbiology*. 36: 246-252.
- Machado KMG, Compart LCA, Morais RO, Rosa LH, Santos MH. 2006. Biodegradation of reactive textile dyes by basidiomycetous fungi from Brazilian ecosystems. *Brazilian Journal of Microbiology*. 37(4): 481-487.
- Mansur M, Suarez T, Fernandez-Larrea JB, Brizuela MA, Gonzalez AE. 1997. Identification of a laccase gene family in the new lignin-degrading basidiomycete CECT 20197. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 2637-2646.
- Marmolejo JG. 2007. Hongos causantes de pudrición blanca en pinos en Nuevo León con especial referencia a *Phellinus pini*. En: Tópicos selectos de botánica 3. González Alvarez M. y Salcedo Martínez S. M. (eds). Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, México. Pp. 113-116.
- Martins MAM, Ferreira IC, Santos IM, Queiroz MJ, Lima N. 2001. Biodegradation of bioaccessible azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biotechnology*. 89:91-98.
- Martins MAM, Lima N, Silvestre AJD, Queiroz MJ. 2003. Comparative studies of fungal degradation of single or mixed bioaccessible reactive azo dyes. *Chemosphere*. 52: 967-973.
- Martínez AT, Speranza M, Ruiz-Dueñas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillén F, Martínez MJ, Gutiérrez A, del Río JC. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*. 8: 195-204.
- Marton J, Stern AM, Marton T. 1969. Decolourization of kraft black liquor with *Polyporus versicolor*, a white-rot fungus. *Tappi Journal*. 53: 1975-1981.

- Maximo C, Maria TPA, Costa-Ferreira M. 2003. Biotransformation of industrial reactive azo dyes by *Geotrichum* sp CCMI 1019. *Enzyme and Microbial Technology*. 32: 145-151.
- Mayer AM. 1987. Polyphenol oxidases in plants-Recent Progress. *Phytochemistry*. 26, 11-20.
- Mayer AM. 2006. "Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review". *Phytochemistry* 67: 2318-2331.
- Mayer AM, Staples RC. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60: 551-565.
- McCann J, Ames BN. 1975. Detection of carcinogens and mutagens in the *Salmonella*/microsome test. Assay of 300 chemicals: discussion. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 73:950-954.
- McMullan G, Meehan C, Conneely A, Kirby N, Robinson T, Nigam P, Banat IM, Marchant R, Smyth WF. 2001. Microbial decolorisation and degradation of textile dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 56: 81-87.
- Mester T, Tien M. 2000. Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 46: 51-59
- Metzler S, Metzler V. 1992. *Texas mushrooms a field guide*. First Edition. The Univ. of Texas Press. Austin, Tx. USA. 350 pp.
- Michaels GB, Lewis DL. 1985. Sorption and toxicity of azo and triphenylmethane dyes to aquatic microbial populations. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 4: 45-50
- Mielgo I, Moreira MT, Feijoo G, Lema JM. 2001. A packed bed fungal bioreactor for the continuous decolorisation of azo-dyes (Orange II). *Journal of Biotechnology*. 89: 99-106.
- Mielgo I, López C, Moreira MT, Feijoo G, Lema JM. 2003. Oxidative degradation of azo dyes by manganese peroxidase under optimized conditions. *Biotechnology Progress*. 19(2): 325-331.
- Millis CD, Cai D, Stankovich MT, Tien M. 1989. Oxidation-reduction potentials and ionization states of extracellular peroxidases from the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry*. 28. 8484.

- Minussi RC, Moraes SG, Pastore GM, Durán N. 2001. Biodecolorization screening of synthetic dyes by four white-rot fungi in a solid medium: possible role of siderophores. *Letters in Applied Microbiology*. 33: 21-25.
- Miyata N, Iwahori K, Fujita M. 1998. Manganese-independent and dependent decolorization of melanoidins by extracellular hydrogen peroxide and peroxidases from *Coriolus hirsutus* pellets. *Journal of Fermentation Bioengineering*. 85: 550-553.
- Moldes D, Rodríguez Couto S, Cameselle C, Sanromán MA. 2003. Study of the degradation of dyes by MnP of *Panerochaete chrysosporium* produced in a fixed-bed bioreactor. *Chemosphere*. 51(4): 295-303.
- Moreira MT, Mielgo I, Feijoo G, Lema JM. 2000. Evaluation of different fungal strains in the decolourisation of synthetic dyes. *Biotechnology Letters* 22(18): 1499–1503.
- Mougin C, Kollmann A, Jolivalt C. 2002. Enhanced production of laccase in the fungus *Trametes versicolor* by the addition of xenobiotics. *Biotechnology Letters*. 24: 139–42.
- Mouso N, Diorio L, Forchiassin F. 2007. Acción de *Stereum hirsutum* (Wild) Pers. en la degradación de colorantes. *Revista Iberoamericana de Micología*. 24: 294-298
- Nerud F, Misurkova Z. 1996. Distribution of ligninolytic enzymes in white rot fungi. *Folia Microbiologica*. 41:264-266.
- Nigam P, Armour G, Banat IM, Singh D, Marchant R. 2000. Physical removal of textile dyes and solid state fermentation of dye-adsorbed agricultural residues. *Bioresource Technology*. 72: 219-226.
- Nigam P, Banat IM, Singh D, Marchant R. 1996. Microbial process for the decolorization of textile effluent containing azo, diazo and reactive dyes. *Process Biochemistry*. 31: 435-442.
- Novotný Ć, Rawal B, Bhatt M, Patel M, Šašek V, Molitoris HP. 2001. Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. *Journal of Biotechnology*. 89: 113-122.
- Nyanhongo GS, Gomes J, Gübitz GM, Zvauya R, Read J, Steiner W. 2002. Decolorization of textile dyes by laccases from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Water Research*. 36(6): 1449-1456.
- Okino., L. K., K. M. G. Machado, C. Fabris V. L. Bononi R. 2000. Ligninolytic activity of tropical

- rainforest basidiomycetes. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 16: 889-893.
- Nyanhongo GS, Gübitz G, Sukyai P, Leitner C, Haltrich D, Ludwig R. 2007. Oxidoreductases from *Trametes* spp. in biotechnology: A wealth of catalytic activity. *Food Technology and Biotechnology*. 45(3): 250-268.
- Øllgaard H, Frost L, Galster J, Hansen OC. 1998. Survey of azocolorants in Denmark: Consumption, use, health and environmental aspects. Ministry of Environment and Energy. Denmark. XX: 147-343.
- Ollikka P, Alhonmaki K, Leppanen V-M, Glumoff T, Rajola T, Suominen I. 1993. Decolorization of azo, triphenylmethane, heterocyclic and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(12): 4010-4016.
- O'Neill C, Hawkes FR, Hawkes DL, Lourenço ND, Pinheiro HM, Delée W. 1999. Colour in textile effluents-sources, measurement, discharge consents and simulation: a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 74(11): 1009-1018.
- Overholts LO. 1967. The polyporaceae of the United States, Alaska and Canada. The University of Michigan Press. Ann Arbor. USA. 466 pp.
- Pasti-Grigsby MB, Paszczynski A, Goszczynski S, Crawford DL, Crawford RL. 1992. Influence of Aromatic Substitution Patterns on Azo Dye Degradability by *Streptomyces* sp. and *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Environmental Microbiology*. 58: 3605-3613.
- Paszczynsk A, Crawford RL. 1995. Potential for bioremediation of xenobiotic compounds by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology Progress*. 11 (1995) 368–379.
- Paszczynski A, Crawford RL. 2000. Recent advances in the use of fungi in environmental remediation and biotechnology. *Soil Biochemistry*. 10: 379-422.
- Paszczynski A, Pasti MB, Goszczynski S, Crawford DL, Crawford RL. 1991. New approach to improve degradation of recalcitrant azo dyes by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme and Microbial Technology*. 13: 378–384.

- Paszczynski, A, Pasti-Grigsby MB, Goszczynski S, Crawford RL, Crawford DL. 1992. Mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanilic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 3598-3604.
- Paszczynski A, Huynh VB, Crawford R. 1986. Comparison of ligninase-I and peroxidase-M2 from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives in Biochemistry and Biophysics*. 244: 750-765.
- Peláez F, Martínez MJ, Martínez AT. 1995. Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. *Mycological Research*. 99: 37-42.
- Peralta Zamora P, Pereira CM, Tiburtius ERL, Moraes SG, Rosa MA, Minussi RC, Duran N. 2003. Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase. *Applied Catalysis B-Environmental*. 42(2): 131-144.
- Pereira-Chagas R, Durrant LR. 2001. Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju*. *Enzyme and Microbial Technology*. 29: 473-477.
- Pérez J, Muñoz-Dorado J, de la Rubia T, Martínez J. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*. 5: 53-63.
- Phillips R. 2005. *Mushrooms and other fungi of North America*. Firefly Books. 2nd. Printing. Buffalo, NY, USA: 319 pp.
- Pickard MA, Vandertol H, Roman R, Vazquez-Duhalt R. 1999. High production of ligninolytic enzymes from white rot fungi in cereal bran liquid medium. *Canadian Journal of Microbiology*. 45(7): 627-631.
- Pierce J. 1994. Colour in textile effluents – the origins of the problem. *Journal of the Society of Dyers and Colourists*. 110: 131-134.
- Platt MW, Hadar Y, Chet I. 1985. The decolorization of the polymeric dye Poly-Blue (polyvinylamine sulfonate-anthroquinone) by lignin-degrading fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 21: 394–396.
- Podgornik H, Poljansek I, Perdih A. 2001. Transformation of indigo carmine by *Phanerochaete chrysosporium* ligninolytic enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*. 29: 166-172.
- Pointing SB. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57: 20–33.

- Pointing SB, Vrijmoed LLP. 2000. Decolorization of azo and triphenylmethane dyes by *Pycnoporus sanguineus* producing laccase as the sole phenoloxidase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 16(3): 317-318.
- Pointing SB, Bucher VVC, Vrijmoed LLP. 2000. Dye decolorization by sub-tropical basidiomycetous fungi and the effect of metals on decolorizing ability. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 16(2): 199-205.
- Prewitt ML, Diehl SV, McElroy TC, WJ Diehl. 2008. Comparison of general fungal and basidiomycete-specific ITS primers for identification of wood decay fungi. *Forest Products Journal*. 58(4): 66-71.
- Rabinovich ML, Bolota AV, Vasil'chenko LG. 2004. Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 40(1): 1-17.
- Raghkumar C. 2000. Fungi from marine habitats: an application in bioremediation. *Mycology Research*. 104 (10): 1222-1226.
- Ramsay JA, Mok WHW, Luu Y-S, Savage M. 2005. Decoloration of textile dyes by alginate-immobilized *Trametes versicolor*. *Chemosphere*. 61: 956-964.
- Ramsay JA, Nguyen T. 2002. Decoloration of textile dyes by *Trametes versicolor* and its effects on dye toxicity. *Biotechnology Letters*. 24: 1757-1761.
- Reddy CA. 1995. The potential of white rot fungi in the treatment of pollutants. *Current Opinion in Biotechnology*. 6: 320-328.
- Reinhammar BRM. 1972. Oxidation-reduction potentials of the electron acceptors in laccases and stellacyanin. *Biochimica and Biophysica Acta*. 275, 245-259.
- Reinhammar BRM, Vänngård T. 1971. The electron-accepting sites in *Rhus vernicifera* laccase as studied by anaerobic oxidation-reduction titrations. *European Journal of Biochemistry*. 18, 463-468.
- Remy W, Taylor TN, Hass H. 1994a. Early Devonian fungi - a blastocladalean fungus with sexual reproduction. *American Journal of Botany* 81: 690-702.
- Remy W, Taylor TN, Hass H, Kerp H. 1994b. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 91:11841-11843.
- Revankara MS, Lele SS. 2007. Synthetic dye decolorization by white rot fungus, *Ganoderma* sp. WR-1. *Bioresource Technology*. 98(4): 775-780.

- Robinson T, McMullan G, Marchant R, Nigam P. 2001. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology*. 77(3): 247-255.
- Robinson T, Chandran B, Nigam P. 2002 a. Removal of dyes from an artificial textile dye effluent by two agricultural waste residues, corncob and barley husk. *Environment International*. 28(1/2): 29-33.
- Robinson T, Chandran B, Nigam P. 2002 b. Removal of dyes from a synthetic textile dye effluent by biosorption on apple pomace and wheat straw. *Water research*. 36 (11): 2824-2830.
- Rodríguez Couto S. 2007. Laccase from *Trametes hirsuta* grown on paper cuttings: application to synthetic dye decolorization at different pH values. *Engineering in Life Sciences*. 7(3): 229 – 234.
- Rodríguez E, Pickard MA, Vazquez-Duhalt R. 1999. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Current Microbiology*. 38: 27-32.
- Rogalski J, Lundell TK, Leonowicz A. 1991 Influence of aromatic compounds and lignin on production of ligninolytic enzymes by *Phlebia radiata*. *Phytochemistry*. 30: 2869-2872.
- Ryvarden, L. 1991. Genera of Polypores. Nomenclature and taxonomy. *Synopsis fungorum* 5. Fungiflora, Oslo, 363 pp.
- Salcedo Martínez SM, González Álvarez M, García Alvarado JS, Gutierrez Soto JG, Cortina Sánchez I, Hernández Luna CE. 2007. Formación de una colección de hongos nativos del noreste de México y exploración de su potencial socioeconómico. En: *Tópicos selectos de botánica* 3. González Alvarez M. y Salcedo Martínez S. M. (eds). Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, México. Pp. 183-196.
- Sam M, Yesilada O. 2001. Decolorization of Orange II dye by white rot fungi. *Folia Microbiologica*. 46:143-145.
- Sánchez-López MI, Vanhulle SF, Mertens V, Guerra G, Figueroa SH, Decock C, Corbisier A-M, Penninckx MJ. 2008. Autochthonous white rot fungi from the tropical forest: Potential of Cuban strains for dyes and textile industrial effluents decolourisation. *African Journal of biotechnology*. 7(12):1983-1990.
- Sathiya Moorthi P, Periyar Selvam S, Sasikalaveni A, Murugesan K, Kalaichelvan PT. 2007. Decolorization of textile dyes and their effluents using white rot fungi. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 6 (4): 424-429.

- Sayadi S, Ellouz R. 1993. Screening of white rot fungi for the treatment of olive mill waste- waters. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 57: 141-146.
- Schliephake K, Lonergan GT. 1993. Laccase variation during dye decolourisation in a packed-bed bioreactor. *Biotechnology Letters*. 18: 881–886.
- Schliephake K, Mainwaring DE, Lonergan GT, Jones IK, Baker WL. 2000. Transformation and degradation of the disazo dye Chicago Sky Blue by a purified laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Enzyme and Microbial Technology*. 27(1/2): 100-107.
- Schmidt O. 2006. Wood and tree fungi. Biology, damage, protection and use. Springer. Berlin. Heidelberg, NY. 314 pp.
- Schoemaker HE. 1990. On the chemistry of lignin degradation. *Recl. Travails Chimiques. Pays-Bas Belgium*. 109: 255-272.
- Selvam K, Swaminathan K, Chae K. 2003. Decolourization of azo dyes and a dye industry effluent by a white rot fungus *Thelephora* sp. *Bioresource Technology* 88:115-119.
- Shah V, Nerud F. 2002. Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization. *Canadian Journal of Microbiology*. 48: 857-870.
- Shin KS, Oh IK, Levanon D. 1997. Production and purification of Remazol Brilliant Blue R decolorizing peroxidase from the culture filtrate of *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 1744-1748.
- Shin M, Nguyen T, Ramsay J. 2002. Evaluation of support materials for the surface immobilization and decoloration of Amaranth by *Trametes versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60: 218–223.
- Shleev S, Christenson A, Serezhenkov V, Burvaev D, Yaropolov A, Gorton L, Ruzgas T. 2005. Electrochemical redox transformations of T1 and T2 copper sites in native *Trametes hirsuta* laccase at gold electrode. *Biochemistry Journal*. 385: 745–754.
- Szklarz GD, Antibus RK, Sinsabaugh RL, Linkins AE. 1989. Production of phenol oxidases and peroxidases by wood rotting fungi. *Mycology*. 8:234-240.
- Soares GMB, Costa-Ferreira M, Pessoa de Amorim MT. 2001. Decolorization of an anthraquinone-type dye using a laccase formulation. *Bioresource Technology*. 79(2): 171-177.

- Spadaro JT, Gold MH, Renganathan V. 1992. Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 2397-2401.
- Spadaro JT, Renganathan V. 1994. Peroxidase catalyzed oxidation of azo dyes: mechanism of disperse yellow 3 degradation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 312: 301-307.
- Saparrat MCN, Martínez MJ, Cabello MN, Arambarri AM. 2002. Screening for ligninolytic enzymes in autochthonous fungal strains from Argentina isolated from different substrata. *Revista Iberoamericana de Micología*. 19:181-185.
- Saparrat MCN, Arambarri AM, Balatti PA. 2007. Growth and extracellular laccase production in liquid cultures of *Minimidochium parvum* LPSC # 548 Strain. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. 42 (1-2): 39 - 44.
- StainsFile. 2005. *Comparison of dye structure*. [internet]. Disponible en el sitio de red: <http://stainsfile.info/StainsFile/dyes/class/clscomp.htm>
[Revisado el 14 de Agosto de 2005].
- Suzuki T, Timofei S, Kurunczi L, Dietze U, Schüürman G. 2001. Correlation of aerobic biodegradability of sulfonated azo dyes with the chemical structure. *Chemosphere*. 45: 1-9.
- Swamy J, Ramsay JA. 1999. The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. *Enzyme and Microbial Technology*. 24:130–137.
- Taylor TN, Remy W, Hass H. 1994. *Allomyces* in the Devonian. *Nature*. 367: 601.
- The New Enciclopedia Britanica. Macropaedia. 15th Ed. Encyclopaedia Britanica, Inc. Chicago, USA. Vol 5. Pp. 1099-1117.
- Thorn RG, Reddy CA, Harris D, Paul EA. 1996. Isolation of saprophytic basidiomycetes from soil. *Applied Environmental and Microbiology*. 62: 4288-4292.
- Tekere M, Mswaka AY, Zvauya R, Read JS. 2001. Growth, dye degradation and ligninolytic activity studies on Zimbabwean white rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*. 28: 420-426.
- Thurston CF. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*. 140: 19-26.
- Tien M, Kirk TK 1983. Lignin degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science*. 221: 661-663.

- Tien M, Kirk TK. 1988. Lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods Enzym.* 161:238-49.
- Tomsovský M, Homolka L. 2003. Laccase and other ligninolytic enzyme activities of selected strains of *Trametes* spp. from different localities and substrates. *Folia Microbiologica.* 48(3): 413-416.
- Tychanowicz GK, Zilly A, de Souza CGM, Peralta RM. 2004. Decolourization of industrial dyes by solid state cultures of *Pleurotus pulmonarius*. *Process Biochemistry.* 39(7): 855-859.
- Vanhulle S, Trovaslet M, Enaud E, Lucas M, Sonveaux M, Decock C, Onderwater R, Schneider Y-J, Corbisier A-M. 2008. Cytotoxicity and genotoxicity evolution during decolorization of dyes by White Rot Fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 24(3): en línea desde Marzo.
- Vyas BRM, Molitoris HP. 1995. Involvement of an extracellular H₂O₂-dependent ligninolytic activity of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolorization of Remazol Brilliant Blue R. *Applied and Environmental Microbiology.* 61(11): 3919-3927.
- Wariishi H, Dunford HB, MacDonald ID, Gold MH. 1989. Manganese peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Transient state kinetics and reaction mechanism. *Journal of Biological Chemistry.* 264(6): 335-3340.
- Wariishi H, Valli K, Gold MH. 1992. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biological Chemistry.* 267(33): 23688-23695.
- Weber EJ, Wolfe NL. 1987. Kinetic studies of reduction of aromatic azo compounds in anaerobic sediment/water systems. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 6: 911-920.
- Wikipedia The free encyclopedia. *Dye*. [internet]. Disponible en el sitio de red: <http://en.wikipedia.org/wiki/Dye>
[Revisado el 4 de Septiembre de 2007].
- World Bank Group. 1998. *Pollution prevention and abatement handbook: Dye manufacturing*. Pp. 298-301. [internet]. Disponible en el sitio de red: [http://ifcln001.worldbank.org/ifcext/enviro.nsf/AttachmentsByTitle/gui_dye_WB/\\$FILE/dye_PPAH.pdf](http://ifcln001.worldbank.org/ifcext/enviro.nsf/AttachmentsByTitle/gui_dye_WB/$FILE/dye_PPAH.pdf)

[Revisado el 4 Marzo 2007].

- Wang Y, Yu J. 1998. Adsorption and degradation of synthetic dyes on the mycelium of *Trametes versicolor*. *Water Science and Technology*. 38: 233-238.
- Wu QF, Thiers BM, Pfister DH. 2004. Preparation, preservation, and use of fungal specimens in herbaria. In: Mueller, G. M., G. F. Bills and M. S. Foster (Eds.) *Biodiversity of Fungi. Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier Academic Press. San Diego, CA, USA: pp. 23-37.
- Xu F. 1997. Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. *The Journal of Biological Chemistry*. 272(2): 924-928.
- Xiao YZ, Chen Q, Hang J, Shi YY, Wu J, Hong YZ, Wang YP. 2004. Selective induction, purification and characterization of a laccase isozyme from the basidiomycete *Trametes* sp. AH28-2. *Mycologia*. 96(1): 26-35.
- Yang FC, Yu JT. 1996. Development of a bioreactor system using an immobilized white rot fungus for decolorization. *Bioprocess Engineering*. 15: 307-310.
- Yaver DS, Golightly EG. 1996. Cloning and characterization of three laccase genes from the white-rot basidiomycete *Trametes villosa*: genomic organization of the laccase gene family. *Gene*. 181: 95-102.
- Yesilada C. 1995. Decolourization of cristal-violet by fungi. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 11(5): 601-602.
- Yesilada O, Asma D, Cing S. 2003. Decolorization of textile dyes by fungal pellets. *Process Biochemistry*. 38(6): 933-938.
- Yesilada Ö, Özcan B. 1998. Decolorization of orange II dye with crude culture filtrate of white rot fungus, *Coriolus versicolor*. *Tukey Journal of Biology*. 22: 463-476.
- Young L, Yu J 1997. Ligninase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Water Research*. 31: 1187-1193.
- Zille A, Munteanu FD, Gübitz GM, Cavaco-Paulo A. 2005. Laccase kinetics of degradation and coupling reactions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 33: 23-28.
- Zilly A, Souza CG, Barbosa-Tessmann IP, Peralta RM. 2002. Decolorization of industrial dyes by a Brazilian strain of *Pleurotus pulmonarius* producing laccase as the sole phenol oxidizing enzyme. *Folia Microbiologica*. 47: 273-277.

Zouari-Mechichi H, Mechichi T, Dhouib A, Sayadi S, Martínez AT, Martínez MJ. 2006. Laccase purification and characterization from *Trametes trogii* isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*. 39(1): 141-148.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Sergio Manuel Salcedo Martínez

Candidato para el grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Microbiología

Tesis: **CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DECOLORANTE DE CEPAS DE BASIDIOMICETOS NATIVAS SOBRE COLORANTES SINTÉTICOS**

Campo de Estudio: Micología Aplicada.

Datos Personales: Nacido el 4 de Agosto de 1957, hijo de Sergio Manuel Salcedo Mora y Ma. del Pilar Martínez Ruiz.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León con el título de Biólogo en 1980 y de la Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado del Colegio de Ciencias y Humanidades de la Universidad Nacional Autónoma de México con el grado de Maestro en Ciencias del Mar con especialidad en Oceanografía Biológica y Pesquera en 1984 con mención honorífica.

Experiencia Profesional: Profesor asociado A tiempo completo del Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León desde 2001.

Reconocimientos: Perfil PROMEP desde el 31 Julio del 2008

Screening for decolorizing basidiomycetes in Mexico

Screening and selection of ligninolytic basidiomycetes with decolorizing ability in Northeast Mexico

C. E. Hernández-Luna · G. Gutiérrez-Soto ·
S. M. Salcedo-Martínez

Received: 29 November 2006 / Accepted: 9 July 2007 / Published online: 17 August 2007
© Springer Science+Business Media B.V. 2007

Abstract A survey to isolate native white rot basidiomycetes from Northeast Mexico was conducted in the forests of the Sierra Madre Oriental in the state of Nuevo León. A total of 92 isolates from at least 20 different genera, were screened on Bran-Flakes solid plate cultures for the production of ligninolytic oxidases and/or peroxidases with guaiacol and o-anisidine as substrates; their lignin depolymerizing potential using the polymeric dye Poly R 478; their ability to decolorize anthraquinonic (Remazol Brilliant Blue Reactive), azo (Acid Red 44) and triphenylmethane (Crystal Violet) dyes. Among all fungi tested, 15 isolates showed extensive decolorization of the three dyes within a week and gave a positive reaction in guaiacol and o-anisidine tests. Nine of them were also efficient degraders of Poly R-478. Two isolates (CS5 and CU1) showed decolorization of all dyes within 5 days, comparing favorably with reference strains of *P. chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, and *Bjerkandera adusta*. Decolorization was associated with laccase activity in both isolates and reached 90% or more for all dyes within 24 h in 8-day-old liquid cultures. The coupling of pairs 2,4-dichlorophenol + 4-aminoantipyrine and 3-dimethylaminobenzoic acid + 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone, strongly suggest that the laccases of both strains correspond to those considered of high redox potential. These strains are considered good candidates for bioremediation of dye polluted effluents due to their ligninolytic potential and decolorizing performance.

Keywords Bioremediation · Dye decolorization · Laccase · Native basidiomycetes · *Phanerochaete chrysosporium*

Introduction

Colorants and dyestuff are used in food, pharmaceutical, cosmetic, paper, printing, leather, paint and many other industries as main ingredients or accessories to improve the durability and/or attractiveness of their products. It has been estimated that 80,000 tons of these compounds are dumped annually in wastewater worldwide (Heinfling et al. 1998); in Mexico, the textile and leather industries generate wastewaters with an estimate of 4,300 tons of dyes and colorants (INEGI 2001). In the aquatic ecosystems, dyes and colorants interfere with photosynthesis, affect the diffusion of gasses and are visible even in small concentrations, besides, they threaten human health due to the toxic aromatic structure of their chromophore and the possible transformation of some azo and nitro compounds into carcinogenic aromatic amines in anoxic environments (Baughman and Weber 1994; Chung et al. 1992).

Synthetic dyes are commonly recalcitrant substances designed to resist washing, solar light exposition and diverse chemical treatments, making their removal from waste water difficult and expensive (Hao et al. 2000). The white rot basidiomycetes are a group of ligninolytic fungi capable of decomposing synthetic compounds due to their structural similarities with lignin or its derivatives (Hofrichter 2002). Its use has been proposed as a promissory alternative to replace or supplement sewage treatment processes, with the advantages of growing on simple inexpensive media, having high production rate and biosorptive capacity (Zhang et al. 1999), and a lignin-degrading system (LDS) composed of

C. E. Hernández-Luna (✉) · G. Gutiérrez-Soto ·
S. M. Salcedo-Martínez
Laboratorio de Enzimología, Facultad de Ciencias Biológicas,
Universidad Autónoma de Nuevo León, Ave. Pedro de Alba S/N
Ciudad Universitaria, San Nicolas de los Garza, Nuevo Leon
C.P. 64450, Mexico
e-mail: carlosehlmx@yahoo.com

oxidoreductases capable of aerobically decomposing xenobiotic compounds commonly considered as recalcitrant, among them the synthetic dyes (Mester and Tien 2000; Pointing 2001).

Decolorizing ability of LDS of white rot fungi has been extensively studied only in a few strains of *Phanerochaete chrysosporium*, *Bjerkandera adusta*, *Coriolus versicolor*, and several species of *Pleurotus* and *Phlebia* (McMullan et al. 2001). But recent isolation of strains with a better color removal ability than reference strains (Tekere et al. 2001; Jarosz-Wilkolazka et al. 2002) directs worldwide attention towards the searching of autochthonous fungi belonging to different ecophysiological and taxonomic groups (Kiiskinen et al. 2004) for biotechnological application in bioremediation (Raghukumar 2000). Monterrey area, located in Northeast Mexico, is second place in industrial importance in the country and harbors important synthesis and dye using industries. Their wastewater must be decolorized and harmless before reaching the environment. In this work we used a simple screening plate system to look for native wood decay basidiomycete fungi in the lignin-rich hard-wood forests of the Sierra Madre Oriental around Monterrey, with the purpose of isolating and selecting strains with a comparable capacity to degrade synthetic dyes than international reference strains, making them potentially valuable in bioremediation.

Materials and methods

Chemicals

All chemicals used were reagent grade unless otherwise stated. The substrates: guaiacol, o-anisidine and Poly R-478 (PR); reagents 2,6-dimethoxyphenol (DMOP), 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazolinesulphonate) (ABTS), syringaldazine [N,N'-bis-(3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzylidene)hydrazine], 4-aminoantipyrene (4-AAP), 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP), 3-dimethylaminobenzoic acid (DMAB), 3-methyl-2-benzothiazoline hydrazone (MBTH), veratryl alcohol, and synthetic dyes Remazol Brilliant Blue R (RBBR), Acid Red 44 (AR44), and Crystal Violet (CV) were from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. Malt extract, yeast extract, glucose and agar for media from Difco and other chemicals and salts from CTR Mexico.

Culture media

All fungal strains were maintained at 4°C on YMGA (4 g yeast extract, 10 g malt extract, 4 g glucose, 15 g agar per liter). YMGA supplemented with 14 ml of 10% w/v Tartaric Acid and 4 mg Benomyl per liter (Isolation media)

was used to favor the growth of basidiomycetes. Bran-Flakes media (ligninolytic enzymes inducer media), consisting of 2% (w/v) Kellogg's Bran Flakes[®] in 60 mM Potassium Phosphate buffer pH 6.0, added with 1.5% (w/v) agar (Pickard et al. 1999) was used for the selection of the strains with the best ligninolytic potential and ability to decolorize the main groups of synthetic dyes. In liquid cultures agar was omitted from Bran Flakes media. All media were autoclaved at 121°C at 15 lb for 20 min.

Reference strains

Phanerochaete chrysosporium ATCC 24725, *Pleurotus ostreatus* ATCC 58053 and *Bjerkandera adusta* UAMH 8258 used as reference for this work were kindly provided by Dr. M. A. Pickard from the University of Alberta, Edmonton, Canada. Stock cultures were stored on YMGA plates at 4°C and periodically subcultured. They were reactivated on YMGA at 28°C before every assay.

Collection and isolation of native fungi

Fungal strains were isolated from fruiting bodies found on trees and decomposing logs and stumps in different biotopes around Monterrey, Northeast Mexico. The collecting focused mainly on well developed carpophores of white rot fungi from chaparral and gallery vegetation zones where Leguminosae and other hard wood trees were dominant, but oak-pine forests were also surveyed. Basidiocarps were transported in numbered paper bags to the laboratory and mostly processed immediately but sometimes were stored overnight at 4°C. Photographic records, phenotypical characteristics and measurements gathered in situ, along with sporeprints, microchemical reactions, and microscopical observations conducted in the laboratory helped in the identification to genus, or species when possible, following a manual with keys to the most common macromycetes from Mexico (Guzmán 1980). The most promising strains were identified by the Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands.

After washing the carpophores with sterile distilled water, tissue plugs around 2 mm diameter obtained from their inner tissue were disinfected in 3% hydrogen peroxide for 1 min, washed thoroughly in sterile distilled water and then transferred to Isolation media, incubated at 28°C in 90 mm diameter Petri dishes, and repeatedly transferred onto new plates until microscopical observation confirmed its purity, and presence of clamp connections confirmed the isolation of a basidiomycete (Thorn et al. 1996). The isolates were maintained and reactivated before every assay as described for collection strains.

Screening for ligninolytic enzyme activity and decolorizing potential

Our selection system consisted of the three substrates: Poly R-478 (PR), guaiacol and *o*-anisidine, used as indicators of ligninolytic potential and the three synthetic dyes: the anthraquinonic Remazol Brilliant Blue Reactive (RBBR), the azo Acid Red 44 (AR) and the triphenylmethane Crystal Violet (CV) used to evaluate the decolorizing ability. Every isolate was evaluated for triplicate in the selection system, in 90 mm diameter Petri dishes inoculated with a 5 mm diameter plug taken from the periphery of a fresh culture. PR was added to media before sterilizing, the other substrates and dyes were added aseptically (Millipore 0.45 μm) to previously sterilized Bran Flakes media to a final concentration of 0.02%. Plates were incubated at 28°C and diameter growth, substrate reactions and decolorization were registered daily during the first 5–7 days and sporadically afterwards for 3 weeks. Substrate reactions were indicative of ligninolytic potential, if the production of extracellular oxidases and/or peroxidases was revealed by a colored zone developed around microbial growth (reddish-brown with guaiacol or purple with *o*-anisidine) and potential to break down lignin bonds was indicated by the depolymerization of PR (color change from pink to yellow) (Field et al. 1992). The extent of decolorization was assessed by visual examination of the decolorization area and quantitatively determined by assigning numbers 0–5 with decolorization maximum at 5.

Production of ligninolytic enzymes in liquid culture

Isolates with the best ligninolytic potential and decolorizing ability in plate assays, were cultured in liquid media to study the production of the three major ligninolytic enzymes: namely, lignin peroxidase (EC 1.11.1.14, 1,2-bis(3,4-dimethoxyphenyl)propane-1,3-diol:hydrogen-peroxide oxidoreductase) (LiP), manganese peroxidase (EC 1.11.1.13 Mn(II):hydrogen-peroxide oxidoreductase) (MnP) and laccase (EC 1.10.3.2 benzenediol:oxygen oxidoreductase). Three 5 mm diameter cylinders of mycelium from each isolate were used to inoculate 100 ml Bran Flakes media in 250 ml Erlenmeyer flasks and the flasks were incubated for 20 days on a shaker at 28°C and 150 rev/min. Enzyme activity in submerged cultures was determined every other day by triplicate, using 100 μl samples from a 1 ml aliquot, taken from cultures and centrifuged at 14,000 rpm for 10 min (Eppendorf Centrifuge 5415c). The peaks of enzyme production were established from the graphs of enzyme activity with time.

Enzyme assays

Laccase activity was determined according to Heinzkill et al. (1998) following the formation of the green cationic radical of 2 mM ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid)-diammonium salt) at 405 nm ($\epsilon_{405} = 36,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in 100 mM acetate buffer (pH 5.0). LiP activity was assayed according to Ramachandra et al. (1988) measuring the formation of the pink colored oxidation product between 1 mM 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) and 8.2 mM 4-aminoantipyrene (4-AAP) at 510 nm ($\epsilon_{510} = 18,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in 100 mM sodium succinate (pH 5.5). Reaction was initiated by the addition of H_2O_2 to a final concentration of 0.1 mM. LiP was also evaluated according to Tien and Kirk (1988) with 4 mM veratryl alcohol as substrate in the presence of 0.4 mM H_2O_2 . The assay was performed in 40 mM sodium tartrate (pH 3.0), and the change in absorbance was monitored at 310 nm ($\epsilon_{310} = 9,300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). MnP was determined according to Wariishi et al. (1992) following the H_2O_2 -dependent formation of Mn(III)-malonate complex at 270 nm ($\epsilon_{270} = 11,590 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Reaction mixtures contained 0.2 mM MnSO_4 in 50 mM sodium malonate buffer (pH 4.5), and the reaction was initiated by the addition of H_2O_2 to a final concentration of 0.1 mM. All assays were performed at 25°C. One unit of enzymatic activity was defined as the amount of enzyme transforming 1 μmol of substrate per minute.

Assays for the verification of enzyme activities

Centrifuged samples obtained as described for monitoring the enzyme production, were used in a series of assays to confirm the enzyme activities present in 10-day-old cultures. A positive reaction with syringaldazine (Harkin et al. 1974) would confirm the laccase activity. LiP in the presence of H_2O_2 would react with veratryl alcohol (Tien and Kirk 1988) or couple the pair 2,4-DCP + 4-AAP, and the MnP activity would be revealed by the coupling of the pair 3-dimethylaminobenzoic acid (DMAB) + 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone (MBTH) (Castillo et al. 1994) or by the formation of the Mn(III)-Malonate complex in the presence of Mn^{2+} and H_2O_2 .

A possible overlapping between laccases and peroxidases would be prevented by keeping the necessary requirements away from the latter or retrieving them from the assay media (Jordaan and Leukes 2003). In other series of assays, 8-day-old cultures were filtered successively through gauze and filter paper (Whatman # 1) and concentrated hundredfold by ultrafiltration (Amicon 10-kDa cut-off membrane) to obtain crude enzyme preparations. Using discontinuous native PAGE on 12% polyacrylamide

as separating gels (Garfin 1990), their activities were revealed using ABTS, 2,4-DCP + 4-AAP, and DMAB + MBTH as substrates without cofactors for peroxidases. Protein concentration was determined by the Bradford protein assay (Stoscheck 1990).

Determination of decolorizing ability

The decolorizing ability of selected strains in liquid cultures was evaluated on 0.02% RBBR, AR44 or CV supplemented at the time of inoculation. One ml samples of cultures were taken right after dye addition and then every other day, centrifuged (Eppendorf Centrifuge 5415c 14,000 rpm, 10 min) and the absorption spectra in the range 200–800 nm were recorded using a Shimadzu mini 1240 UV-VIS spectrophotometer. Color reduction was followed spectrophotometrically and decolorizing activity was calculated from the decrease in absorption of the peak maximum for each dye (592 for RBBR, 510 for AR44, and 588 for CV). Microbial decolorization was also assessed in 8-day-old liquid cultures. Dyes were supplemented after fungal growth and decolorization was measured every 2 h after dye addition. Additionally, to discard mycelia participation in decolorization, dyes (100 ppm) were added to 1 ml clear supernatants samples obtained from 8-day-old cultures (enzymatic decolorization). Absorption spectra were registered immediately after dye addition and after 12 h of incubation at 25°C. Percentage of decolorization was calculated as described above.

Results and discussion

Isolates screening for the best decolorizing ability and ligninolytic potential

A total of 92 native basidiomycetes from Northeast Mexico were isolated and their pure cultures were screened for decolorization, associating this ability to their ligninolytic potential. These strains were distributed mainly in the genera *Pycnoporus*, *Polyporus*, *Schizophyllum*, *Ganoderma*, *Trametes*, *Stereum*, *Chondrostereum*, *Inonotus*,

Phelinus, *Fomes*, *Daedalea*, *Trichaptum*, *Merulius*, *Irpex*, *Steccherium*, *Poria*, *Hexagonia*, *Ischnoderma*, *Fomitopsis*, and *Cerrena*.

Poly R-478 decolorization and the use of guaiacol and o-anisidine as chromogenic substrates are proved quick, reproducible, inexpensive screening methods to determine ligninolytic activity (Glenn and Gold 1983; De Jong et al. 1992; Kiiskinen et al. 2004). The LDS of white rot fungi consists of oxidases and peroxidases with a highly non-specific, free-radical mediated mechanism, capable of transforming and sometimes completely mineralizing a wide array of pollutant substances, among them the synthetic dyes (Paszczynski and Crawford 1995).

Plate screening results are summarized in Table 1. Among the 92 strains tested for ligninolytic potential, 67 oxidized o-anisidine and 66 oxidized guaiacol, representing 73 and 72%, respectively. However, not all producers of ligninolytic oxidases and/or peroxidases were able of depolymerising the Poly R-487 as only 42 strains (52%) had this ability. A possible explanation for this could be that along with the oxidases and/or peroxidases, some strains also need hydrogen peroxide generating systems or/and low weight mediators to attack the polymeric substrate, which were not produced under our study conditions (Rabinovich et al. 2004). The number of strains removing completely the color in the area of mycelial growth within 3 weeks was respectively 36, 38, and 22 for RBBR, AR, and CV. RBBR and AR dyes were more susceptible to decolorization in Bran Flakes media than CV, which usually had a negative effect on growth too, producing a total inhibition in 31 strains. Fifteen strains efficiently decolorized all three dyes within a week and of them only nine were also able to decolorize in some degree the ligninolytic potential indicator PR and are listed in Table 2. The decolorization magnitude of the different dyes as well as this ligninolytic indicator, by the fungal isolates is given in a scale 1–5 where 5 corresponds to total decolorization in mycelial area of growth. The results with CS5 and CU1 strains, identified as *Trametes villosa* and *Trametes maxima*, respectively, are outstanding, as they compared positively with the reference strains in the tests of ligninolytic potential and decolorizing capacity and showed

Table 1 Plate screening results for the 92 native isolates

	Ligninolytic potential			Decolorizing ability ^a		
	o-Anisidine	Guaiacol	PR	RBBR	AR	CV
Number of positive strains	67	66	48	60 (36)	62 (38)	42 (22)
Percentage of total	73	72	52	65 (39)	67 (41)	46 (24)

AR Acid red 44, CV Crystal violet, RBBR Remazol brilliant blue reactive, PR Poly R-478

^a Strains able to decolorize at some degree. Numbers in parentheses indicate strains that completely decolorized the dye within 3 weeks

Table 2 Native isolates with ligninolytic potential and decolorizing ability comparable to reference strains

Isolate/strain	Taxon	PR	RBBR	AR	CV	Growth ^a (mm/day)
CU1	<i>Trametes maxima</i>	5	5	5	4	12
CS5	<i>Trametes villosa</i>	5	5	5	3	8.7
CS20	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	4	5	5	3	7.2
CS63	<i>Trametes trogii</i>	4	5	5	3	8.8
LE5	<i>Trametes sp</i>	4	5	5	3	7.1
LE13	Unidentified	4	5	5	4	7.7
LE45	<i>Trametes sp</i>	3	5	4	3	9
LE95	<i>Trametes pubescens</i>	4	5	4	3	7.6
LE79	Unidentified	3	5	4	3	7
ATCC24725	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	4	5	4	1	16.8
ATCC58053	<i>Pleurotus ostreatus</i>	1	2	4	2	30
UAMH8258	<i>Bjerkandera adusta</i>	4	5	4	3	10.4

AR Acid red 44, CV Crystal violet, RBBR Remazol brilliant blue reactive, PR Poly R-478, 1–5 scale of decolorization magnitude, ^acalculated on Bran Flakes media

a high growth rate in Bran Flakes media with any dye, covering completely the surface of the plates within a week. In consequence these two strains were selected for the studies in liquid media. Remarkably the reference strain of *P. ostreatus* showed a poor ligninolytic potential and decolorizing ability under our conditions. These results reinforce the idea that screening surveys for autochthonous ligninolytic enzyme producers and decolorizers, like those carried out around the world by other authors (Tekere et al. 2001; Saparrat et al. 2002; Walter et al. 2003; Dhoubi et al. 2005; Asgher et al. 2006) could lead to finding novel strains with potential use in bioremediation.

Production of ligninolytic enzymes in liquid media

Laccase activity (Fig. 1a) was detected in both strains. In CS5 it was detected from day 6 and increased to a broad plateau of maximum activity (2,800 U/l) extending from day 8 to 14 and then decreased to be feebly detected in days 16–20. In CU1 it was also initially detected at day 6 but showed two peaks, the first one at day 10 (around 4,300 U/L) and the second at day 16 when it was higher (4,800 U/L), then it declined to be undetected at day 20. MnP (Fig. 1b) was detected in CS5 starting at day 10 of culture; it reached a production peak (120 U/l) between days 14 and 16 and then declined. However under our conditions we were unable to detect this activity in CU1. Although a positive reaction with the pair 2,4-DCP + 4-AA suggested that both isolates had LiP activity, we could not confirm it with its specific substrate veratryl alcohol. We thought the laccase could be responsible for this activity, since an oxidative coupling of other peroxidase substrates by laccase has been reported (Jordaan and Leukes 2003).

Verification of enzyme activities

To demonstrate that laccase activity was capable to promote the oxidative coupling of peroxidase substrates, we tested 10-day-old culture filtrates with a series of substrates for laccases and peroxidases varying the assay conditions (Table 3). A positive reaction with syringaldazine confirmed the presence of laccase in both strains. This activity

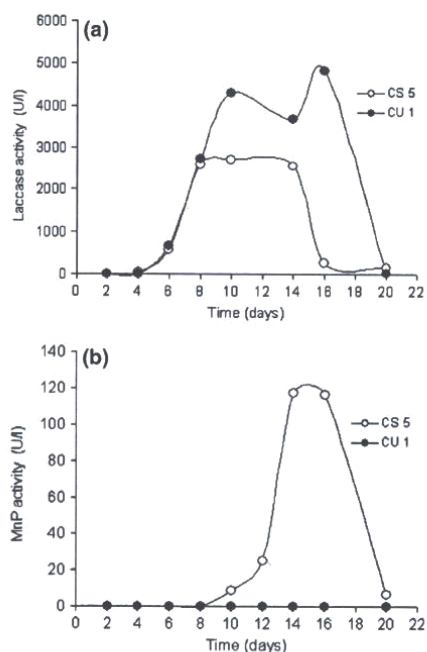


Fig. 1 Time course for production of Laccase (a) and Mn Peroxidase (b) by CS5 and CU1 strains

Table 3 Verification of the ligninolytic activities produced by CS5 and CU1 in liquid media

Substrate(s)/Addition	Assay conditions ^a									
	Laccase		LiP		LiP (-) ^b		MnP		MnP (-) ^c	
	CS5	CU1	CS5	CU1	CS5	CU1	CS5	CU1	CS5	CU1
Syringaldazine	P	P								
ABTS	P	P					P	P	P	P
Guaiacol	P	P					P	P	P	P
Veratryl alcohol			N	N						
2,4-DCP + 4-AAP			P	P	P	P				
2,4-DCP + 4-AAP/catalase			P	P	P	P				
Mn ²⁺							P	N	N	N
2,6-DMOP ^d							P	P	P	P
DMAB + MBTH ^d							P	P	P	P
DMAB + MBTH ^d /catalase/EDTA							P	P	P	P

P positive reaction, N negative

^a Assay conditions correspond to each of the enzymes as described in methods

^b Conditions for LiP with no addition of hydrogen peroxide

^c Conditions for MnP with no addition of Mn²⁺ nor hydrogen peroxide

^d Used as chromogenic secondary substrate(s) for MnP activity

was also responsible for the positive reactions with ABTS and guaiacol (developing even in the absence of Mn²⁺ and hydrogen peroxide), and with the pair 2,4-DCP + 4-AA (developing in the absence of hydrogen peroxide or in the presence of catalase), confirming that LiP is not present under our conditions in both CS5 and CU1. Even when MnP activity was confirmed for CS5 (positive reaction on Mn²⁺ only in the presence of H₂O₂), the occurrence of reaction for both strains with 2,6-DMOP and with the pair MBTH + DMAB even in the presence of EDTA and catalase (to remove both Mn²⁺ and H₂O₂), pointed to laccase activity as the only one responsible. On the bases of these results two possible explanations are proposed: either laccases belong to the high redox potential group or they act through low-molecular weight redox mediators. Zymograms (Fig. 2) of crude enzyme preparations, free of mediators, revealed the same bands for ABTS and the oxidative couples DMAB + MBTH and 2,4-DCP + 4-AAP in the absence of H₂O₂ and Mn²⁺ (laccase conditions). Same patterns were obtained using syringaldazine and 2,6-DMOP (data not shown). These results strongly suggest that laccases belong to the high redox potential group.

The presence of MnP and laccase activities in CS5 is in agreement with reports of this combination as the most common in white rot fungi (Nerud and Misurkova 1996). Detecting laccase as the only ligninolytic activity in CU1 is in concordance with previous reports for other fungi such as *P. cinnabarinus* (Eggert et al. 1996). Briefly, our results support the idea that both strains could be producing laccases with high redox potential, which have the ability to

attack peroxidase substrates and consequently, constitute an important part of its ligninolytic machinery. However, we cannot discard the possible existence of a laccase/

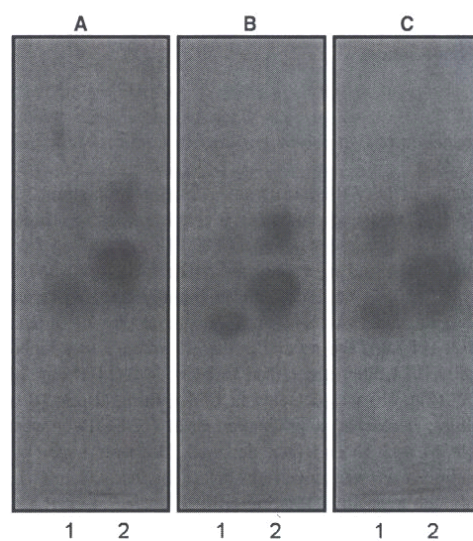


Fig. 2 Native PAGE of crude enzymes obtained from 8-day-old cultures. Bands developed under laccase conditions (in the absence of H₂O₂ and MnCl₂), using: ABTS (a), DMAB + MBTH (b), and 2,4-DCP + 4-AAP (c) as the substrates for CS5 (1), and CU1 (2) preparations

mediators system and peroxidases to degrade lignin in their natural environment.

Decolorizing activity

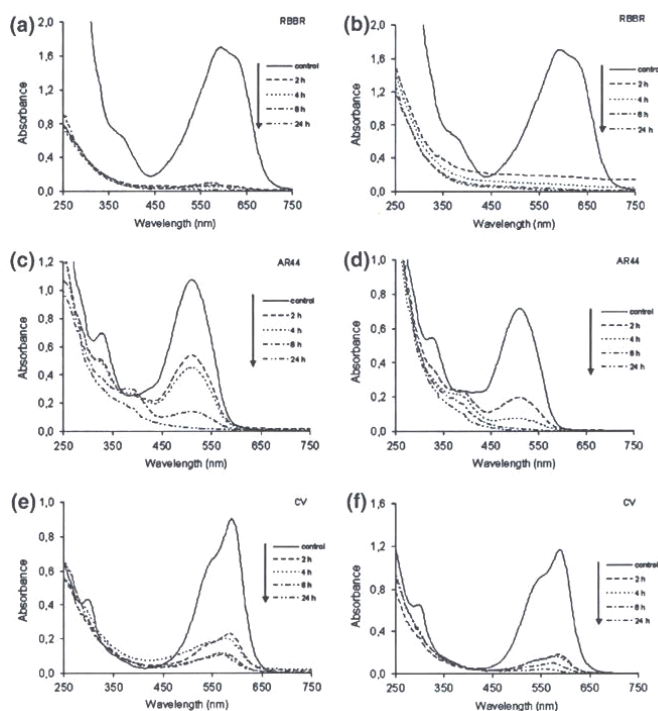
Both, CU1 and CS5 decolorized (RBBR, AR) or changed the coloring (CV) of dyes within 10 days of incubation when a dye was added from the beginning of culture (data not shown).

Although we only confirmed the MnP activity in CS5 cultures, assays with 8-day-old cultures of both strains were carried out in order to diminish the possible contribution of this activity to the decolorization process. Absorption spectra during microbial decolorization are shown in Fig. 3. The maximum absorption peak for RBBR in both cultures CS5 (Fig. 3a) and CU1 (Fig. 3b) decreases abruptly in 2 h to be almost undetected after 24 h. However, there is a difference between the two cultures, since CS5 shows a slight residual absorption peak shifting towards the left of the initial maximum, which is not present in that of CU1. For AR44, decreasing of main absorption peak was not as pronounced as with RBBR, however it reached comparable levels after 24 h.

Additionally, a new peak appeared around 385 nm being more evident in CS5 (Fig. 3c) than in CU1 (Fig. 3d). In the case of CV, disappearance of the main peak was also steep during the first 2 h and then gradual until the end of incubation, showing a continuous shift from 588 to about 570 nm for both cultures (Fig. 3e, f). The relationship between time of incubation and decolorization is shown in Fig. 4. Decolorization after 2 h with CS5 reached 96, 50 and 74% for RBBR, AR44 and CV, respectively, and 89, 74, and 83% with CU1. At 24 h of incubation, decolorization was almost complete for all cultures (>98%), with the exception of CS5 on CV which still had 10% of residual color.

In general, the disappearance of color in liquid cultures could be explained by mycelial adsorption or dye transformation. Even when dye adsorption to mycelia could participate early in color reduction, we were not able to detect residual color on mycelia after 24 h by visual inspection of cultures or in methanol washings of filtered mycelia. Additionally, similar absorption spectra (not shown) to those of microbial decolorization were obtained with 8-day-old mycelia-free culture supernatants (enzymatic decolorization), where initial absorbance for RBBR, AR and CV, decreased after 12 h of incubation in >99, 94,

Fig. 3 Absorption spectra during microbial decolorization of synthetic dyes. Cultures of CS5 (series on left) and CU1 (series on right) strains were carried out on liquid Bran flakes media under agitated conditions, and dyes; RBBR (a and b), AR44 (c and d), and CV (e and f) were added at the eighth day of growth. Overlays were obtained at indicated times and compared with control spectra obtained immediately after dye addition



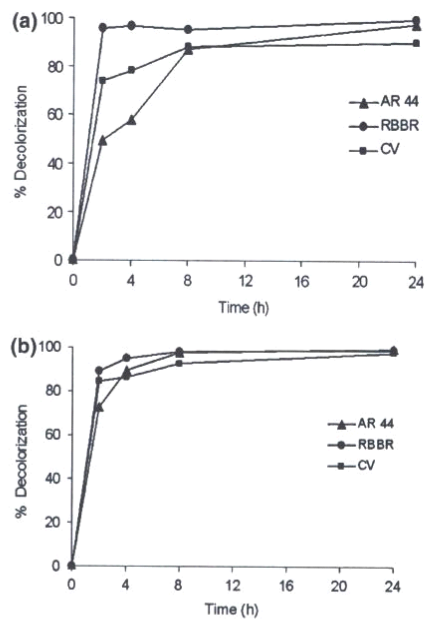


Fig. 4 Microbial decolorization of Remazol Brilliant Blue R, Acid Red 44 and Crystal Violet by 8-day-old liquid cultures of CS5 (a) and CU1 (b) as a function of time. Color reduction was calculated from the wavelengths of maximum absorption in the visible range for each dye

and 54% for CS5 (0.82 U/ml Laccase) and >99, >99, and 42% for CU1 (2 U/ml Laccase), respectively, for each dye, supporting that decolorization can be accomplished in the absence of mycelia. The removal of the major visible light absorbance peak combined with the displacement to the left (hypsochromic effect) (more evident in Fig. 3c, d), and the appearance of new peaks (Fig. 3e) could be explained by a dye degradation or transformation through different intermediaries as previously reported by Maximo et al. (2003) and McMullan et al. (2001).

A dye decolorization depends on its structural complexity (identity, number and position of functional groups in the aromatic region), its charge (distribution of electrons and density of charge) (Knapp et al. 1995; Swamy and Ramsay 1999) or could be the result of all interactions in its structure and be associated for example to ionization potential (Podgornik et al. 1999). Different fungal enzymes, and even isoenzymes, have different specificities for dyes belonging to different structural classes (Ollikka et al. 1993). Our results on dye decolorization are in agreement with literature in regard to anthraquinonic being more easily degraded than azo dyes (Abadulla et al. 2000) and CV, even as a member of the triarylmethane, being a

more recalcitrant one and its color loss depending on the strain used (Knapp et al. 1995).

Finding laccase as the principal activity responsible for decolorization is consistent with previous reports with *T. hispida* (Rodriguez et al. 1999) and *T. hirsuta* (Abadulla et al. 2000). However further studies with pure enzymes are necessary to prove it conclusively.

Conclusions

All the isolates with the ability to attack the three dyes gave also a positive reaction in the plates with guaiacol and o-anisidine, showing a strong correlation with the production of oxidoreductases. A possible explanation for the strains that by producing oxidases and/or peroxidases did not decolorize PR could be that depolymerization depends on the participation of redox mediators, which under the conditions of our assay should be produced only by those isolates that gave a positive decolorization of PR; or these isolates produce enzymes with high redox potentials. The finding of two native strains with ligninolytic and decolorizing performance comparable to that of reference strains *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725, *Pleurotus ostreatus* ATCC 58053, and *Bjerkandera adusta* UAMH 8258 encourages the searching of fungal strains with specific capabilities suitable to biotechnological processes in Mexican woodland. One of these, isolate CS5 showed a high decolorization rate and has a fast growth rate, consequently has been selected for further studies.

Acknowledgments The authors acknowledge the support received from the PAICYT, UANL under project number CA 822-04. G.G.S. and S.S.M. were recipients of CONACYT fellowships.

References

- Abadulla E, Tzanov T, Costa S, Robra K-H, Cavaco-Paulo A, Gübitz GM (2000) Decolourization and detoxification of textile dyes with a Laccase from *Trametes hirsuta*. *Appl Environ Microbiol* 66(8):3357–3362
- Asgher M, Shah SAH, Ali M, Legge RL (2006) Decolorization of some reactive dyes by white rot fungi isolated in Pakistan. *World J Microbiol Technol* 22:89–93
- Baughman GL, Weber EJ (1994) Transformation of dyes and related compounds in anoxic sediment: kinetics and products. *Environ Sci Technol* 28:267–276
- Castillo MDP, Stenström J, Ander P (1994) Determination of manganese peroxidase activity with 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone and 3-(dimethylamino) benzoic acid. *Anal Biochem* 218:399–404
- Chung KT, Stevens SE Jr, Cerniglia CR (1992) The reduction of azo dyes by the intestinal microflora. *Crit Rev Microbiol* 18:175–190
- De Jong E, de Vries FP, Field JA, van der Zwan RP, de Bont JAM (1992) Isolation and screening of basidiomycetes with high peroxidative activity. *Mycol Res* 96(12):1098–1104

- Dhouib A, Hamza M, Zouari H, Mechichi T, Hmidi R, Labat M, Martínez MJ, Sayadi S (2005) Screening for ligninolytic enzyme production by diverse fungi from Tunisia. *World J Microbiol Technol* 21:1415–1423
- Eggert C, Temp U, Eriksson K-EL (1996) The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl Environ Microbiol* 62(4):1151–1158
- Field JA, Jong E, Feijoo Costal G, Bont JA (1992) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. *Appl Environ Microbiol* 58(7):2219–2226
- Garfin DE (1990) One dimensional gel electrophoresis. In: Deutscher MP (ed) *Methods in enzymology*, vol 182. Guide to protein purification. Academic, New York, pp 425–44. IISBN 0-12-182083-1
- Glenn JK, Gold MH (1983) Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 45(6):1741–1747
- Guzmán G (1980) Identificación de los hongos. Comestibles, venenosos y alucinantes. ed. Limusa, S.A. México, p 452. ISBN 968-18-0123-7
- Hao OJ, Kim H, Chiang PC (2000) Decolorization of wastewater. *Crit Rev Environ Sci Technol* 30(4):449–505
- Harkin JM, Larsen MJ, Obst JR (1974) Use of syringaldazine for detection of laccase in sporophores of wood rotting fungi. *Mycologia* 66:469–476
- Heinfling A, Martínez MJ, Martínez AT, Bergbauer M, Szewzyk U (1998) Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a Manganese-independent reaction. *Appl Environ Microbiol* 64(8):2788–2793
- Heinzkill M, Bech L, Halkier T, Schneider P, Anke T (1998) Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (Family Coprinaceae). *Appl Environ Microbiol* 64(5):1601–1606
- Hofrichter M (2002) Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme Microbiol Technol* 30:454–466
- INEGI (2001) XV Censo Industrial. Censos Económicos 1999. Industrias manufactureras subsector 32. Producción de textiles, prendas de vestir e industria del cuero. Productos y materias primas. ISBN 970-13-3334-9. INEGI, México, p 121
- Jarosz-Wilkolazka AJ, Kochmanska-Rdest J, Malarczyk E, Wardas W, Leonowicz A (2002) Fungi and their ability to decolorize azo and anthraquinonic dyes. *Enzyme Microbiol Technol* 30:566–572
- Jordaan J, Leukes WD (2003) Isolation of a thermostable laccase with DMAB and MBTH oxidative coupling activity from a mesophilic white rot fungus. *Enzyme Microb Technol* 33(2):212–219
- Kiiskinen L-L, Rättö M, Kruus K (2004) Screening for novel-producing microbes. *J Appl Microbiol* 97:640–646
- Knapp JS, Newby PS, Reece LP (1995) Decolorization of dyes by wood-rotting basidiomycete fungi. *Enzyme Microb Technol* 17:664–668
- Maximo C, Pessoa MT, Costa-Ferreira M (2003) Biotransformation of industrial reactive azo dyes by *Geotrichum sp* CCMI 1019. *Enzyme Microb Technol* 32:145–151
- McMullan G, Meehan C, Connely A, Kirby N, Robinson T, Nigam P, Banat IM, Marchant R, Smyth WF (2001) Microbial decolorisation and degradation of textile dyes. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:81–87
- Mester T, Tien M (2000) Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. *Int Biodeterior Biodegradation* 46:51–59
- Nerud F, Misurkova Z (1996) Distribution of ligninolytic enzymes in white rot fungi. *Folia Microbiol* 41:264–266
- Ollikka O, Alhoniemi K, Leppänen V-M, Glumoff T, Rajola T, Suominen I (1993) Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 59:3605–3613
- Paszczynski A, Crawford RL (1995) Potential for bioremediation of xenobiotic compounds by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol Prog* 11:368–379
- Pickard MA, Vandertol H, Roman R, Vazquez-Duhalt R (1999) High production of ligninolytic enzymes from white rot fungi in cereal bran liquid medium. *Can J Microbiol* 45:627–631
- Podgornik H, Grgic I, Perdih A (1999) Decolorization rate of dyes using lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. *Chemosphere* 38:1353–1359
- Pointing SB (2001) Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 57:20–33
- Rabinovich ML, Bolobova AV, Vasil'chenko LG (2004) Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: a review. *Appl Biochem Microbiol* 40(1):1–17
- Raghukumar C (2000) Fungi from marine habitats: an application in biodegradation. *Mycol Res* 104(10):1222–1226
- Ramachandra M, Crawford DL, Hertel G (1988) Characterization of an extracellular lignin peroxidase of the lignocellulolytic actinomycete *Streptomyces viridosporus*. *Appl Environ Microbiol* 52(12):3057–3063
- Rodríguez E, Pickard MA, Vazquez-Duhalt R (1999) Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Curr Microbiol* 38:27–32
- Saparrat MCN, Martínez MJ, Cabello MN, Arambarri AM (2002) Screening for ligninolytic enzymes in autochthonous fungal strains from Argentina isolated from different substrata. *Rev Iberoam Micol* 19:181–185
- Stoscheck CM (1990) Quantitation of protein. In: Deutscher MP (ed) *Methods in enzymology*, vol 182. Guide to protein purification. Academic, New York, pp 62–63. ISBN 0-12-182083-1
- Swamy J, Ramsay JA (1999) The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. *Enzyme Microb Technol* 24:130–137
- Tekere M, Mswaka AY, Zvauya R, Read JS (2001) Growth, dye degradation and ligninolytic activity studies on Zimbabwean white rot fungi. *Enzyme Microb Technol* 28:420–426
- Thom RG, Reddy CA, Harris D, Paul EA (1996) Isolation of saprophytic basidiomycetes from soil. *Appl Environ Microbiol* 62(11):4288–4292
- Tien M, Kirk TK (1988) Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods Enzymol* 161B:238–248
- Walter M, Guthrie JM, Sivakumaran S, Parker E, Slade A, McNaughton D, Boyd Wilson KSH (2003) Screening for New Zealand native white-rot isolates for PCP degradation. *Bioremediation J* 7(2):119–128
- Wariishi H, Valli K, Gold MH (1992) Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J Biol Chem* 267:23688–23695
- Zhang F, Knapp JS, Tapley KN (1999) Development of bioreactor systems for decolorization of orange II using white rot fungus. *Enzyme Microb Technol* 24:48–53

TÓPICOS SELECTOS DE BOTÁNICA 3

*Ecología y desarrollo sustentable, botánica aplicada,
fisiología, sistemática y florística*

*Marcela González Álvarez
Sergio Manuel Salcedo Martínez*

Editores



DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

José Antonio González Treviño
Rector

Jesús Áncer Rodríguez
Secretario General

Ubaldo Ortiz Méndez
Secretario Académico

Rogelio Villarreal Elizondo
Secretario de Extensión y Cultura

Diseño de portada: Dr. Marco A. Alvarado Vázquez

TÓPICOS SELECTOS DE BOTÁNICA 3
Ecología y desarrollo sustentable, botánica aplicada,
fisiología, sistemática y florística.

Primera edición: 2007

© Marcela González Álvarez
Sergio Manuel Salcedo Martínez

© Universidad Autónoma de Nuevo León

ISBN: 970-694-414-1

Impreso en México
Printed in Monterrey, México

FORMACIÓN DE UNA COLECCIÓN DE HONGOS NATIVOS DEL NORESTE DE MÉXICO Y EXPLORACIÓN DE SU POTENCIAL SOCIOECONÓMICO

SERGIO M. SALCEDO MARTÍNEZ*, MARCELA GONZÁLEZ ÁLVAREZ*, JOSÉ S. GARCÍA ALVARADO**, J. GUADALUPE GUTIÉRREZ SOTO***, IRENE CORTINA SÁNCHEZ***, CARLOS E. HERNÁNDEZ LUNA***

*Herbario, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL

** Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos. E-mail: santos@microbiosymas.com

***Laboratorio de Bioquímica. E-mail: chernandez@fcb.uanl.mx

San Nicolás de los Garza, N. L., México. E-mail: checosalcedo@yahoo.com.mx

La micología es el estudio de los hongos. Los hongos verdaderos se agrupan en el Reino Fungi o Eumycota y son organismos eucariotas, unicelulares o pluricelulares, heterótrofos que presentan digestión extracelular y nutrición saprobia, provistos de paredes celulares de quitina y β -glucanos, de aspecto comúnmente filamentoso y que producen esporas en alguna etapa de su ciclo vital. Comprenden 4 phyla que se reconocen por el tipo de esporas que producen: Los Ascomycota son el phylum más numeroso y sus esporas sexuales se desarrollan dentro de ascas en forma de sacos alargados. Los Basidiomycota producen sus esporas sexuales en el exterior de filamentos o hifas especializadas ensanchadas hacia la punta llamadas basidias. Los Chytridiomycota a diferencia de los dos grupos anteriores son formas acuáticas y sus esporas son realmente gametos móviles (zoosporas) provistas generalmente de

un solo flagelo posterior en forma de látigo (opistoconte). En los Zygomycota la zygospora es una estructura de resistencia producto de la fusión de dos hifas diferenciadas en gametangios. Algunos grupos anteriormente considerados dentro del Reino Fungi como los Myxomycota y los Oomycota han sido segregados a partir de 1994 a los Reinos Protista y Chromista, respectivamente, basándose en la presencia de celulosa en la composición química de sus paredes celulares, la forma de sus crestas mitocondriales, que no es aplanada, la presencia de flagelos diferentes al tipo opistoconte en sus esporas y otras evidencias moleculares (Kirk *et al.*, 2001).

Se estima que el número total de especies de hongos verdaderos en el mundo es superior a 1.6 millones, de las cuales se han descrito alrededor de 64,000. No obstante que cada año se agregan 700 nuevas espe-

cies a la lista, es evidente la falta de micólogos en el mundo para el estudio de este Reino tan diverso (Carlile *et al.*, 2001). Para México, existe un total estimado de 200,000 especies de hongos, de las cuales se conocen apenas alrededor de 7,000 (Cifuentes *et al.*, 2004) por lo que la obtención de inventarios regionales es de suma importancia para el conocimiento del recurso.

La principal actividad benéfica de los hongos en la naturaleza es la descomposición de la materia orgánica. Al hacerlo contribuyen al ciclo del nitrógeno y del carbono. Aunque esta actividad también la realizan las bacterias, el reciclaje del carbono contenido en los dos polímeros naturales más abundantes del planeta, la celulosa y la lignina, presentes en estructuras vegetales como la madera, es una responsabilidad que cumplen principalmente los hongos. Además, las micorrizas o asociaciones que forman algunos hongos con las raíces de la mayoría de los árboles, aumentan significativamente su área de absorción, permitiéndoles a éstos últimos un crecimiento saludable, más rápido y vigoroso, ya que promueven una asimilación más eficiente de formas nitrogenadas y sales minerales.

Sin embargo, la actividad saprótrófica de los hongos también causa importantes pérdidas en la agricultura y las industrias alimentaria, energética, de pinturas, del calzado y del vestido, al atacar sustratos como granos, todo tipo de alimentos y bebidas, combustibles, solventes, cueros y telas.

Algunas especies parásitas de plantas o animales se consideran nocivas, ya que anualmente ocasionan enormes pérdidas agrícolas, forestales y pecuarias; mientras que otras especies se consideran benéficas, ya que pueden utilizarse en el control biológico de malezas,

nemátodos, insectos y aún otros hongos considerados como plagas agrícolas. Las especies parásitas del ser humano llegan a causar serios problemas de micosis en la piel y mucosas. En ocasiones afectan las vías respiratorias gravemente u ocasionan septicemia o causan meningitis, de tal forma que pueden llegar a causar la muerte.

En el ámbito industrial, la actividad enzimática extracelular de los hongos tradicionalmente se ha empleado en la obtención de alimentos fermentados (salsa de soya, tempe, sufu), la maduración de quesos (roquefort, gorgonzola, brie, danés, camembert) y la elaboración de pan y bebidas alcohólicas (cerveza, vino, sake, whisky). Con el desarrollo de la biotecnología el empleo de los hongos para obtener productos metabólicos se ha diversificado. Actualmente se emplean reactores para la obtención de proteína unicelular, vitaminas (riboflavina), alcohol industrial, ácidos orgánicos (ácido cítrico, fumárico, glucónico y otros), enzimas (glucoamilasas para producir jarabes de alta fructosa, glucanasas y pectinasas para clarificar cerveza y jugos de frutas respectivamente, proteasas y lipasas como aditivos de detergentes, nucleasas como mejoradores de sabor en carnes, entre otras), metabolitos primarios (nucleótidos, aminoácidos, polisacáridos y grasas) y metabolitos secundarios como antibióticos (penicilina, cefalosporina, griseofulvina, sordarina), medicamentos reductores del colesterol (mevastatina, lovastatina), inmunosupresores para reducir el rechazo en trasplantes de órganos (ciclosporina A), alcaloides (ergotamina para el tratamiento de migrañas, ergometrina para aumentar las contracciones en el parto), fitoreguladores (giberelinas) y fungicidas agrícolas (strobilurinas) (Carlile *et al.*, 2001).

Las setas son macromicetos con un cuerpo fructífero característico grande como para verse a simple vista y tomarse con la mano. De ellas se estima existen 140,000 especies y se conocen 22,000 y se estima que existen 7,000 especies todavía no descritas que podrían ser benéficas a la humanidad (Lindequist *et al.*, 2005). Entre las setas, 2,000 especies son comestibles en diferente grado (Chang, 1999). La producción anual de setas para alimento humano supera los 6 millones de toneladas, registra importantes aumentos en la última década y se basa en la explotación de una decena de especies, entre las que destacan *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes**, *Pleurotus spp.**, *Auricularia spp.*, *Flammulina velutipes**, *Volvariella volvacea*, *Tremella spp.**, *Hypsizygus marmoreus* y *Grifola frondosa** (Carlile *et al.*, 2001). La mayoría de estos hongos, además de ser comestibles presentan propiedades funcionales (*). Además, la creciente producción de las especies de setas medicinales pertenecientes a géneros como *Ganoderma*, *Trametes*., *Agrocybe*, *Auricularia*, *Calvatia*, *Flammulina*, *Hericium*, *Hypholoma*, *Inonotus*, *Lentinus*, *Lenzites*, *Polyporus*, *etc.* se espera que llegue en breve a un florecimiento debido a la economía de los sustratos de producción y la relativa simplicidad de los métodos de cultivo (Smith *et al.*, 2002; Stamets, 2000). El desarrollo de resistencia a antibióticos, el resurgimiento de enfermedades que se creían erradicadas y el incesante tráfico aéreo de personas desde sitios antes remotos, ha impulsado la búsqueda de nuevas sustancias bioactivas en las setas, facilitando la tarea las nuevas técnicas químicas de purificación. De tal forma que hongos empleados en la medicina tradicional de diferentes culturas han probado su utilidad como productores de

compuestos con actividades antimicrobiana, antiviral, antitumoral, como inmunomoduladores, citostáticas, inmunosupresora, antioxidante, hipoglicémica, antiinflamatoria, hepatoprotectora. Entre el 80 y 85 % de los productos de las setas medicinales se obtienen de cuerpos fructíferos cultivados o recolectados, pocos se basan en extractos del micelio o filtrados de cultivos (Lindequist *et al.* 2005).

Así, en la última década, a la importancia ecológica, alimenticia y médica tradicional y la de fermentaciones industriales utilizando hongos mitosporicos, se ha sumado un nuevo valor, el de la producción de metabolitos con actividad biológica por setas. Estos pueden ser como se menciona arriba sustancias con actividad antimicrobiana, citotóxica (antitumoral) o que incrementan la respuesta inmune o bien, enzimas, colorantes y aceites esenciales (utilizados como saborizantes y aromas) (Brizuela *et al.*, 1998).

Nuevo León posee una gran diversidad de macromicetos posiblemente como resultado del desarrollo de diferentes ecofisiologías adaptadas a los variados microambientes que se presentan en sus 3 provincias biogeográficas: la planicie costera, la Sierra Madre Oriental y el altiplano (Alanís *et al.*, 1996). Esta diversidad debe reflejarse en las Colecciones Micológicas, las cuales contienen ejemplares secos que conservan las características distintivas de su especie y sirven de referencia contra la cual se puede comparar las características de nuevos ejemplares. Además de este valor taxonómico, la información de la etiqueta de colecta es esencial en el desarrollo de estudios sobre la ecología y distribución fúngicas. Las colecciones de micelios vegetativos vivos, aunque no poseen las caracte-

terísticas de los cuerpos fructíferos (setas), nos brindan la oportunidad de estudiar la biología y metabolitos de los hongos. La colección micológica (UNL) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, tiene alrededor de 50 años, es una colección de referencia constituida por cuerpos fructíferos colectados en la región noreste y otros estados del país, pero no estaba ordenada y esto limitaba su utilidad.

Los objetivos planteados en el presente trabajo fueron: ordenar la colección de setas de basidiomicetos en una forma que facilitara su consulta, elaborar un archivo electrónico con la información de colecta de los ejemplares ya presentes y que además incluyese fotografías y descripciones morfológicas de las nuevas adiciones y formar un cepario de especies nativas de basidiomicetos de Nuevo León aisladas de los cuerpos fructíferos antes de ser herborizadas y depositadas en la colección (lo cual permite una mayor certeza en la identificación al respaldarla por la fase sexual). La utilidad de lo anterior es contar para cada especie con un registro detallado que respalde su identificación y facilite en cualquier momento su consulta, permitiendo ofrecer a la comunidad una colección micológica y un cepario, que sirvan de apoyo en sus investigaciones sobre la taxonomía, biología y química de productos naturales en un grupo difícil, interesante y diverso, como es el de los hongos. Además, en un intento inicial por conocer la utilidad y potencial económico de las especies nativas, hemos desarrollado una línea de investigación sobre nuestros cultivos de basidiomicetos nativos buscando aquéllos potencialmente útiles en procesos de biorremediación de efluentes contaminados por colorantes sintéticos o con actividad antimicrobiana sobre patógenos

METODOLOGÍA

La Colección UNL. Los ejemplares de hongos y líquenes en el herbario UNL fueron separados por géneros y especies, ordenados alfabéticamente y depositados en cajas de cartón. Con la información de las etiquetas de colecta de los ejemplares se elaboró una base de datos en Excell y se generó una lista con los géneros para Nuevo León. La importancia de cada uno de los géneros fue entonces investigada.

Reactivos. Todos los compuestos químicos utilizados fueron grado reactivo, los medios de cultivo de la marca Difco y los demás químicos, de la casa Sigma o CTR Scientific. Las soluciones fueron preparadas en agua bidestilada de laboratorios Monterrey, S.A. Todos los medios se esterilizaron con autoclave a 121°C por 15 min o por filtración Millipore (0.45µm). El aislamiento y purificación de cepas se realizó en cajas petri desechables de 90 mm de diámetro conteniendo 20 ml de medio de cultivo.

Colecta de cuerpos fructíferos. La colecta de cuerpos fructíferos se realizó en las diferentes provincias fisiográficas del Estado de Nuevo León con un muestreo oportunista. Los sitios y fechas de colecta se seleccionaron previamente en base a la información de las fichas del material herborizado de la colección micológica que requería reposición. Las coordenadas geográficas de los puntos de colecta se determinaron con un geoposicionador (Magellan), las áreas de colecta se recorrieron exhaustivamente y a los carpóforos encontrados se les asignó una clave bajo la cual se anotó el número de colecta, las coordenadas, tipo de sustrato, las características macroscópicas, resultados de reac-

ciones microquímicas coloridas (Meltzer, KOH, CuSO₄) (Singer, 1986) y número de registro fotográfico. Los ejemplares fueron herborizados siguiendo la metodología de Wu *et al.* (2004).

Aislamiento y purificación de micelios. Para el aislamiento y purificación de los micelios vegetativos, de cada uno de los carpóforos se tomaron tres fragmentos de la parte interna del cuerpo fructífero, de aproximadamente 3 mm de diámetro. Fueron lavados por 1 min en peróxido de hidrógeno al 3 %, enjuagados en agua estéril y sembrados en cajas petri con medio YMGA (4g glucosa, 4g extracto de levadura, 10g extracto de malta y 15g agar por litro de medio) y 4 mg/l de benomil, disueltos en 2 ml de solución 1:1 acetona-70% etanol que se agregaron asépticamente (Millipore 0.45µm). La siembra se hizo por triplicado y las cajas petri se incubaron a 28°C. Las colonias que crecieron se resembraron en YMGA hasta estar puras. Los aislados puros constituyen el cepario y se conservan en tubos con medio YMGA a 4°C con resiembras cada dos meses.

Identificación. La identificación se realizó siguiendo las claves de Arora (1985), Bessette *et al.* (1997), Guzmán (1978), Guzmán (2003), Largent y Baroni (1988), Metzler y Metzler (1992), Singer (1986).

Pruebas de capacidad ligninolítica y decolorante. Estas pruebas se realizaron en cajas de petri con el medio de bran flakes (20g All Bran® y 15g de agar por litro de amortiguador de fosfato monobásico de potasio 60 mM, pH 6), el cual es inductor de enzimas ligninolíticas y adicionando 0.02% del colorante polimérico Poly-R 478 o alguno de 9 colorantes (Azo: Rojo Ácido 44 AR44, Rojo Ácido 183 AR183, Negro Reactivo 5 RB5, Naranja II OII, Indigoide: Índigo Carmín. Antraquinónico: Verde

Ácido 27 AG27, Azul Brillante Reactivo de Remazol RBBR, Triarilmetano: Azul Brillante Reactivo BBR, Cristal Violeta CV). El diámetro del área de desaparición del color bajo la superficie cubierta por micelio se consideró indicativo de la capacidad ligninolítica del hongo para el caso del Poly-R-478 y de la capacidad decolorante para el resto de los colorantes. Los aislados que mostraron la mayor eficiencia decolorante en placa se seleccionaron para realizar ensayos de decoloración en cultivos sumergidos en medio de bran flakes líquido conteniendo 50 ppm de colorante. El colorante se agregó a los 6 días de crecimiento, cuando la concentración de lacasas es evidente y las peroxidasas aún no se detectan, basándonos en resultados iniciales que indicaron a las primeras como principales responsables de la actividad decolorante. La confirmación de su participación en el proceso se verificó con ensayos de decoloración *in vitro* con mezclas de reacción conteniendo preparaciones libres de micelio y el colorante, en amortiguador de acetato 200 mM y a pH óptimo de la enzima (3.5-4). La decoloración se determinó siguiendo la reducción en el pico de absorbancia de cada colorante medida en un espectrofotómetro Shimadzu UV mini 1240, haciéndolo a diferentes tiempos.

Pruebas antimicrobianas. Se realizaron por duplicado ensayos con extractos de acetato de etilo, obtenidos a partir de cultivos sumergidos de 10 días de crecimiento desarrollados en 100 ml de medio EmG (10% extracto de malta y 2% glucosa). Para cada aislado, 100 µL del extracto fueron probados contra las bacterias patógenas que contaminan alimentos *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* y *Shigella sp* (amablemente proporcionadas por el Laboratorio de Fisiología

y Bioquímica de Microorganismos de nuestra Facultad) en placas con agar Muller Hinton. La actividad antimicrobiana se determinó midiendo el diámetro de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de los pozos de 0.5 mm donde fue depositado el extracto.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Colección UNL. Se ordenó alfabéticamente por Género un total de 8,100 ejemplares de hongos y líquenes de la Colección Micológica. Su inspección visual nos permitió estimar que alrededor de un 12% de los ejemplares requerían reposición. Muchos de los ejemplares dañados fueron colectados en el Estado de Nuevo León, pero una gran cantidad procede de los Estados de Durango y México, entre otros, por lo que nos centramos en la reposición de los ejemplares colectados en nuestro Estado. Hasta ahora hemos incorporado 128 cuerpos fructíferos a la colección. El número de ejemplares dañados y la procedencia de los ejemplares hacen necesario un alto presupuesto y un esfuerzo continuo para lograr su total reposición. Con la información de colecta en las etiquetas de los ejemplares se formó un archivo electrónico de la Colección. Para los nuevos carpóforos además de esta información se agregaron las características distintivas de la especie y fotografías de cada ejemplar.

El número de basidiomicetos representados en la Colección UNL es de 437 especies, comprendidas en 135 géneros y 57 familias. En la Tabla 1 se resume la información de la Colección Micológica UNL, enseguida de los nombres de algunas especies aparece la sino-

nimia válida basándonos en Kirk *et al.* (2001). En ella están representadas especies que son venenosas, comestibles, alucinógenas, medicinales o que atacan la madera, ocasionando algún tipo de podredumbre. La Tabla 2 resume la importancia de los géneros de Basidiomicetos de Nuevo León en la Colección UNL. Algunos géneros poseen exclusivamente especies comestibles, como *Calvatia*, *Romaria*, *Pleurotus*, *Lycoperdon*, *Hericium*, *Craterellus* and *Cantharellus* mientras que otros como *Boletus*, *Strobilomyces*, *Lactarius*, *Suillus*, *Lepiota*, *Armillariella*, *Coprinus*, *Clathrus* y *Clytocibe*, poseen solo algunas especies, por lo que se debe tener experiencia en su identificación para evitar envenenamientos con especies similares sobre todo en lo que respecta a los géneros *Boletus*, *Russula* y *Lactarius* y sobre todo, para reconocer las especies venenosas de *Amanita*, *Chlorophyllum*, *Stropharia*, *Hebeloma*, *Paxillus*, *Inocybe* and *Cortinarius* o las alucinógenas de *Coprinus* que se presentan en el estado. Los géneros *Auricularia*, *Fomitopsis*, *Ganoderma*, *Lycoperdon*, *Pleurotus*, *Podaxis*, *Polyporus*, *Pycnoporus*, *Trametes* y *Schizophyllum* tienen especies con propiedades medicinales. Los hongos que ocasionan podredumbre en la madera se distribuyen en los géneros *Armillariella*, *Gleophyllum*, *Daedalea/Daedaleopsis*, *Eichleriella*, *Fomes*, *Fomitopsis*, *Phellinus*, *Ganoderma*, *Hexagonia*, *Hymenochaete*, *Inonotus*, *Lenzites*, *Phlebia*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Polyporus*, *Pycnoporus*, *Poria*, *Trametes*, *Trichaptum*, *Phaeolus*, *Coltricia*, *Stereum* y *Schizophyllum*. Ciertas esencias y sabores típicos son utilizados en la identificación de los hongos y las moléculas responsables de estas propiedades podrían tener aplicación en las industrias cosmética. Especies

odoríferas se encuentran en los géneros *Polyporus*, *Phellinus*, *Stereum* y *Daedalea*.

Capacidad ligninolítica y decolorante de los aislados nativos. Se logró aislar y purificar un total de 85 micelios vegetativos de basidiomicetos nativos. Los resultados de los ensayos en placa con ellos, permitieron seleccionar inicialmente 10 aislados. Los de decoloración en cultivos sumergidos e *in vitro* los redujeron a cinco como los de mejor capacidad ligninolítica y decolorante: el aislado LE13 y cuatro más pertenecientes al género *Trametes*: *T. hispida* (LE95), *T. maxima* (CU1), *T. trogii* (CS63) y *T. villosa* (CS5) (Tabla 3). CU1 y CS5 fueron finalmente seleccionados por su mejor desempeño y actualmente se realiza la purificación de sus lacasas. La estabilidad y capacidad decolorante de CS5 lo convierten en nuestro mejor candidato hasta ahora para ser usado en biorremediación de efluentes contaminados con colorantes sintéticos.

Pruebas antimicrobianas. Los resultados de actividad de extractos de acetato de etilo contra patógenos que contaminan alimentos se muestran en la Tabla 4. Cinco aislados tuvieron efecto bactericida contra las tres bacterias, sin embargo, el aislado que mostró la mejor actividad bactericida fue el de *Trametes* sp (RC2).

CONCLUSIONES

Se ordenó alfabéticamente por Género los 8,100 ejemplares de hongos y líquenes de la Colección Micológica. Aunque se han incorporado 128 nuevos carpóforos, se estima que el 12% de los ejemplares requiere reposición, pero su número y procedencia hacen necesario un alto presupuesto y un esfuerzo continuo para lograr

su total reposición,

Con la información de campo, las características distintivas de las especies y fotografías de cada ejemplar añadido a la Colección, se formó un archivo electrónico de la Colección.

La diversidad de macrobasidiomicetos en Nuevo León es elevada, como se deduce del número de Familias (44), géneros (135) y especies (437) en la Colección UNL.

Se integró una colección de 85 aislados de basidiomicetos nativos. En los ensayos de ligninólisis, decoloración y antibiosis, dos de los aislados *Trametes villosa* (CS5) y *T. maxima* (CU1) mostraron propiedades promisorias para ser utilizados en biorremediación y uno *Trametes* sp (RC2) contra microorganismos patógenos que contaminan alimentos, por lo que es lógico pensar que existan más especies nativas de nuestro estado, cuyo valor nutricional, medicinal y comercial llegue a recompensar los esfuerzos de subsecuentes estudios de prospección

REFERENCIAS

- Alanís Flores, G. J., G. Cano y Cano, M. Rovala Merino. 1996. Vegetación y flora de Nuevo León. Una guía botánico-ecológica. Impresora Monterrey, S. A. de C. V. México. 251 pp.
- Arora, D. 1985. Mushrooms Demystified. Ten Speed Press. Berkeley, CA. USA. 959 pp.
- Bessette, A. E., A. R. Bessette & D. W. Fischer. 1997. Mushrooms of Northeast North America. 1^o. Edition. Syracuse University Press. 640 pp.
- Brizuela, M. A., L. García, L. Pérez y M. Mansur. 1998. Basidiomicetos: una nueva fuente de metabolitos secundarios. Rev. Iberoam. Micol. 15:69-74.

Tabla 1. Basidiomicetos en la colección UANL

Reino Fungi	38 Coprinus comatus	Género 26. Armillaria
Phylum Basidiomycota	39 Coprinus niveus	77. Armillaria (Armillariella) sp
Claase Basidiomycetes	Género 15. Psathyrella	78. Armillaria tabescens
Subclase Agaricomycetidae	40. Psathyrella sp	(=Armillariella tabescens)
Orden 1. Agaricales	41 Psathyrella campestris	Género 27. Baeospora
Familia 1. Agaricaceae	Familia 5. Cortinariaceae	79. Baeospora sp
Género 1. Agaricus	Género 16. Cortinarius	80. Baeospora myosura
1. Agaricus (Psalliota) sp	42. Cortinarius sp	Género 28. Cryptotrama
2. Agaricus anversis	Género 17. Crepidotus	81. Cryptotrama crispoleura
3. Agaricus augustus	43. Crepidotus sp	(=Xerulina crispoleura)
4. Agaricus bisporus	44. Crepidotus mollis	Género 29. Marasmius
5. Agaricus campestris	Género 18. Gymnopilus	82. Marasmius sp
6. Agaricus placomyces	45. Gymnopilus sp	83. Marasmius cladophyllus
7. Agaricus silvaticus	46. Gymnopilus aeruginosus	84. Marasmius rolula
8. Agaricus silvicola	Género 19. Inocybe	Familia 10. Nidulariaceae
9. Agaricus subperonatus	47. Inocybe sp	Género 30. Crucibulum
10. Agaricus subrufescens	48. Inocybe confusa	85. Crucibulum sp
11. Agaricus volvatus	49. Inocybe fastigiata	86. Crucibulum laeve
12. Agaricus xanthodermis	Familia 6. Entolomataceae	(=C. vulgare)
Género 2. Chlorophyllum	Género 20. Entoloma	Género 31. Cyathus
13. Chlorophyllum sp	50. Entoloma (Rhodophyllum) sp	87. Cyathus sp
14. Chlorophyllum molybdites	51. Entoloma lividus	88. Cyathus olla
Género 3. Gyrophragmium	(=Rhodophyllum lividus)	89. Cyathus stercoreus
15. Gyrophragmium sp	52. Entoloma mexicanus	90. Cyathus striatus
Género 4. Lepiota	(=Rhodophyllum mexicanus)	Género 32. Nidularia
16. Lepiota sp	53. Entoloma violaceobrunneum	91. Nidularia sp
17. Lepiota acutesquamosa	(=Rhodophyllum violaceobrunneum)	92. Nidularia fasciculata
18. Lepiota americana	Familia 7. Hydrangiaceae	Familia 11. Phelloriniaceae
19. Lepiota clypeoriana	Género 21. Laccaria	Género 33. Phellorinia
20. Lepiota cristata	54. Laccaria lacata	93. Phellorinia inguinans
21. Lepiota procera	Familia 8. Lycoperdaceae	Familia 12. Pleurotaceae
22. Lepiota rubroolivacea	Género 22. Bovista	Género 34. Hohenbuehelia
Género 5. Leucoganicus	55. Bovista sp	94. Hohenbuehelia sp
23. Leucoganicus caepesites	Género 23. Calvatia	Género 35. Pleurotus
24. Leucocoprinus sp	56. Calvatia sp	95. Pleurotus sp
25. Leucocoprinus caepesites	57. Calvatia bovista	Familia 13. Pluteaceae
26. Leucocoprinus lefasites	58. Calvatia craniformis	Género 36. Amanita
Género 6. Macrolepiota	59. Calvatia cyathiformis	96. Amanita sp
27. Macrolepiota rachiodes	60. Calvatia gigantea	97. Amanita caesarea
Género 7. Montagnea	61. Calvatia utiformis	98. Amanita muscaria
28. Montagnea arenaria	(=Calvatia caelata)	99. Amanita pantherina
Género 8. Podaxis	Género 24. Disciella	100. Amanita polypiramis
29. Podaxis sp	62. Disciella sp	101. Amanita rubescens
30. Podaxis pilularis	63. Disciella bovista	102. Amanita softiana
Género 9. Secotium	64. Disciella candida	103. Amanita strobiliformis
31. Secotium agaricoides	Género 25. Lycoperdon	104. Amanita vaginata
Familia 2. Bolbitaceae	65. Lycoperdon sp	(=Amanitopsis vaginata)
Género 10. Bolbitis	66. Lycoperdon candidum	105. Amanita viriosa
32. Bolbitis viellinus	67. Lycoperdon depressum	Género 37. Pluteus
Género 11. Hebeloma	68. Lycoperdon marginatum	106. Pluteus cervinus
33. Hebeloma sp	69. Lycoperdon muscorum	Familia 14. Schizophyllaceae
34. Hebeloma fastibile	70. Lycoperdon pedicelatum	Género 38. Schizophyllum
Género 12. Panaeolus	71. Lycoperdon peridium	107. Schizophyllum commune
35. Panaeolus sp	(=Lycoperdon gemmatum)	108. Schizophyllum fasciatum
Familia 3. Clavariaceae	72. Lycoperdon pulcherrimum	109. Schizophyllum umbinum
Género 13. Clavulinopsis	73. Lycoperdon pusillum	
36. Clavulinopsis amethystinoides	74. Lycoperdon pyriforme	
37. Clavulinopsis comiculata	75. Lycoperdon subcarnatum	
Familia 4. Coprinaceae	76. Lycoperdon umbrinum	
Género 14. Coprinus	Familia 9. Marasmiaceae	

<p>Familia 15. Strophariaceae Género 39. Psilocybe 110. <i>Psilocybe</i> (<i>Hypholoma</i>) sp 111. <i>Psilocybe</i> (<i>Nematoloma</i>) sp 112. <i>Psilocybe fasciculare</i> (= <i>Nematoloma fasciculare</i>) 113. <i>Psilocybe neurantaca</i> (= <i>Nematoloma aurantiaca</i>) 114. <i>Psilocybe sublaetentium</i> (<i>Nematoloma sublaetentium</i>) <i>Psilocybe</i> sp 115. <i>Psilocybe coprophyla</i> Género 40. Pholiota 116. <i>Pholiota</i> sp <i>Pholiota</i> (<i>Flammula</i>?) sp 117. <i>Pholiota spumosa</i> Familia 16. Tricholomataceae Género 41. Clitocybe 118. <i>Clitocybe gibba</i> Género 42. Collybia 119. <i>Collybia</i> sp 120. <i>Collybia alkalivirens</i> Género 43. Hygrophorus 121. <i>Hygrophorus</i> sp 122. <i>Hygrophorus olivaceoalbus</i> 123. <i>Hygrophorus sordidus</i> Género 44. Leucopaxillus 124. <i>Leucopaxillus amarus</i> Género 45. Lyophyllum 125. <i>Lyophyllum decastes</i> Género 46. Mycena 126. <i>Mycena</i> sp 127. <i>Mycena galopus</i> 128. <i>Mycena leana</i> Género 47. Panellus 129. <i>Panellus</i> (<i>Dicyopanus</i>) sp 130. <i>Panellus pusillus</i> (= <i>Dicyopanus pusillus</i>) Género 48. Phaeolepiota 131. <i>Phaeolepiota aurea</i> Género 49. Tricholoma 132. <i>Tricholoma</i> sp 133. <i>Tricholoma flavovirens</i> 134. <i>Tricholoma sejunctum</i> 136. <i>Tricholoma terreum</i> Género 50. Tricholoporum 137. <i>Tricholoporum</i> sp Género 51. Trogia 139. <i>Trogia</i> sp Familia 17. Tulostomataceae Género 52. Batarrea 139. <i>Batarrea</i> sp 140. <i>Batarrea diguetii</i> 141. <i>Batarrea sleveneri</i> 142. <i>Batarreaoides diguetii</i> Género 53. Tulostoma 143. <i>Tulostoma</i> sp 144. <i>Tulostoma albicans</i> 145. <i>Tulostoma opacum</i></p>	<p>146. <i>Tulostoma verrucosum</i> Orden Auriculariales Familia 18. Auriculariaceae Género 54. Auricularia 147. <i>Auricularia</i> sp 148. <i>Auricularia auricula</i> 149. <i>Auricularia delicata</i> 150. <i>Auricularia elastica</i> 151. <i>Auricularia intramembranosa</i> 152. <i>Auricularia mesenterica</i> 153. <i>Auricularia politricha</i> Orden Boletales Familia 19. Boletaceae Género 55. Boletellus 154. <i>Boletellus rusellii</i> Género 56. Boletus 155. <i>Boletus edulis</i> 156. <i>Boletus fraternus</i> 157. <i>Boletus lundae</i> 158. <i>Boletus miniato-olivaceus</i> 159. <i>Boletus pinicola</i> 160. <i>Boletus rabelius</i> 161. <i>Boletus regius</i> 162. <i>Boletus rubellus fraternus</i> Género. <i>Boletus</i> (<i>Xerocomus</i>) sp 163. <i>Boletus illudens</i> (= <i>Xerocomus illudens</i>) 164. <i>Boletus truncatus</i> (= <i>Xerocomus truncatus</i>) Género. <i>Boletus</i> sp Género 57. Leccinum 165. <i>Leccinum chromapes</i> 166. <i>Leccinum crocipodium</i> 167. <i>Leccinum auranta</i> 168. <i>Leccinum luteum</i> 169. <i>Leccinum rugosiceps</i> Género 58. Strobilomyces 170. <i>Strobilomyces</i> sp 171. <i>Strobilomyces confusus</i> 172. <i>Strobilomyces floccopus</i> 173. <i>Strobilomyces strobilaceus</i> Género 59. Tylopilus 174. <i>Tylopilus</i> sp 175. <i>Tylopilus indecisus</i> 176. <i>Tylopilus plumbioliaceus</i> 177. <i>Tylopilus tabacinus typicus</i> Familia 20. Gyroporaceae Género 60. Gyroporus 178. <i>Gyroporus</i> sp 179. <i>Gyroporus castlaneus</i> Familia 22. Melanogastraceae Género 61. Melanogaster 180. <i>Melanogaster</i> sp Familia 23. Octavianinae Género 62. Octavianina 181. <i>Octavianina</i> sp Familia 24. Paxillaceae Género 63. Gyrodon</p>	<p>182. <i>Gyrodon meruloides</i> Familia 25. Rhizogogonaceae Género 64. Rhizogogon 183. <i>Rhizogogon</i> sp 184. <i>Rhizogogon abietis</i> 185. <i>Rhizogogon couchii</i> 186. <i>Rhizogogon lutescens</i> 187. <i>Rhizogogon ponderosus</i> 188. <i>Rhizogogon rogersii</i> 189. <i>Rhizogogon subaustralis</i> 190. <i>Rhizogogon ventricosporus</i> Familia 26. Sclerodermataceae Género 65. Astraeus sp 191. <i>Astraeus hygrometricus</i> 192. <i>Astraeus triplex</i> (= <i>Gastrum triplex</i>) Género 66. Pisolithus 193. <i>Pisolithus tinctorius</i> Género 67. Scleroderma 194. <i>Scleroderma</i> sp 195. <i>Scleroderma aetolatum</i> 196. <i>Scleroderma albidum</i> 197. <i>Scleroderma cepa</i> 198. <i>Scleroderma hypogaeum</i> 199. <i>Scleroderma lycoperdoides</i> 200. <i>Scleroderma marginatum</i> 201. <i>Scleroderma verrucosum</i> Familia 27. Suillaceae Género 68. Suillus sp 202. <i>Suillus americanus</i> 203. <i>Suillus granulatus</i> 204. <i>Suillus lakei</i> 205. <i>Suillus luteus</i> 206. <i>Suillus tomentosus</i> Orden Cantharellales Familia 28. Cantharellaceae Género 69. Cantharellus 207. <i>Cantharellus</i> sp 208. <i>Cantharellus cibarius</i> 209. <i>Cantharellus tubaeformis</i> Género 70. Craterellus 210. <i>Craterellus</i> sp 211. <i>Craterellus comucupoides</i> 212. <i>Craterellus fallax</i> Familia 29. Clavuliaceae Género 71. Clavulina 213. <i>Clavulina rugosa</i> Orden Dacrymycetales Familia 30. Dacrymycetaceae Género 72. Dacrymyces 214. <i>Dacrymyces</i> sp Género 73. Dacryopinax 215. <i>Dacryopinax spathulana</i> Orden Hymenochaetales Familia 31. Hymenochaetales Género 74. Hymenochaete 216. <i>Hymenochaete</i> sp</p>
--	---	--

217. Hymenochaete badioferuginea	253. Fomitopsis cajanderi (=Fomes subroseus)	287. Favolus rhipidium
218. Hymenochaete pinnatifida	254. Fomitopsis pinicola	Género 100. Fomes
219. Hymenochaete rubiginosa	Familia 38. Ganodermataceae	288. Fomes sp
220. Hymenochaete salleei	Género 86. Amauroderma	289. Fomes badius
221. Hymenochaete labacina	255. Amauroderma sp	290. Fomes calcitratus
Género 75. Inonotus	Género 87 Ganoderma	291. Fomes everhartii (= Phellinus everhartii)
222. Inonotus hispidus	256. Ganoderma sp	292. Fomes fastuosus
223. Inonotus radiatus	257. Ganoderma annulans	293. Fomes linteus
Orden Phallales	258. Ganoderma aplanatum	294. Fomes lividus
Familia 32. Geastraceae	259. Ganoderma brownii	295. Fomes melanoporus
Género 76. Geastrum	260. Ganoderma curtisi	296. Fomes nobilissimus
224. Geastrum sp	261. Ganoderma lobatum	297. Fomes pini
225. Geastrum campestre	262. Ganoderma lucidum	298. Fomes pomacius (= Phellinus pomaceus)
226. Geastrum coronatum	263. Ganoderma oregonense	299. Fomes rimosus (= Phellinus rimosus)
227. Geastrum fibrinatum	264. Ganoderma sessile	(= Phellinus robinaei)
228. Geastrum limbatum	Familia 39. Gloeophyllaceae	300. Fomes robustus (=Phellinus robustus)
229. Geastrum minimum	Género 88. Gloeophyllum	301. Fomes rubinctus
230. Geastrum quadrifidum	265. Gloeophyllum sepiarium	302. Fomes roseus (=Fomitopsis rosea)
231. Geastrum rufescens	266. Gloeophyllum striatum	303. Fomes sancti
232. Geastrum sacatum	Familia 40. Haplopiaceae	304. Fomes sanjani
233. Geastrum triplex	Género 89. Bjerkandera	305. Fomes sclerodermus
234. Geastrum umbilicatum	267. Bjerkandera sp	306. Fomes scutellatus
Género 77. Mesophelopsis	Género 90. Spongipellis	307. Fomes swieteniae
235. Mesophelopsis sp	268. Spongipellis sp	308. Fomes ulmarius
Familia 33. Gomphaceae	Familia 41. Meruliaceae	309. Fomes umus
Género 78. Gomphus	Género 91. Chondrostereum	Género 101. Hexagonia
236. Gomphus floccosus	269. Chondrostereum purpureum	311. Hexagonia sp
Género 79 Clavariadelphus	Género 92. Phlebia	312. Hexagonia papyracea
237. Clavariadelphus pistillans	270. Phlebia (Merulius) sp	313. Hexagonia tenuis
Familia 34. Phallaceae	271. Phlebia pallens (=Merulius pallens)	314. Hexagonia variegata
Género 80. Clathrus	272. Phlebia tremellosus (=Merulius tremellosus)	315. Hexagonia hirta
238. Clathrus crispus	273. Phlebia incarnatus (=Merulius incarnatus)	Género 102. Lentinus
239. Clathrus ruber	Familia 42. Phanerochaetaceae	316. Lentinus
Género 81. Lysurus	Género 93. Lopharia	Género 103 Lenzites
240. Lysurus sphaerocephalus (=Simulium sphaerocephalus)	274. Lopharia omerascens	317. Lenzites sp
Familia 35. Ramariaceae	275. Lopharia papyrina	318. Lenzites betulina
Género 82. Ramaria	Género 94 Phanerochaete	Género 104. Panus
241. Ramaria sp	276. Phanerochaete affinis	319. Panus sp
242. Ramaria flava	277. Phanerochaete cremea	320. Panus badius
243. Ramaria formosa	278. Phanerochaete filamentosa	321. Panus conchatus
244. Ramaria stricta	279. Phanerochaete sulphurea	322. Panus crinitus
Orden Polyporales	Familia 43. Podoscyphaceae	323. Panus rufus
Familia 36. Corticiaceae	Género 95. Cotylidia	Género 105. Perenniporia
Género 83. Corticium	280. Cotylidia aurantiaca	324. Perenniporia sp
245. Corticium sp	281. Cotylidia diaphana	Género 106. Phaeolus
246. Corticium caeruleum (=Phaeocheum caeruleum)	282. Cotylidia undulata	325. Phaeolus schweinitzii
Familia 37. Fomitopsidaceae	Género 96. Cymatoderma	Género 107. Polyporus
Género 84 Daedalea	283. Cymatoderma caperacea	326. Polyporus sp ?
247. Daedalea sp	Familia 44. Polyporaceae	327. Polyporus abietinus (=Trichaptum abietinum)
248. Daedalea confragosa (Daedaleopsis confragosa)	Género 97. Cerrena	(=Hirschioporus abietinus)
249. Daedalea elegans (=D. ambigua)	284. Cerrena sp	328. Polyporus adustus
250. Daedalea palisoti	Género 98. Daedalopsis	
251. Daedalea quercina	Daedaleopsis confragosa	
252. Daedalea unicolor (=Cerrena unicolor)	Género 99. Favolus	
Género 85. Fomitopsis	285. Favolus sp	
	286. Favolus cubellatus	

329. <i>Polyporus albiceps</i>	377. <i>Trametes maxima</i>	407. <i>Russula</i> sp
330. <i>Polyporus anceps</i>	378. <i>Trametes rigida</i>	408. <i>Russula crustosa</i>
331. <i>Polyporus arcularius</i>	379. <i>Trametes trogii</i>	409. <i>Russula delicata</i>
332. <i>Polyporus azureus</i>	380. <i>Trametes pubescens</i>	410. <i>Russula foetens</i>
333. <i>Polyporus azureus</i> (= <i>Polyporus versicolor</i>)	381. <i>Trametes senialis</i>	411. <i>Russula lepida</i>
334. <i>Polyporus berkeleyi</i>	382. <i>Trametes vaniformis</i>	412. <i>Russula grata</i>
335. <i>Polyporus biennis</i>	383. <i>Trametes vellina</i>	413. <i>Russula sanguinea</i>
336. <i>Polyporus brumalis</i>	384. <i>Trametes versicolor</i>	414. <i>Russula virescens</i>
337. <i>Polyporus caesius</i> (= <i>Tyromyces caesius</i>)	385. <i>Trametes villosa</i>	Familia 54. Stereaceae
338. <i>Polyporus cinnamomeus</i>	Género 111. Trichaptum	Género 127. Laxitextum
339. <i>Polyporus corchiodoides</i>	<i>Trichaptum bifforme</i>	415. <i>Laxitextum roseo-carneum</i>
340. <i>Polyporus culicoides</i>	<i>Trichaptum fusco-violaceum</i>	Género 128. Stereum
341. <i>Polyporus dichrus</i>	Género 112. Tyromyces	416. <i>Stereum</i> sp
342. <i>Polyporus dryophila</i>	<i>Tyromyces caesius</i>	417. <i>Stereum complicatum</i>
343. <i>Polyporus dryadeus</i>	Familia 45. Podoscyphaceae	418. <i>Stereum frustulatum</i>
344. <i>Polyporus durescens</i>	Género 113. Cymatoderma	419. <i>Stereum guaspatum</i>
345. <i>Polyporus facicola</i>	386. <i>Cymatoderma</i> sp	420. <i>Stereum hirsutum</i>
346. <i>Polyporus fumosus</i>	(= <i>Cladodemis</i> sp)	421. <i>Stereum ostrea</i>
347. <i>Polyporus gilvus</i> (= <i>Phellinus gilvus</i>)	Familia 46. Sparassidaceae	422. <i>Stereum subpileatum</i>
348. <i>Polyporus glomeratus</i>	Género 114. Sparassis	Familia 55. Telephoraceae
349. <i>Polyporus hispidus</i> (= <i>Inonotus hispidus</i>)	387. <i>Sparassis orspa</i>	Género 129. Telephora
350. <i>Polyporus hydroides</i>	Familia 47. Steccherinaceae	423. <i>Telephora terrestris</i>
351. <i>Polyporus hirsutus</i>	Género 115. Irpex	Género 130. Phellodon
352. <i>Polyporus juniperinus</i>	388. <i>Irpex</i> sp	424. <i>Phellodon</i> sp
353. <i>Polyporus leucomelas</i> (= <i>Melanococcus leucomelas</i>)	389. <i>Irpex pachyodon</i> (= <i>Irpex mollis</i>)	Subclase Tremellomycetidae
354. <i>Polyporus licoides</i>	(= <i>Spongipellis pachyodon</i>)	Orden Tremellales
355. <i>Polyporus maximus</i>	Orden Russulales	Familia 56. Exidiaceae
356. <i>Polyporus obtusus</i>	Familia 48. Auriscalpiaceae	Género 131. Echiella
357. <i>Polyporus occidentales</i> (= <i>Trametes occidentales</i>)	Género 116. Auriscalpium	425. <i>Echiella</i> sp
358. <i>Polyporus palustris</i>	390. <i>Auriscalpium vulgare</i>	426. <i>Echiella levelliana</i>
359. <i>Polyporus perennis</i>	Género 117. Clavycorona	427. <i>Echiella macrspora</i>
360. <i>Polyporus pargamensis</i> (= <i>Trichaptum bifforme</i>)	391. <i>Clavycorona pyxidata</i>	Género 132. Exidia
(= <i>Hirschioporus pargamensis</i>)	392. <i>Clavycorona hypoxidata</i>	428. <i>Exidia</i> sp
361. <i>Polyporus picipes</i>	Género 118. Lentiniellus	Género 133. Tremellodendron
362. <i>Polyporus pinitius</i>	393. <i>Lentiniellus ursinus</i>	429. <i>Tremellodendron</i> sp
363. <i>Polyporus pubescens</i> (= <i>Trametes pubescens</i>)	Familia 49. Bondarzewiaceae	430. <i>Tremellodendron pallidum</i>
364. <i>Polyporus radiatus</i>	Género 120. Bondarzewia	Género 134. Tremiscus
365. <i>Polyporus subchartaceus</i>	394. <i>Bondarzewia berkeleyi</i>	431. <i>Tremiscus helvelloides</i>
366. <i>Polyporus sulphureus</i> (= <i>Laetiporus sulphureus</i>)	Género 121. Steccherium	(= <i>Phlogiotis helvelloides</i>)
367. <i>Polyporus tomentosus</i>	395. <i>Steccherium</i> sp	Familia 57. Tremellaceae
368. <i>Polyporus tulipiferae</i>	396. <i>Steccherium senatum</i>	Género 135. Tremella
369. <i>Polyporus villosus</i>	Familia 50. Hericiaceae	432. <i>Tremella</i> sp
Género 108. Poria	Género 122. Hericium	433. <i>Tremella fusiformis</i>
370. <i>Poria</i> sp	397. <i>Hericium</i> sp	434. <i>Tremella lutea</i>
371. <i>Poria taxicola</i>	398. <i>Hericium erinaceus</i>	435. <i>Tremella lutescens</i>
372. <i>Poria teneris</i>	Familia 51. Lachnodiaceae	436. <i>Tremella mesenterica</i>
Género 109. Pycnoporus	Género 123. Asterostroma	437. <i>Tremella reticulata</i>
373. <i>Pycnoporus sanguineus</i>	399. <i>Asterostroma ochroleucum</i>	
Género 110. Trametes	Familia 52. Peniophoraceae	
374. <i>Trametes</i> sp	Género 124. Peniophora	
375. <i>Trametes americana</i>	400. <i>Peniophora</i> sp	
376. <i>Trametes hispida</i>	401. <i>Peniophora albobadis</i>	
	402. <i>Peniophora gigantea</i>	
	403. <i>Peniophora sambuci</i>	
	404. <i>Peniophora sulfurea</i>	
	Familia 53. Russulaceae	
	Género 125. Lactarius	
	405. <i>Lactarius</i> sp	
	406. <i>Lactarius zonarius</i>	
	Género 126. Russula	

Tabla 2. Importancia de los géneros de basidiomicetos de Nuevo León presentes en la Colección UNL

Total de Géneros/ Porcentaje	Comestibles	Medicinales	Venenosos	Causantes de pudrición en madera	Alucinógenos	Productores de esencias o sabores
135	19	10	11	25	1	4
100	14	7	8	19	1	3

Tabla 3. Resultado de la búsqueda de aislados nativos con habilidades ligninolítica y decolorante

Aislados totales	Poly-R 478 + (Ligninolíticos)	Mejores decolorantes de <i>RBBR</i> , <i>AR44</i> y <i>CV</i>	Mejores decolorantes de <i>Indigo</i> , <i>AG27</i> , <i>OII</i> , <i>RB5</i> , <i>AR183</i> , <i>BBR</i>
85	71	10	5

Tabla 4. Resultado de la búsqueda de aislados nativos con actividad bactericida sobre patógenos que contaminan alimentos

	Bacterias patógenas		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Shigella sp</i>
Porcentaje de los aislados con actividad bactericida	68	58	46

Carlile, M. J., S. C. Watkinson, G. W. Gooday. 2001. The Fungi. 2nd Edition. Elsevier Academic Press. Cal. USA. 588 pp.

Chang, S. T. 1999. Global impact of edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 21st Century – non-green revolution. Int. J. Med. Mush. 1: 1-7.

Cifuentes J., Villegos, M., García, R., Vidal, G., Sierra, S. Valenzuela, G. Pérez, R y Morales E. 2004. Distribución de macromicetos: Una aproximación al análisis de áreas de endemismos. En: Biodiversi-

dad de la Sierra Madre Oriental. Luna, I., J. J. Morrone y D. Espinoza (Eds.). La Prensa de Ciencia, México, D. F. pp. 355-374).

Guzmán, G. 1978. Identificación de los hongos. Comestibles, venenosos y alucinantes. Ed. LIMUSA, S. A. México. 2^a. Reimpresión. 450 pp.

Guzmán, G. 2003. Los hongos de El Edén Quintana Roo (Introducción a la micobiota tropical de México). 1^o. Ed. Instituto de Ecología, A. C. Y CONABIO. Xalapa, Ver. México. 316 pp.

- Kirk, P.M., P.F. Cannon, J.C. David, J.A. Stalpers (Eds.). 2001. Ainsworth and Bisby's *DICTIONARY OF THE FUNGI*. 9th Edition. CAB International. Oxon, UK. 655 pp.
- Largent, D. L. & T. J. Baroni 1988. How to identify mushrooms to genus VI: Modern genera. Mad River Press, Inc. Eureka, Calif. USA. 277 pp.
- Lindequist, U., T. H. J. Niedermeyer, W-D Jülich. 2005. The pharmacological potential of mushrooms. *eCAM*. 2(3):285-299.
- Metzler, S. & V. Metzler. 1992. Texas mushrooms a field guide. 1st Edition. The Univ. Of Texas Press. Austin, Tx. USA. 350pp.
- Singer, R., 1986. The Agaricales in modern taxonomy. 4a. Ed. Koeltz sci. books. Koenigskin, FRA. 981 pp.
- Smith., J. E., N. J. Rowan and R. Sullivan. 2002. Medicinal mushrooms: a rapidly developing area of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities. *Biotechnology Letters*. 24: 1839-1845.
- Stamets, P. 2000. *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*. 3rd Edition. Ten Speed Press. Olympia, WA, USA.
- Wu, Q. F., B. M. Thiers & D. H. Pfister. 2004. Preparation, preservation, and use of fungal specimens in herbaria. In: Mueller, G. M., G. F. Bills & M. S. Foster (eds.) *Biodiversity of Fungi. Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier Academic Press. San Diego, CA, USA: pp. 23-37.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la UANL (Proyecto PAICYT Clave CN 1311-06) por el apoyo financiero recibido para la realización del presente trabajo.