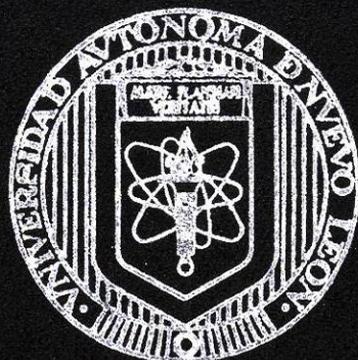


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



AISLAMIENTO Y SELECCION DE CEPAS NATIVAS DE
BASIDIOMICETOS LIGNOLITICOS CON CAPACIDAD
DE DEGRADAR COLORANTES SINTETICOS

TESIS

QUE PRESENTA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICO
BACTERIOLOGO PARASITOLOGO

JUANITA GUADALUPE GUTIERREZ SOTO

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.
NOVIEMBRE DE 2004

TL

QK626

.G88

2004

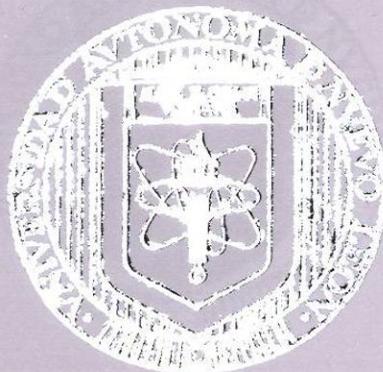
c.1



1080171456

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



AISLAMIENTO Y SELECCION DE CEPAS NATIVAS DE
BASIDIOMICETOS LIGNOLITICOS CON CAPACIDAD
DE DEGRADAR COLORANTES SINTETICOS

TESIS

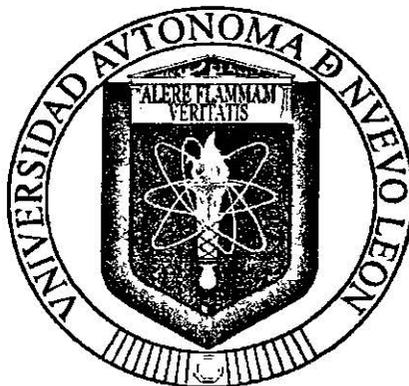
QUE PRESENTA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICO
BACTERIOLOGO PARASITOLOGO

JUANITA GUADALUPE GUTIERREZ SOTO

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.

NOVIEMBRE DE 2004

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE CEPAS NATIVAS DE BASIDIOMICETOS
LIGNOLITICOS CON CAPACIDAD DE DEGRADAR COLORANTES
SINTÉTICOS**

T E S I S

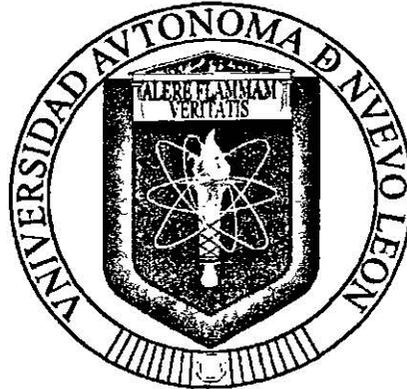
**QUE PRESENTA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO
BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO**

JUANITA GUADALUPE GUTIÉRREZ SOTO

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA N.L.

NOVIEMBRE DE 2004

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**Aislamiento y selección de cepas nativas de basidiomicetos lignolíticos
con capacidad de degradar colorantes sintéticos**

COMISIÓN DE TESIS

Presidente: Dr. Carlos E. Hernández Luna

Secretario: Dra. Yolanda Gutiérrez Puente

Vocal: Dr. Abelardo Chávez Montes

Suplente: MC. Lylia G. Miranda Velásquez

Carlos E. Hernández Luna

Yolanda Gutiérrez Puente

Abelardo Chávez Montes

Lylia G. Miranda Velásquez

CD UNIVERSITARIA, NOVIEMBRE DE 2004

El presente trabajo se llevó a cabo 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, contando con el apoyo económico del Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica de la UANL. (PAICYT). Proyecto con la Clave: CA 822-04.

Contenido	Página
INDICE	I
AGRADECIMIENTOS	II
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE CUADROS	VI
ABREVIATURAS	VI
RESUMEN	VII
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	
Estructura de la Lignina y enzimas lignolíticas	2
Colorantes sintéticos y problemática asociada	6
Uso de basidiomicetos en la degradación de colorantes	8
HIPÓTESIS	12
OBJETIVOS	12
JUSTIFICACIÓN	13
METODOLOGÍA	
Materiales y reactivos	14
Colecta de hongos y creación de la colecta de los aislados nativos de basidiomicetos	14
Selección de cepas con potencial lignolítico y capacidad de decoloración de los principales tipos de colorantes sintéticos	15
Ensayos de producción de enzimas lignolíticas en medio líquido	17
Ensayos de decoloración en medio líquido	19
Caracterización parcial de las actividades lignolíticas en los extractos crudos	21
RESULTADOS	
Creación de la colección de aislados nativos	23
Selección de los aislados con la mejor capacidad lignolítica y potencial decolorante	28
Decoloración de los colorantes sintéticos RBBR, AR44 y CV en medio líquido	45
Ensayos de producción de enzimas lignolíticas	45
Caracterización parcial de las actividades lignolíticas y ensayos de decoloración con sobrenadantes de los cultivos	47
DISCUSIÓN	57
CONCLUSIONES	64
BIBLIOGRAFÍA	65
ANEXO	70

Agradecimientos

A LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON POR EL APOYO ECONOMICO APORTADO PARA LA REALIZACION DE ESTE PROYECTO A TRAVÉS DEL PAICYT.

AL DR. CARLOS EDUARDO HERNÁNDEZ LUNA POR SUS SABIOS CONSEJOS, POR SU APOYO, POR SU TIEMPO INVERTIDO. PERO SOBRETUDO POR BRINDARME SU AMISTAD.

Lista de figuras

		<i>Página</i>
FIGURA 1	Modelo estructural de la lignina.	3
FIGURA 2	Componentes de los colorantes sintéticos.	8
FIGURA 3	Estructura química de los sustratos utilizados en la caracterización de las actividades lignolíticas	19
FIGURA 4	Vista de algunos de los sitios de prospección para aislados nativos de basidiomicetos.	23
FIGURA 5	Diversidad de basidiomicetos observados en las excursiones de prospección.	24
FIGURA 6	Registro de datos fenotípicos a nivel de laboratorio.	25
FIGURA 7	Características macroscópicas de los basidiomicetos aislados en cultivo como micelio vegetativo.	27
FIGURA 8	Estrategia experimental para la selección de los aislados con mejor potencial lignolítico y capacidad decolorante, y su aplicación con aislados nativos de basidiomicetos.	29
FIGURA 9	Comparación en la capacidad de producción de oxidasas y/o peroxidasas entre la cepa de referencia <i>P. chrysosporium</i> ATCC 24735 y algunos aislados nativos.	31
FIGURA10	Resultados de los ensayos en placa mostrando la capacidad de los 91 aislados nativos probados para decolorar el Poly R-478.	32
FIGURA 11	Comparación en la capacidad de decoloración del Poly R-478 entre la cepa de referencia <i>P. chrysosporium</i> ATCC 24735 y algunos aislados nativos.	33
FIGURA 12	Resultados de los ensayos en placa mostrando la capacidad de los 91 aislados nativos probados para decolorar el Azul Brillante de Remazol Reactivo.	34

FIGURA 13	Resultados de los ensayos en placa mostrando la capacidad de los 91 aislados nativos para decolorar el Rojo Ácido 44.	34
FIGURA 14	Comparación en la capacidad de decoloración del RBBR y AR 44 entre la cepa de referencia <i>P. chrysosporium</i> ATCC 24735 y algunos aislados nativos.	35
FIGURA 15	Resultados de los ensayos en placa mostrando la capacidad de los 91 aislados nativos probados para decolorar CV	36
FIGURA 16	Comparación en la capacidad de decoloración del RBBR y CV entre la cepa de referencia <i>P. chrysosporium</i> ATCC 24735 y algunos aislados nativos.	37
FIGURA 17	Comparación de los resultados obtenidos en los ensayos de potencial lignolítico y capacidad decolorante entre la cepa nativa CS 5 y la cepa de referencia <i>P. chrysosporium</i> ATCC 24735.	38
FIGURA 18	Comparación de los resultados obtenidos en los ensayos de potencial lignolítico y capacidad decolorante entre la cepa nativa CU 1y la cepa de referencia <i>P. chrysosporium</i> ATCC 24735.	39
FIGURA 19	Espectros de absorción de los colorantes sintéticos durante la decoloración en cultivos líquidos del aislado nativo CS 5.	41
FIGURA 20	Espectros de absorción de los colorantes sintéticos durante la decoloración en cultivos líquidos del aislado nativo CU 1.	42
FIGURA 21	Decoloración del RBBR en cultivos líquidos.	43
FIGURA 22	Curvas de decoloración de los colorantes sintéticos en cultivos líquidos de los aislados nativos CS 5 y CU 1.	44
FIGURA 23	Producción de Lacasa por los aislados nativos CS 5 y CU 1.	45

FIGURA 24	Producción de Manganeso Peroxidasa por los aislados nativos CS 5 y CU 1.	46
FIGURA 25	Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida de las enzimas lignolíticas.	49
FIGURA 26	Efecto del pH sobre la actividad de lacasa en los extractos crudos de CS 5 y CU 1.	50
FIGURA 27	Efecto de la temperatura sobre la actividad de lacasa en los extractos crudos de CS 5 y CU 1.	51
FIGURA 28	Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de lacasa en los extractos crudos de CS 5 y CU 1.	52
FIGURA 29	Decoloración de los colorantes sintéticos por extractos crudos.	53

Lista de cuadros

		<i>Página</i>
CUADRO 1	Ensayos para la detección de las principales actividades lignolíticas en los extractos del aislados CS 5.	47

Lista de anexos

		<i>Página</i>
ANEXO	Tabla de resultados generales de los aislados	70

Lista de Abreviaturas

4-AAP	4-Amino antipirina
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-sulfónico)
AR 44	Rojo ácido 44
CV	Cristal violeta
DMAB	Ácido 3-dimetilaminobenzóico
2,4-DCP	2,4-Diclorofenol
2,6-DMP	2,6-Dimetoxifenol
ϵ	Coefficiente de extinción molar
Lac	Lacasa
LiP	Lignina Peroxidasa
MBTH	3-metil-2-benzotiazolina hidrazona
MnP	Manganeso Peroxidasa
RBBR	Azul Brillante de Remazol Reactivo
UI	Unidades Internacionales

Resumen

El uso de los basidiomicetos lignolíticos en la remediación de efluentes contaminados con colorantes sintéticos, mediante sus sistemas oxidativos extracelulares, representa una estrategia promisoriosa que actualmente es sujeto de estudio en diversos países. A nivel de laboratorio se han obtenido resultados exitosos, aunque en un número limitado de especies, particularmente de cepas de colección. En este estudio se realizó una prospección en diversos parajes de la Sierra Madre Oriental y serranías aledañas al área metropolitana de Monterrey, con el fin de encontrar aislados nativos de basidiomicetos lignolíticos que comparen favorablemente con las cepas de referencia internacional en su capacidad de decolorar colorantes sintéticos de los principales grupos. La colecta y aislamiento nos llevó a la creación de una colección con 91 aislados de basidiomicetos nativos. Se desarrolló un sistema de selección en medio sólido en el cual se evaluó el potencial lignolítico, mediante la decoloración del Poly R-478 y la oxidación de los sustratos guayacol y o-anisidina, como indicadores de la despolimerización de lignina y la producción de oxidasas y/o peroxidasas lignolíticas respectivamente, así como, la capacidad de decoloración de colorantes sintéticos con RBBR (antraquinónico), AR44 (azo) y CV (triarilmetano) como representantes de los tres grupos principales. Se encontró que 12 de 91 aislados poseen un potencial lignolítico y capacidad decolorante que comparan favorablemente con la cepa de referencia *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725. Los aislados nativos CS 5 y CU 1 se seleccionaron por su alta capacidad decolorante y velocidad de crecimiento, para realizar los estudios de decoloración en cultivos líquidos y sobrenadantes libres de células (extractos crudos), y la determinación de la producción de enzimas lignolíticas (Lacasa, LiP y MnP). Los niveles de decoloración de RBBR por cultivos de 8 días fueron de 96 y 89% para CS 5 y CU1 respectivamente a las dos horas de adición. En este mismo periodo la decoloración del AR44 fue 74 y 83% por CS 5 y CU1 respectivamente, mientras que para el CV los valores fueron de 50 y 74 %. Los espectros de absorción durante la decoloración indican que la actividad se puede asociar con una transformación del compuesto, pero no con la absorción al micelio del hongo. La actividad decolorante coincidió con el tiempo en el cual se presentaron los títulos más altos en la producción de lacasa en medio de Bran Flakes. En el caso del aislado CS 5 también se detectó la presencia de MnP. El análisis por PAGE indicó la presencia de dos fracciones con actividad de lacasa para cada aislado. Las bandas principales para la CS 5 y CU 1 fueron de 60 y 55 kDa respectivamente, mientras que ambos también presentaron una banda menor de 100 kDa. La actividad de lacasa en extractos crudos de ambos aislados, mostró valores óptimos de pH en el rango de 3.0 a 4.0 y fue moderadamente termoestable ya que se mantuvo una hora a 55 °C, pero se inactivó completamente a 85 °C en 5 min. La lacasa es también capaz de catalizar el acople oxidativo del 2,4-DCP con 4-AA y el DMAB con MBTH, considerados específicos para peroxidasas. Los extractos crudos de los aislados CS 5 y CU1 conteniendo 820 y 2000 U.I./L de lacasa respectivamente, fueron capaces de decolorar completamente al RBBR y AR44 y 50 % del CV dentro de un periodo de 12 h. Los espectros de absorción durante la decoloración bajo estas condiciones, fueron similares a los encontrados en cultivos completos. Todos estos resultados nos permiten concluir que nuestros aislados nativos de basidiomicetos lignolíticos son buenos candidatos para ser utilizados en procesos de biorremediación de aguas residuales que contienen colorantes.

Introducción

En muchos países existe una preocupación creciente sobre la liberación de efluentes contaminados con colorantes sintéticos. A nivel mundial, se estima que los productores y consumidores de colorantes y pigmentos generan cada año efluentes que contienen alrededor de 80, 000 ton. de estos productos. En México, el nivel de descarga se puede estimar cercano a las 4,300 ton., considerando sólo las industrias textiles y del cuero. La utilización de basidiomicetos de la podredumbre blanca de la madera en la degradación y detoxificación de colorantes sintéticos representa una estrategia prometedora en la biorremediación de efluentes; estos hongos desarrollaron evolutivamente sistemas lignolíticos muy eficientes, los cuales se basan en la acción de oxidasas y/o peroxidasas extracelulares de poca especificidad que les permiten atacar, en forma directa o a través de mediadores redox, una gran variedad de compuestos xenobióticos recalcitrantes, estructuralmente parecidos a la lignina, que incluyen a las principales clases de colorantes industriales. En la bibliografía, existen muchos reportes de resultados exitosos a nivel de laboratorio. Sin embargo, éstos se centran en un número relativamente bajo de especies, que comúnmente están representadas por cepas procedentes de colecciones de referencia y cuyas características ecofisiológicas específicas limitarían sus condiciones de operatividad. Además, la expresión del potencial lignolítico y por ende de la capacidad decolorante de estos hongos puede presentar amplias variaciones dependiendo principalmente del medio y las condiciones del cultivo, pero que se pueden ver aun entre diferentes cepas de una misma especie. Por todo lo anterior, la prospección por nuevas cepas de basidiomicetos con alto potencial lignolítico representa un paso esencial para el desarrollo de sistemas de biorremediación eficientes y una buena opción sería apostar por los recursos micológicos de la región. En este sentido, los cerros y montañas de la Sierra Madre Oriental aledaños a la zona metropolitana de Monterrey, N.L. poseen una gran diversidad micológica que no ha sido explorada con respecto a sus habilidades de biodegradación de contaminantes; es probable que la abundancia de maderas duras propicie la ocurrencia de cepas nativas con una capacidad lignolítica comparable o superior a la de cepas de referencia internacional que las sustente para su aplicación en procesos de biorremediación de efluentes industriales impactados con colorantes sintéticos.

Antecedentes

Estructura de la Lignina y enzimas lignolíticas:

La lignina es el segundo biopolímero más abundante de la biosfera y el más complejo en relación a su estructura y heterogeneidad. Comprende el 15% de la biomasa terrestre y está formada por monómeros aromáticos fenólicos y no fenólicos unidos mediante diferentes tipos de enlaces carbono-carbono y éter formando un polímero aromático tridimensional, amorfo e insoluble en agua (Yee, D. C. 1996). (Figura 1)

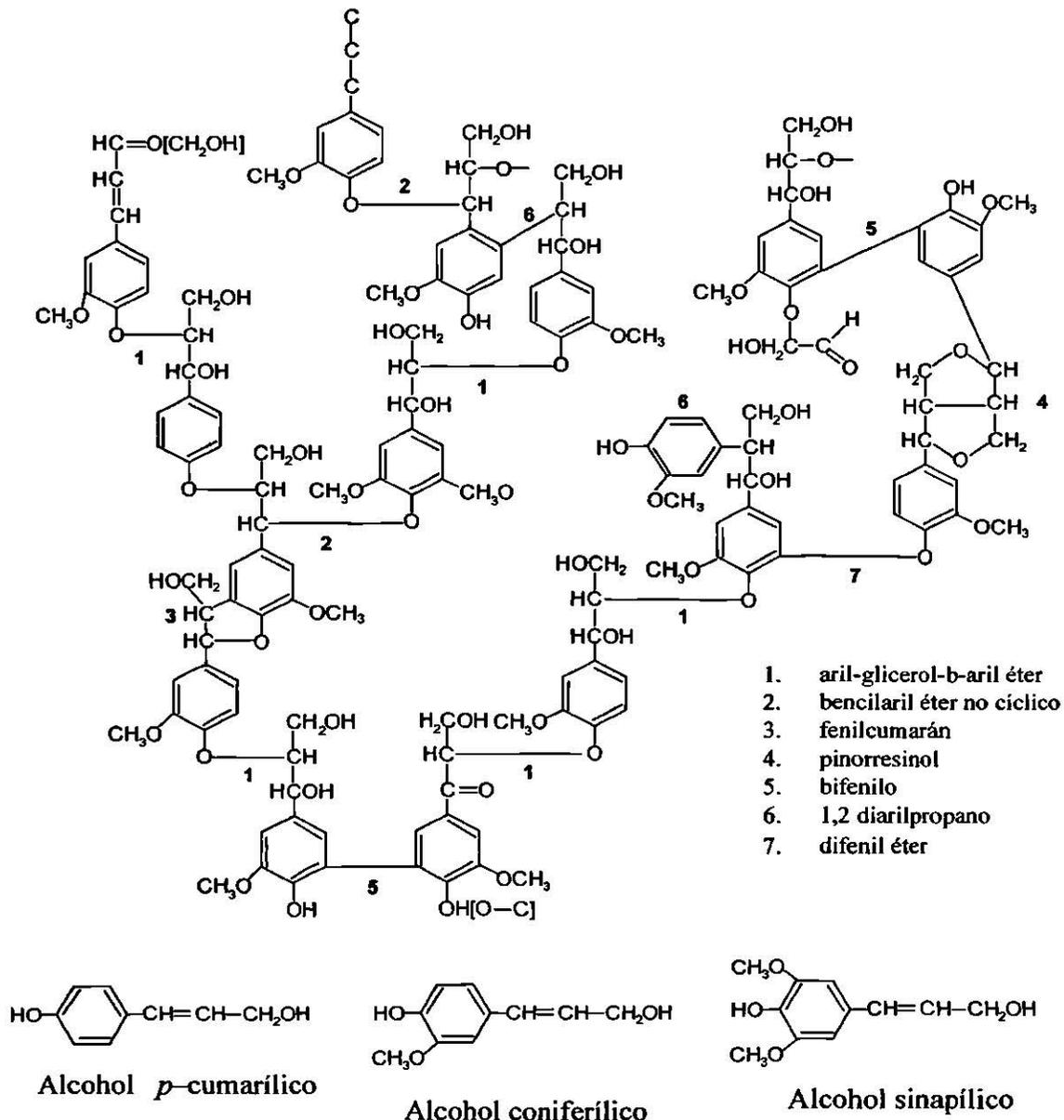


Figura 1. Modelo estructural de la lignina, mostrando sus componentes monoméricos y enlaces químicos. Modificado de Zarra, I. y Revilla, G. (1993). *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. 1ª ed. Interamericana-Mc. Graw Hill. Pp 10.

Biosintéticamente, la lignina resulta de acoplamientos al azar de especies radicales, las cuales se originan a partir de la deshidrogenación de alcoholes fenilpropílicos (cumarílico, coniferílico y sinapílico) mediada por peroxidasa. Los principales enlaces dentro de una estructura típica de lignina consisten en enlaces arilglicerol β -aril éter (β -O-4) y diaril propano (β -1) (enlaces 1 y 6 de la figura 1 respectivamente). (Buswell, J. A. 1987). La lignina realiza múltiples funciones esenciales para la vida de las plantas. Por ejemplo, se sabe que juega un importante papel en el transporte interno de agua, nutrientes y metabolitos. Proporciona rigidez a la pared celular y actúa como puente de unión entre las células de madera, creando un material que es notablemente resistente a los impactos, compresiones y flexiones. Ciertamente, los tejidos lignificados resisten el ataque de microorganismos, impidiendo la penetración de las enzimas destructivas en la pared celular.

Los basidiomicetos de la podrición blanca constituyen el único grupo de organismos conocidos que degrada y mineraliza la lignina. La capacidad para degradar este sustrato natural se debe a los sistemas extracelulares de enzimas que presentan un comportamiento relativamente inespecífico y falta de estereoselectividad. La ruptura de la estructura polimérica de la lignina ocurre en una variedad de enlaces carbono-carbono y éter en forma independiente de la configuración de los centros quirales (Tekere, M. 2000).

Ligninasa es un nombre genérico para el grupo de isoenzimas que catalizan la oxidación de la lignina (Tien y Kirk, 1988). Algunas de estas requieren peróxido de hidrógeno como cosustrato, el cual es generado por el mismo organismo (Faison, 1985). Estas enzimas extracelulares incluyen a la Lacasa, la Lignina Peroxidasa (LiP) y Manganese Peroxidasa (MnP).

La Lacasa (benzenediol: oxígeno oxidoreductasa E.C. 1.10.3.2.) se encuentra distribuida en plantas superiores y microorganismos, encontrándose principalmente en los basidiomicetos. En forma general, las lacasas fúngicas se describen como glicoproteínas,

que contienen cuatro átomos de cobre por unidad de proteína activa, con masas moleculares entre 50 y 110 kDa, cuya porción de carbohidratos forman de 10 - 45% de la masa total de la molécula y se incluyen en una familia conocida como las multicuproproteínas azules junto con la ascorbato oxidasa y la ceruloplasmina (Yaporvolov, et al., 1994).

Las lacasas catalizan la oxidación de un grupo hidroxilo *orto* y *para* de un sustrato mono o polifenólico o de aminas aromáticas a través de la sustracción de un electrón, formando radicales libres capaces de sufrir reacciones adicionales de despolimerización, desmetilación o formación de quinonas (Abadulla, E. 2000). Además, la gama de sustratos de las lacasas se puede extender a los compuestos aromáticos no fenólicos por la adición de mediadores redox de bajo peso molecular (Thurston, C. 1994).

La Lignina Peroxidasa (LiP) [diarilpropano:oxígeno, peróxido de hidrógeno oxidoreductasa, (rompedora de enlaces C-C), E.C. 1.11.1.14.], se ha estudiado principalmente en *Phanerochaete chrysosporium*, donde se describe como una hemoproteína que cataliza la oxidación dependiente de H₂O₂ de lignina y/o de varios sustratos aromáticos naturalmente producidos en el hongo, como el alcohol veratrílico, produciendo radicales libres catiónicos arilo, los cuales pueden difundir a través de las estructuras de la lignina y así actuar a distancia (Marzullo, L. 1995). Estas enzimas también pueden actuar sobre un gran número de sustratos fenólicos y no fenólicos xenobióticos, por ejemplo el 1,1,1,-tricloro-2,2'bis-(4clorofenil)etano (DDT), lindano, bifenilos policlorinados (PCB's), 2,4,6-trinitrotolueno (TNT), hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH's) pentaclorofenoles y colorantes sintéticos (Higson, 1991; Yee, D. C. 1996).

El mecanismo de ataque incluye la ruptura de la cadena de propano entre los dos carbonos quirales C_α y C_β en modelos diméricos de la lignina, compuestos del tipo β-O-4 éter y β -1-diarilpropano (Buswell, J. A., 1987). El ciclo catalítico de la LiP comienza con la oxidación del grupo hemo por el peróxido de hidrógeno para generar un compuesto I con dos átomos oxidados. Este es reducido por un electrón donado por una

molécula de sustrato, produciendo un compuesto II y un radical libre, además de la reducción de la enzima. El ciclo se completa con la reducción del compuesto II con un electrón por una segunda molécula de sustrato. En ausencia de un sustrato reducido, la enzima puede sufrir una serie de reacciones con el peróxido de hidrógeno para formar el compuesto III, oxiperoxidasa (Rao, S. K. 1995).

La Manganese Peroxidase (MnP) [Mn(II):peróxido de hidrógeno oxidoreductasa E.C. 1.11.1.13.] de *P. chrysosporium* se describe como una hemoproteína que cataliza la oxidación directa del ión Mn (II) a Mn (III). A su vez, este ión oxidado forma complejos con ácidos orgánicos producidos por el hongo; los cuales sirven como mediadores de la acción de la enzima al difundir entre la estructura del sustrato natural lignina generando radicales libres. El complejo Mn (II)- Ácido Orgánico se conoce como eficiente oxidante y la MnP se reconoce por su capacidad para oxidar una gran variedad de fenoles, aminas y colorantes en presencia del ión Mn (III) (Gold, y Glenn. 1988).

El ciclo catalítico de la MnP es semejante al de otras peroxidases (como la del rábano blanco y LiP) que incluyen a la enzima nativa, así como reactivos intermediarios. Pero esta enzima usa el Mn^{2+} como sustrato (donador de electrones). El ciclo catalítico es iniciado por la unión del H_2O_2 al grupo hemo de la proteína para formar un complejo I – MnP (el cual es un complejo Fe^{4+} -oxo-porfirin-radical). Posteriormente, el enlace dioxígeno es roto y se libera una molécula de agua. Entonces, produce la reducción del radical para formarse el complejo II – MnP (Fe^{4+} -oxo-porfirin). Un ión monoquelato de Mn^{2+} actúa como donador de un electrón para este intermediario porfirino y es oxidado a Mn^{3+} . Este es estabilizado por ácidos orgánicos, como el oxalato, y actúa como mediador redox de bajo peso molecular, que difunde para atacar inespecíficamente moléculas orgánicas sustrayendo un electrón (Hofrichter, M. 2002).

Como ya se mencionó, la producción de estos sistemas lignolíticos extracelulares e inespecíficos por los basidiomicetos de la podrición blanca les permite degradar una amplia gama de especies químicas xenobióticos recalcitrantes, que se asemejan químicamente a la lignina o sus derivados incluyendo los colorantes industriales. Por lo

establecer el uso de los hongos y/o sus enzimas lignolíticas en la decoloración de efluentes impactados son estos compuestos.

Colorantes sintéticos y problemática asociada:

Los colorantes sintéticos están formados por tres componentes: Un grupo cromógeno incoloro que comúnmente posee una estructura aromática con anillos de benceno, antraceno o naftaleno. Un grupo cromóforo, que es un átomo o radical portador del color y que forma la base de su clasificación química y un grupo auxócromo o grupo de afinidad, que es el responsable de impartirle solubilidad y causar la adherencia de los colorantes a las fibras, ayudando además a la estructura cromógeno-cromóforo, acentuando o modificando las tonalidades y que forma la base de la clasificación de colorantes de acuerdo con su uso. Las formulas estructurales de algunos componentes comúnmente encontrados en los colorantes sintéticos se muestran en la Figura 2.

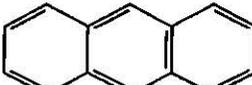
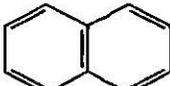
CROMÓGENOS	CROMÓFOROS	AUXOCROMOS
<p>Benceno</p> 	<p>Azo -N=N-</p>	<p>Sulfónico</p>
<p>Antraceno</p> 	<p>Sulfuro =C=S, C-S</p>	<p>-SO₃H</p>
<p>Naftaleno</p> 	<p>Carbonilo =C=O</p>	<p>Ácidos</p>
	<p>Carbón -C=O-</p>	<p>-COOH</p>
	<p>Carbón-Nitrógeno</p>	<p>Básicos</p>
	<p>=C=NH, -CH=N-</p>	<p>-NH₂, -NH-R,</p>
	<p>Nitroso -NO, -N-OH</p>	<p>-N-R₂, -OH</p>
	<p>Nitro-NO₂, =NO-OH</p>	

Figura 2. Componentes de los Colorantes Sintéticos. Se presentan las estructuras químicas de los grupos cromóforos, cromógenos y auxocromos más comúnmente encontrados en las principales clases de colorantes industriales.

Los colorantes industriales se pueden clasificar de acuerdo con diversos criterios: Según su uso o aplicación, se puede hablar de colorantes ácidos, básicos, directos, dispersos, mordentes, reactivos, de azufre, azoicos o de tina. (Hao *et al.* 2000); Conforme con su carga eléctrica, los colorantes pueden ser de tipo aniónico (carga negativa), catiónico (carga positiva) o no iónicos (sin carga) (Zhang, F., *et al.* 2001); De acuerdo con su estructura química los colorantes se pueden agrupar como colorantes de acridina, antraquinónicos, diari y triaril metano, azoicos, nitro, de tetrazolium, las ftalocianinas, los compuestos tiazólicos y los colorantes derivados del Xanteno (Zhang, F., *et al.* 2001).

La industria de los colorantes plantea los siguientes problemas ambientales: La presencia de colorantes daña estéticamente los cuerpos de agua, pues aún a muy bajas concentraciones son visibles, además de interferir con la función fotosintética y afectar la difusión de gases; Algunos colorantes son tóxicos en su forma comercial y otros (los diazóicos) se vuelven cancerígenos cuando son atrapados en sedimentos y atacados por bacterias anaerobias, al generar aminas aromáticas (anilinas) incoloras; El empleo de colorantes implica el consumo de grandes cantidades de agua las cuales tienen que ser sometidas después a tratamientos físicos, químicos, biológicos o combinaciones de los mismos para poderlas liberar del color; Los colorantes son comúnmente sustancias muy recalcitrantes ya que fueron diseñados para resistir lavados, luz solar y tratamientos químicos diversos.

A nivel mundial, se estima que los productores y consumidores de colorantes y pigmentos generan cada año efluentes que contiene alrededor de 80,000 toneladas de estos compuestos (Heinflig, *et al.* 1998). En México, considerando solo las industrias textiles y del cuero, este nivel se calcula cerca de las 4,300 toneladas (INEGI 1999), y la situación se magnifica debido a que la actividad económica se concentra en ciertas zonas. Como ya se mencionó, los colorantes sintéticos son muy recalcitrantes a los tratamientos biológicos convencionales, de forma tal que su remoción de los efluentes requiere la aplicación de sistemas alternativos. En este sentido, algunos procesos basados en métodos físicos o químicos han mostrado ser relativamente eficientes. Sin embargo, su aplicación se ve limitada debido a los altos costos y las complicadas condiciones de operación,

operación, además de que comúnmente generan lodos residuales, por lo que terminan solo transfiriendo el problema.

Uso de basidiomicetos en la degradación de colorantes:

El empleo de los hongos en la decoloración y degradación de colorantes surge al inicio de la década de los 80's (Glenn y Gold., 1985). Desde entonces se han realizado estudios prospección de cepas nativas con capacidad de decoloración en varios países, por ejemplo en Zimbabwe, África (Tekere *et al.* 2001) y de selección utilizando cepas de referencia de colección, como el realizado con cepas de colección (Jarozs-Wilkolazka, *et al.* 2002).

Como resultado se han ensayado numerosos géneros y especies, pero el número de cepas con actividad comprobada a nivel de laboratorio es aún escaso y aún menor el de aquellas a las que se han caracterizado sus enzimas o que se han probado sobre efluentes simulados o industriales, como se aprecia en diferentes revisiones (Hao, *et al.* 2000; Zhang, *et al.* 2001). En estas revisiones se destacan cepas que en el laboratorio han provocado 100% en la 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 mas estudiadas y con mejores resultados se destacan *Phanerochaete chrysosporium* en primer sitio, con *Coriolus (Trametes) versicolor*, *Bjerkandera adusta*, *Pleurotus ostreatus* y otras especies de *Pleurotus* y *Phlebia* en segundo lugar y gradualmente se acumulan estudios sobre aislados de algunas mas (Mc.Mullan, *et al.* 2001). Algunos de los trabajos realizados en este sentido se resumen a continuación.

Heinfling y colaboradores (1998) investigaron la transformación de seis colorantes por extractos enzimáticos de *Phanerochaete chrysosporium* y *Bjerkandera adusta*, encontrando que la MnP del primer hongo o el complejo lactato – Mn³⁺ (producto de esta actividad) mostraron poca o nula oxidación de los colorantes. Señalan una peroxidasa

Mn²⁺ independiente que degradó los colorantes y es producida por *B adusta* y *Pleurotus eryngi* y cuya actividad no se afecta por adición de alcohol veratrílico.

En sus antecedentes, estos autores señalando además que *Phanerochaete chrysosporium* ha sido ensayado con anterioridad para la decoloración de colorantes azo, antraquinóicos, heterocíclicos, trifenilmetano y poliméricos, así como la existencia de dos reportes de mineralización parcial de colorantes azo de uso en la industria textil por este hongo, incluyendo; Reactive Blue 38 (ftalocianina) y Reactive Violet 5, Reactive Black, Reactive Orange 96, Reactive Red 198, Reactive Blue 15.

En otro estudio realizado por Abdulla y colaboradores (2000) se ensayó la capacidad de preparaciones puras de lacasa de una cepa de *Trametes hirsuta* en forma libre o inmovilizada para degradar siete colorantes de diferentes estructuras, teniendo éxito en cuanto a la disminución del nivel de toxicidad y eliminación de coloración. Concluyendo que el tiempo y susceptibilidad a degradación depende de la estructura química del colorante.

Pereira-Chagas y Durrant R. (2001), ensayaron cepas de *Phanerochaete chrysosporium* y *Pleurotus sajorcaju* para la decoloración de cuatro colorantes azo comúnmente empleados en la industria de alimentos, encontrando que *P. chrysosporium* decoloró totalmente los colorantes Amaranto, New coccine y Orange G, pero sólo un 60% el colorante Tartrazina. Las enzimas asociadas en el proceso de decoloración fueron la Manganese Peroxidasa, aunque también se detectó la presencia de la actividad de una β -glucosidasa. En el caso de *P. sajorcaju*, se encontró que es capaz de llevar a cabo la decoloración total de los colorantes Amaranto y New coccine, mientras que para el Orange G y la Tartazina los valores de fueron 50% y 20% respectivamente y las enzimas implicadas fueron la lacasa y la glucosa-1-oxidasa.

Robinson *et al.* (2001), ensayaron la capacidad de decoloración de cuatro hongos de la podredumbre blanca sobre cinco colorantes de diferentes clase. Las cepas de *Bjerkandera adusta* y *Phlebia tremellosa* demostraron ser mejores que *Pleurotus*

ostreatus y *Coriolus versicolor* sobre la mezcla de colorantes Cibacron Yellow C-2R, Cibacron Red C-2G, Cibacron Blue C-R, Remazol Black B y Remazol Red RB. Además, señala que una alta concentración de nitrógeno en el medio de cultivo aumenta la producción enzimática, pero sólo ligeramente la degradación.

Hatvani y Mécs (2002), postulan que como varios colorantes con uno ó más anillos aromáticos tienen estructuras similares a los xenobióticos aromáticos, pero son solubles en agua, exhiben baja toxicidad y se puede medir su concentración espectrofotométricamente, por lo que, fácilmente se les puede utilizar para investigar la capacidad degradadora de los organismos y establecer modelos de degradación. Ensayó *Lentinus edodes* sobre Poly R-478, Remazol Brilliant Blue R y Orange II, a los cuales decoloró por medio de lacasa y MnP, viéndose afectada su actividad por la concentración de manganeso y nitrógeno en el medio.

Jarosz-Wilkolazka, *et al.*, en 2002 hacen ensayos de decoloración con 115 hongos sobre el colorante monoazo Acid Red 183, encontrando que 16 cepas lo degradan en 21 días y sobre el colorante antraquinónico Basic Blue 22, 69 cepas lo degradan de 5 a 14 días. Resaltan la necesidad de agitación para que ocurra la degradación, y la importancia de cepas con mejor potencial biotecnológico en la degradación de colorantes que aquellas más ensayadas (*P. chrysosporium*, *T. versicolor* y *B. adusta*). Aunque los hongos de la podrición blanca fueron más rápidos, algunos de la podrición café y mohos mitospóricos fueron muy efectivos en la decoloración, además de una levadura y dos basidiomicetos degradadores de mantillo.

Zhang, F., (2001) señalan la decoloración fúngica como alternativa promisorias que puede reemplazar o sumarse a los procesos actuales de tratamiento de efluentes impactados con colorantes, que sus ventajas son el poder crecer en medios simples, baratos, tener una tasa de producción alta y una capacidad de bioabsorción elevada. Además, puede utilizarse como células vivas o biomasa muerta, a la cual se puede tratar para elevar su capacidad de bioabsorción.

Otro enfoque de la aplicación de los hongos en la remediación de colorantes, es el que plantean Robinson *et al* (2001), que consiste en adsorber primero en un subproducto agrícola el colorante y ser tratado en una segunda etapa por los hongos lignolíticos, obteniendo un producto fermentado que puede emplearse como fertilizante o acondicionador de suelos una vez que se ha liberado del color.

Por otra parte, la caracterización de los genes que codifican para las tres enzimas principales que modifican la lignina, indica que éstas son codificadas por una familia de genes que permiten una regulación compleja y una producción de múltiples isoformas, esto explicaría el porqué las condiciones de cultivo pueden hacer que una misma cepa varíe en la producción de enzimas y por ende es su capacidad de biodegradación de colorantes. Sin embargo, también se ha encontrado que la producción de enzimas lignolíticas en iguales condiciones de cultivo pueden variar en cepas de la misma especie de basidiomiceto de la pudrición blanca (Pickard, et al. 1999), justificando el interés por aislar cepas nativas, ya que éstas pueden tener mejor desempeño que otras de la misma especie previamente descritas o, mejor aún , la prospección pueden conducir al descubrimiento de nuevas especies de basidiomicetos con alta capacidad de biodegradación de colorantes sintéticos.

Hipótesis.

Un estudio de prospección por hongos basidiomicetos en la zona de la Sierra Madre Oriental y Serranías aledañas a la Cd. de Monterrey, N. L. llevará al aislamiento y selección de cepas nativas con alta capacidad de degradar colorantes sintéticos.

Objetivo General.

El objetivo general de este trabajo es llevar a cabo un estudio de prospección de cepas nativas de basidiomicetos de la podrición blanca que muestren una capacidad de degradar colorantes sintéticos comparable o mejor a la de cepas internacionales de referencia

Objetivos Específicos:

Para cumplir con el propósito general se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Crear un cepario de basidiomicetos nativos a partir de hongos aislados de la región.
2. Diseñar un sistema de selección de hongos productores de oxidasas y peroxidasas lignolíticas y con capacidad de decolorar colorantes sintéticos representativos de los principales tipos.
3. Seleccionar las cepas que muestren la mejor capacidad de decolorar en medio sólido.
4. Evaluar la actividad decolorante de los hongos en cultivos líquidos y/o sus extractos enzimáticos.

Justificación.

La zona montañosa aledaña a Monterrey, N. L., ofrece una gran biodiversidad fúngica, representativo de este hecho es el número de hongos presentes en el herbario micológico de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. Muchos de los hongos registrados en esta colección corresponden a basidiomicetos de la pudrición blanca, indicando el potencial de los recursos micológicos de la región que pudieran ser evaluados para su aplicación en procesos biotecnológicos en caso de contar con una colección de cultivos del micelio vegetativo (cepario).

Como Estado industrial, Nuevo León posee numerosas empresas que fabrican o utilizan colorantes en sus procesos y que por ley deben tratar sus aguas residuales antes de descargarlas a los sistemas municipales. Uno de los principales retos radica en que los tratamientos actualmente utilizados son costosos, complicados y muchas veces ineficientes. Esto plantea la primera razón para estudiar sistemas de biorremediación de efluentes industriales impactados con colorantes sintéticos, y un primer paso en este sentido, es apostar a nuestros recursos naturales para su desarrollo, por lo que es justificable la prospección en Nuevo León de hongos con capacidad de degradación de colorantes y el establecimiento de una línea de investigación en este sentido.

Metodología.

Materiales y reactivos:

Los sustratos y colorantes; Guayacol, o-Anisidina, Poli R478, Rojo Ácido 44 (AR 44), Azul Brillante de Remazol Reactivo (BBRR), Cristal Violeta (CV), Ácido 2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiazolin-6- sulfónico)-sal de diamonio (ABTS), 2,4-diclorofenol (2,4-DCP), 4-aminoantipirina (4-AAP), Peróxido de hidrógeno, Ácido Malónico, Tartrato de Sodio, Siringaldazina (3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzaldeidazina), utilizados en los ensayos de selección y determinaciones enzimáticos. Así como los reactivos utilizados en los ensayos de electroforesis, Acrilamida, bis-N,N'-metilen-bis-acrilamida, Lauril Sulfato de Sodio (SDS), Persulfato de Amonio, N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED), 2-mercaptoetanol, Trizma-base y Glicina fueron de las marcas comerciales Sigma, Fluka o Aldrich, obtenidos a partir de Sigma-Aldrich de México, S.A. de C.V. Los componentes de los medios de cultivo; Extracto de Levadura, Extracto de Malta y Agar Bacteriológico de Difco. Los demás reactivos, ácidos y sales inorgánicas utilizadas en este estudio fueron de grado reactivo de Reactivos Químicos Monterrey o Control Técnico y Representaciones (CTR).

Colecta de hongos y creación de la colección de aislados nativos de basidiomicetos:

Para realizar la colecta de hongos, se programaron salidas a campo a la distintas zonas de los cerros y sierras aledañas a la ciudad de Monterrey, N.L. entre las cuales se encuentran el Cerro de la Silla, Parque Natural "La Estanzuela", Cerro de las Mitras, Sierra del Fraile, Sierra Madre Oriental en la zona de San Pedro Garza, García, N.L., así como algunas zonas incluidas dentro del área Metropolitana de Monterrey, como el Parque la Pastora y la Ciudad Universitaria. El estudio incluyó principalmente hongos basidiomicetos lignolíticos con cuerpos fructíferos (Carpóforos) en forma de repisa o costra en desarrollo sobre árboles muertos o restos de troncos o ramas en proceso de decaimiento.

Previo a su levantamiento, los carpóforos fueron fotografiados en el sitio de la colecta con el objetivo de tener un registro de las características físicas del lugar y del sustrato, así como del desarrollo del hongo en cuestión. La recolección de los especímenes se

realizó con el auxilio de una navaja afilada y las muestras se depositaron en bolsas de papel, asignándose una clave de acuerdo al lugar de colecta y el número del espécimen. En todos los casos se trataron de obtener suficientes muestras de carpóforos para intentar por un lado, el aislamiento y cultivo del micelio vegetativo (Creación del Cepario) y por el otro, la deshidratación de carpóforos para su conservación e identificación.

Los carpóforos de los hongos se fotografiaron nuevamente en el laboratorio para tratar de obtener datos fenotípicos más específicos de los cuerpos fructíferos, como son; la forma, tamaño y densidad de los poros, las dimensiones generales y los patrones de coloración, textura y zonación. A continuación, se procedió a disecar pequeños trocitos de la trama del cuerpo fructífero, los cuales fueron tratados con peróxido de hidrógeno (3%) por 0.5, 1.0 y 2.0 minutos. Luego de ello, se enjuagaron exhaustivamente con agua bidestilada estéril y posteriormente se sembraron en placas de medio YMGA (Extracto de Levadura 0.4%, Extracto de Malta 1.0%, Glucosa 0.4% y Agar Bacteriológico 1.5%), suplementado con Ácido Tartárico al 10%, y Benomil al 0.004%. Todo el proceso se realizó en condiciones de asepsia y las placas se incubaron a 30°C. Diariamente, se llevó a cabo una inspección visual directa o con estereoscopio (Laica, Zoom 2000) con el objetivo de descartar las muestras contaminadas con hongos imperfectos o bacterias o bien aquellas que no mostraron desarrollo de micelio. En caso contrario, cuando el desarrollo del micelio era el adecuado, se procedió a confirmar si este correspondía a un basidiomiceto. Entonces, porciones del micelio se colocaron sobre portaobjetos, se sometieron a tinción con Azul de algodón y se observaron al microscopio (Laica 2000). La presencia de fibulas se tomó como el criterio confirmatorio para basidiomicetos (Deacon, J.W. 1988). Una vez establecidos como basidiomicetos, los aislados se transfirieron a medio YMGA y los cultivos se mantuvieron en refrigeración a 4° C y mediante resiembras periódicas cada dos meses.

Selección de cepas con potencial lignolítico y capacidad de decolorar los principales tipos de colorantes sintéticos:

Como medio de cultivo base para la selección de los aislados con los mejores potencial lignolítico y capacidad de decoloración de colorantes sintéticos se utilizó un medio

propuesto por Pickard y colaboradores (1999), compuesto por Bran Flakes de Kellogg's a 2 % (P/V) en amortiguador de fosfato de potasio 60 mM de pH 6.0, adicionado con agar bacteriológico a 1.5% y esterilizado a 121°C durante 15 min. Este tipo de medio basado en el uso de un cereal comercial se ha reportado como un buen inductor de la producción de enzimas lignolíticas para diferentes especies de basidiomicetos de la pudrición blanca.

Cada uno de los aislados se evaluó inicialmente en un sistema formado por seis diferentes sustratos agregados a sendas placas de medio base como se describe a continuación: Las pruebas del potencial lignolítico incluyeron dos placas adicionadas con los sustratos aromáticos guayacol y o-anisidina, como indicadores de la producción extracelular de oxidasas y/o peroxidasas lignolíticas y una placa con el colorante polimérico Poly R-478, como indicador de la capacidad de despolimerización de la lignina (Field, J.A. *et. al.* 1992). Para la evaluación de la capacidad de decoloración se seleccionó una sistema de tres colorantes sintéticos, cada uno de ellos representando uno de los principales grupos estructurales: Azul Brillante de Remazol Reactivo (Blue Reactive 19 o RBBR) del tipo antraquinónico, Rojo Ácido 44 (Crystal Ponceau 6R o AR-44) del tipo azo, y Cristal Violeta (Cristal Violet 3 o CV) del tipo triarilmetano.

Las pruebas se realizaron en cajas de Petri de 90 mm de diámetro conteniendo 20 ml de medio sólido. Con excepción del Poly R-478, que se adicionó antes de esterilizar en autoclave, todos los otros sustratos indicadores y colorantes se agregaron asépticamente al medio previamente esterilizado a partir de soluciones de trabajo 100 X, esterilizadas por filtración (Millipore 0.45 μ m) , para obtener una concentración final de 0.02%. Las placas con medio se sometieron a prueba de esterilidad por 24 horas y posteriormente se sembraron en la parte central usando como inculo un trocito de agar con micelio de 0.5 cm. tomado de la parte periférica de un precultivo en YMGA de las cepas a probar. Los datos de crecimiento, decoloración e indicios de reacción se registraron diariamente durante los primeros 5 - 7 días y después esporádicamente durante un mes, al cabo del cual se realizó una evaluación final, en la que también se consideraron los cambios en la apariencia del medio y en el crecimiento del hongo. Para la selección de los mejores

aislados en estos ensayos, los resultados se compararon con los obtenidos para las cepas de referencia: *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725, *Bjerkandera adusta* UAMH 8258 y *Pleurotus ostreatus* ATCC 58053, amablemente proporcionadas por el Dr. M. A. Pickard de la Universidad de Alberta en Edmonton Canadá.

Ensayos de producción de enzimas lignolíticas en medio líquido:

Una vez elegidos los mejores hongos en medio sólidos, se realizaron ensayos de producción de enzimas lignolíticas en medio líquido. Para obtener las curvas de producción de dichas enzimas, se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 100 ml del medio de Bran Flakes, preparado como ya se describió pero omitiendo el agar bacteriológico. Como inóculo se emplearon tres piezas de 0.5 cm. de diámetro de agar con micelio obtenido a partir de la región periférica de los precultivos en medio sólido YMGA. Los cultivos se desarrollaron a 28° C y agitación de 150 r.p.m en un baño de temperatura controlada con agitación orbital (Lab Line Microprocessor Shaker Bath). Cada dos días se tomaron alícuotas de 1.0 ml del medio para la obtención de los extractos enzimáticos. Para lo anterior, las muestras se centrifugaron en una microfuga (Eppendorf 5415 C) a 14, 000 r.p.m. por un lapso de 10 minutos con el objetivo de recuperar los sobrenadantes con las actividades a medir; Lacasa, Lignina Peroxidasa (LiP) y Peroxidasa dependiente de manganeso (MnP).

Las actividades de las enzimas lignolíticas se ensayaron espectrofotométricamente (Shimatzu UV-VIS mini 1240) con ligeras modificaciones a los métodos propuestos por Bourbonnais y Paice (1985) y Glenn y Gold (1985), para la Lacasa, LiP y MnP respectivamente. Como se describe a continuación:

Determinación de la Actividad de Lacasa.

El método para medir la actividad de la lacasa se basa en la formación de un radical catiónico a partir del sustrato Ácido 2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiazolin-6- sulfónico)-sal de diamonio (ABTS) por acción de la enzima, generado un color verde, el cual es detectado a una longitud de onda de 405 nm. Para la mezcla de reacción se utilizan 2.8 ml de amortiguador de acetato de sodio 200mM de pH 5.0, 0.1 ml de ABTS 60 mM y 0.1 ml

del sobrenadante del medio (extracto enzimático), dando un volumen total de 3 ml. La reacción se inició con la adición del extracto enzimático y se siguió a través del cambio en la densidad óptica a 405 nm. Las unidades de lacasa se expresan como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1 μmol de sustrato por minuto (Unidades Internacionales o U.I.) tomando como valor de coeficiente de extinción molar (ϵ)=36,000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

Determinación de la Actividad de Lignina Peroxidasa (LiP):

El método utilizado para la determinación de la actividad de LiP se basa en la formación de un complejo de color rosa entre el producto de oxidación del 2,4-Diclorofenol (2,4-DCP) con la 4-Aminoantipirina (4-AAP). La mezcla de reacción con un volumen total de 3 ml, consiste de 2.6 ml de amortiguador de Succinato de sodio 50 mM a pH 4.5, 0.1 ml de 4-AAP 246 mM, 0.1 ml de 2,4-DCP 30 mM, 0.1 ml de H_2O_2 3mM y 0.1 ml del extracto enzimático. La reacción se inicia por la adición del extracto enzimático y se sigue a una longitud de 510 nm. La actividad de LiP se expresa en U.I. considerando un valor de $\epsilon = 18,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Determinación de la Actividad de Peroxidasa Dependiente de Manganeseo (MnP):

La medición de la actividad de la MnP se basa en la oxidación del Mn^{2+} a Mn^{3+} , el cual forma un complejo de coordinación con un ácido orgánico que es detectado a 270 nm. Para la mezcla de reacción se emplearon 2.7 ml de un amortiguador de Malonato de sodio 50 mM de pH 4.5, 0.1 ml de Sulfato de manganeseo (MnSO_4) 6mM, 0.1 ml del extracto enzimático y 0.1 ml de H_2O_2 3 mM para iniciar la reacción. El avance del proceso se siguió a 270 nm. Los datos de actividad de MnP se expresan como U.I. tomando un valor de $\epsilon = 6,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

En la figura 3 se muestran las estructuras químicas de los sustratos utilizados en estos ensayos, en conjunto con una serie de sustratos alternativos que se utilizaron en otros ensayos de caracterización de las actividades lignolíticas, en extractos crudos o en geles nativos de poliacrilamida, como se describen mas adelante.

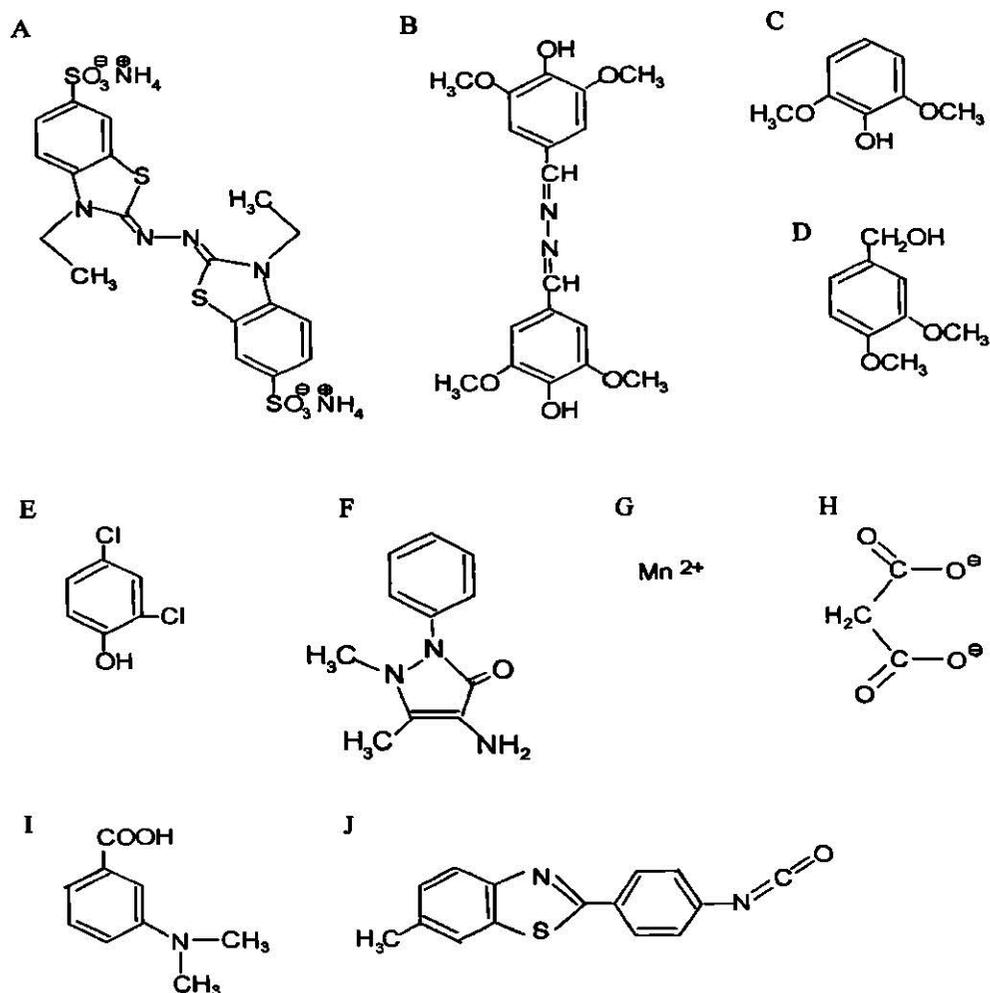


Figura 3. Estructura química de los sustratos utilizados en la caracterización de las actividades lignolíticas. (A) Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)-sal de diamonio (ABTS), (B) 3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzaldeidazina, (Siringaldazina), (C) 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMP) (D) alcohol 3,4 dimetoxi-bencílico (Alcohol veratrílico) (E) 2,4-diclorofenol (2,4-DCP) (F) 4-aminoantipirina (4-AAP), (G) ion manganeso (H) Malonato (I) Ácido 3-dimetilaminobenzóico (DMAB) y (J) 3-metil-2-benzotiazolina hidrazona (MBTH).

Ensayos de decoloración en medio líquido:

En virtud de sus propiedades de inducción sobre los sistemas lignolíticos, para estos ensayos se decidió utilizar también el medio de Bran Flakes, a pesar de la presencia de componentes sólidos que podrían ocasionar interferencias por absorción. Para este caso, se incluyeron algunos ensayos control en medio YMGA. Los colorantes sintéticos evaluados corresponden a los mismos que se utilizaron en el sistema de selección de los aislados con la mejor capacidad de decoloración (RBBR, AR 44 y CV), en la misma concentración.

Estos ensayos se llevaron a cabo bajo dos diferentes protocolos; a) Con el colorante adicionado directamente a los cultivos y, b) con los sobrenadantes de los cultivos libres de micelio (extractos enzimáticos) que fueron agregados a diluciones apropiadas de los colorantes en amortiguador. El primer caso fue con la intención de evaluar el potencial del sistema completo en su capacidad decolorante; con la biomasa del micelio presente y con el hongo metabolitamente activo. Mientras que en el segundo caso, se estima la capacidad decolorante de los sistemas extracelulares aislados. Las condiciones y tiempos de adición del colorante o preparación de los extractos dependieron del tipo de protocolo a seguir como se describe a continuación

Ensayos con cultivos completos:

En Matraces Erlenmeyer de 250 ml se prepararon 100 ml de medio líquido, los cuales se inocularon con 3 trocitos de agar con micelio de 0.5 cm. de diámetro y los cultivos se desarrollaron durante 10 días en las condiciones antes descritas. En este tiempo, se adicionó 1 ml de una solución de trabajo (2%) del colorante a ensayar, para obtener una concentración final de 0.02%. Se tomaron muestras de los medios al tiempo cero, es decir al momento de agregar los colorantes, y posteriormente cada dos días.

Ensayos con extractos enzimáticos:

Los extractos enzimáticos se obtuvieron, en lo tiempos pico de producción enzimática, a partir de la filtración en papel (Whatman # 1) de sobrenadante de los cultivos y se almacenaron en congelación (alícuotas de 10 ml) hasta el momento de su uso. La reacción de decoloración se realizó en condiciones de presencia de los cosustratos y/o cofactores apropiadas para la acción de todas y cada una de las principales enzimas lignolíticas. Así, la incubación se realizó en un amortiguador de Malonato de sodio 50 mM de pH 4.5, adicionado con 0.1 ml de H₂O₂ (3 mM), 0.1 ml de MnSO₄ 6 mM, 0.2 ml del extracto enzimático, y 10 µl de las soluciones de trabajo 2% de los colorantes a probar. La actividad de decoloración se siguió cualitativa y cuantitativamente a través del registro de los espectros de absorción UV-Vis en el rango de 200 a 800 nm de las preparaciones en los tiempos de incubación indicados.

Caracterización parcial de las actividades lignolíticas en los extractos crudos:

Separación en geles de poliacrilamida y revelado “*in situ*” de las actividades lignolíticas

Para caracterizar algunas propiedades de las enzimas lignolíticas presentes en los extractos, se prepararon geles no desnaturizantes de Poliacrilamida (Garfin, D. E. 1990). La electroforesis se llevó a cabo en un sistema discontinuo, consistente de un gel de separación (inferior) a 12 % y un gel de concentración (superior) al 4%. La actividad de lacasa se detectó por inmersión del gel en ABTS o Siringaldazina. Para los ensayos de LiP se utilizó el par 2,4-DCP y 4-AA. en presencia de peróxido de hidrógeno, y la Mn-P se ensayó con el cromógeno 2,6-DMP en presencia de peróxido de hidrógeno, malonato y Mn^{2+} . La estimación de las masas moleculares relativas se realizó mediante tinción con Azul de Coomasie y comparación de los patrones de migración contra estándares de proteínas. Para la preparación de los geles, se usó los componentes siguientes

Gel Separador de Poliacrilamida al 12% para 15 ml.

<i>Componente</i>	<i>Volumen</i>
Agua bidestilada	5.025 ml
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	3.75 ml
Acrilamida / Bis (30%/2.7%)	6.0 ml
APS 10%	100 μ l
TEMED	8 μ l

Gel Concentrador de Poliacrilamida 4% para 5 ml

<i>Componente</i>	<i>Volumen</i>
Agua bidestilada	3.050 ml
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	1.250 ml
SDS 10%	0.050 ml
Acrilamida / Bis (30%/2.7%)	0.650 ml
APS 10%	25 μ l
TEMED	5 μ l

Los extractos a analizar se diluyeron 1:1 en amortiguador Tris-HCl 0.06 M pH 6.8, conteniendo glicerol a 10 % y azul de bromofenol a 0.025%. Cada carril se cargó con 15 μ l de la muestra y la separación se realizó a 104 mV por dos horas. Los geles desarrollados se revelaron con ya se mencionó. En este ensayo se emplearon los extractos de las mejores productoras.

Efecto del pH sobre la actividad enzimática:

Para conocer el efecto del pH sobre la actividad de los extractos, las preparaciones de los aislados CS 5 y CU 1 se incubaron a 25 °C en diferentes condiciones de pH y su actividad se determinó utilizando el 2,6-DMP como sustrato. El rango de pH evaluado fue de 2.5 a 6.0 en amortiguador de acetato de sodio a concentración 200 mM en mezclas de reacción consistentes de 2.7 ml de amortiguador, 0.1 ml de 2,6- DMP (4mM) y 0.1 ml del extracto enzimático.

Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad enzimática:

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la actividad de los extractos, se preincubó la mezcla de reacción de 25 a 50 °C cada 10 grados, por un periodo de 5 minutos y posteriormente se agregó el extracto para llevar a cabo la medición espectrofotométrica. Para medir la termoestabilidad de las enzimas, se tomaron alícuotas de los extractos crudo y se pretrataron durante los tiempos indicados a diferentes temperaturas en rango de 55 a 85 °C. Posteriormente, se realizaron las determinaciones de la actividad enzimática en las condiciones estándar a 25° C.

Resultados

Creación de la colección de aislados nativos

El presente estudio se inició con la creación de una colección de basidiomicetos [Hymenomyces poliporales (repisas y costras) y algunos agaricales (setas)] nativos de los bosques aledaños al área metropolitana de Monterrey. Las zonas de prospección incluyeron cañadas y arroyos para detectar los hongos en los sitios donde son arrastrados por los escurrimientos, pero sin descartar los valles y laderas de montañas donde también se pueden encontrar. La figura 4 muestra una vista de algunos de los lugares de colecta.

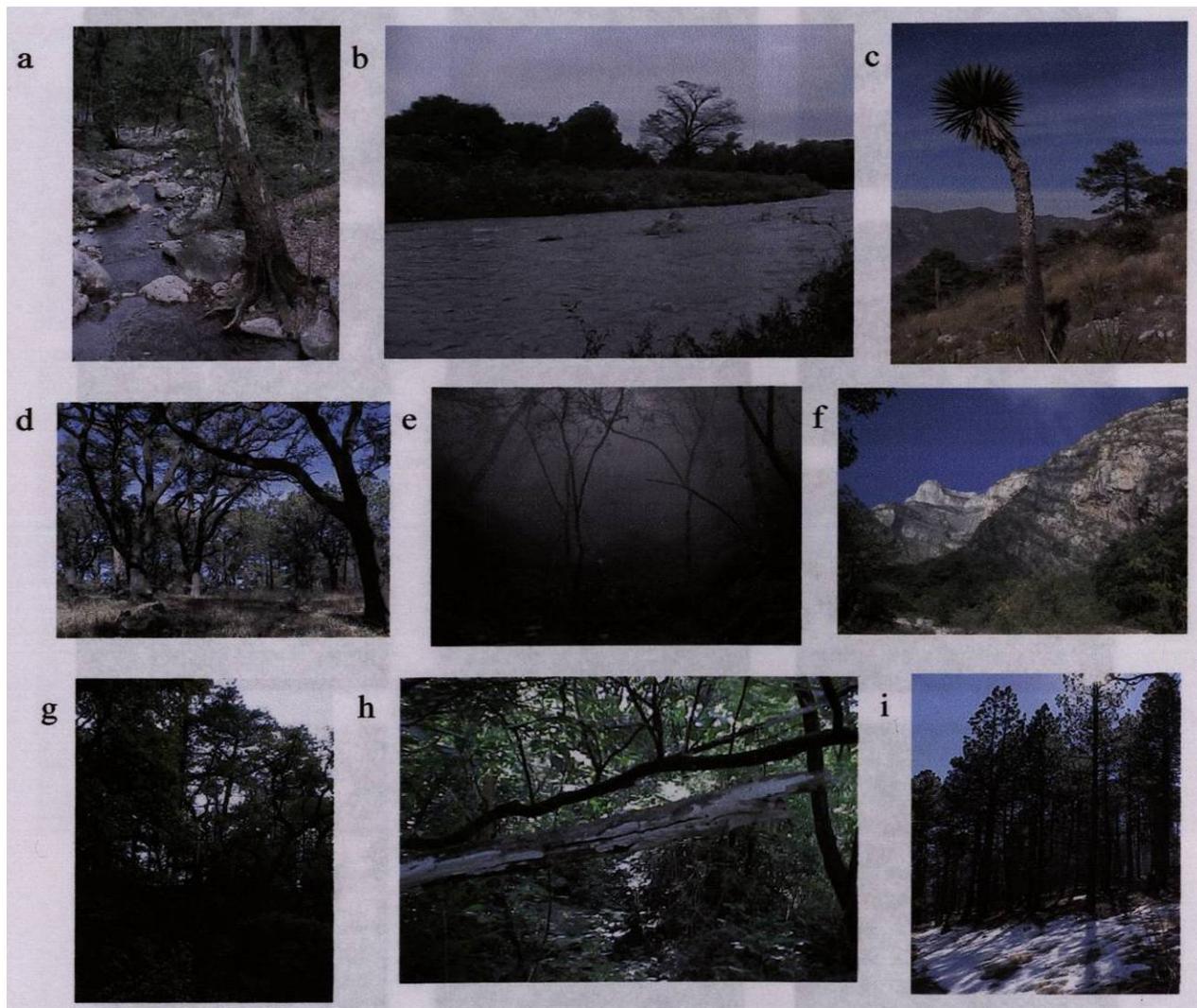


Figura 4. Vista de algunos de los sitios de prospección por aislados nativos de basidiomicetos. a) Un paraje en el Arroyo la Estanzuela, b) Ribera del Río la Silla. c) Ladera en Cerro del Fraile, d) Meseta de los Pinos Cerro del Fraile e) Paraje “la carbonera” Cerro de la Silla, f). Sendero al “puerto del viento” Cerro de las Mitras, g) Paraje “el pinar” la Estanzuela, h). Sendero “el elefante” Cerro de la Silla, i) Bosque de coníferas en un paraje de la Sierra Madre Oriental.

Todos los sitios de prospección se visitaron al menos una vez durante cada estación del año con el objetivo de aumentar las probabilidades de encontrar la mayor diversidad de hongos en una fase de desarrollo apropiada para la colecta. Conforme con lo esperado, a nivel de campo se observaron una gran variedad de hongos de nutrición saprofítica sobre restos de troncos y ramas en el suelo o bien sobre los troncos de árboles muertos aun en pie, aunque también se encontraron algunos hongos que se desarrollan como parásitos. Una muestra de esta diversidad se puede ver en la figura 5.



Figura 5. Diversidad de basidiomicetos observados en las excursiones de prospección. Las fotografías nos dan una muestra de la gran variedad de hongos asociados a madera que se pueden encontrar en los cerros y parajes de la Sierra Madre Oriental aledaños a la zona metropolitana de Monterrey, N.L.

Entre los basidiomicetos que presentan este tipo de desarrollo se encuentran los principales géneros asociados con la pudrición blanca de la madera, que previamente han sido estudiados como potenciales degradadores de compuestos xenobióticos; por lo que nuestras colectas se enfocaron predominantemente sobre estos especímenes. Antes de su manipulación con fines de aislamiento y cultivo, los carpóforos se sometieron aun en estado fresco a un registro fotográfico con el objetivo de obtener detalles fenotípicos auxiliares para su identificación preliminar (al menos hasta género). En la figura 6 se presentan algunos ejemplos de los registros obtenidos.

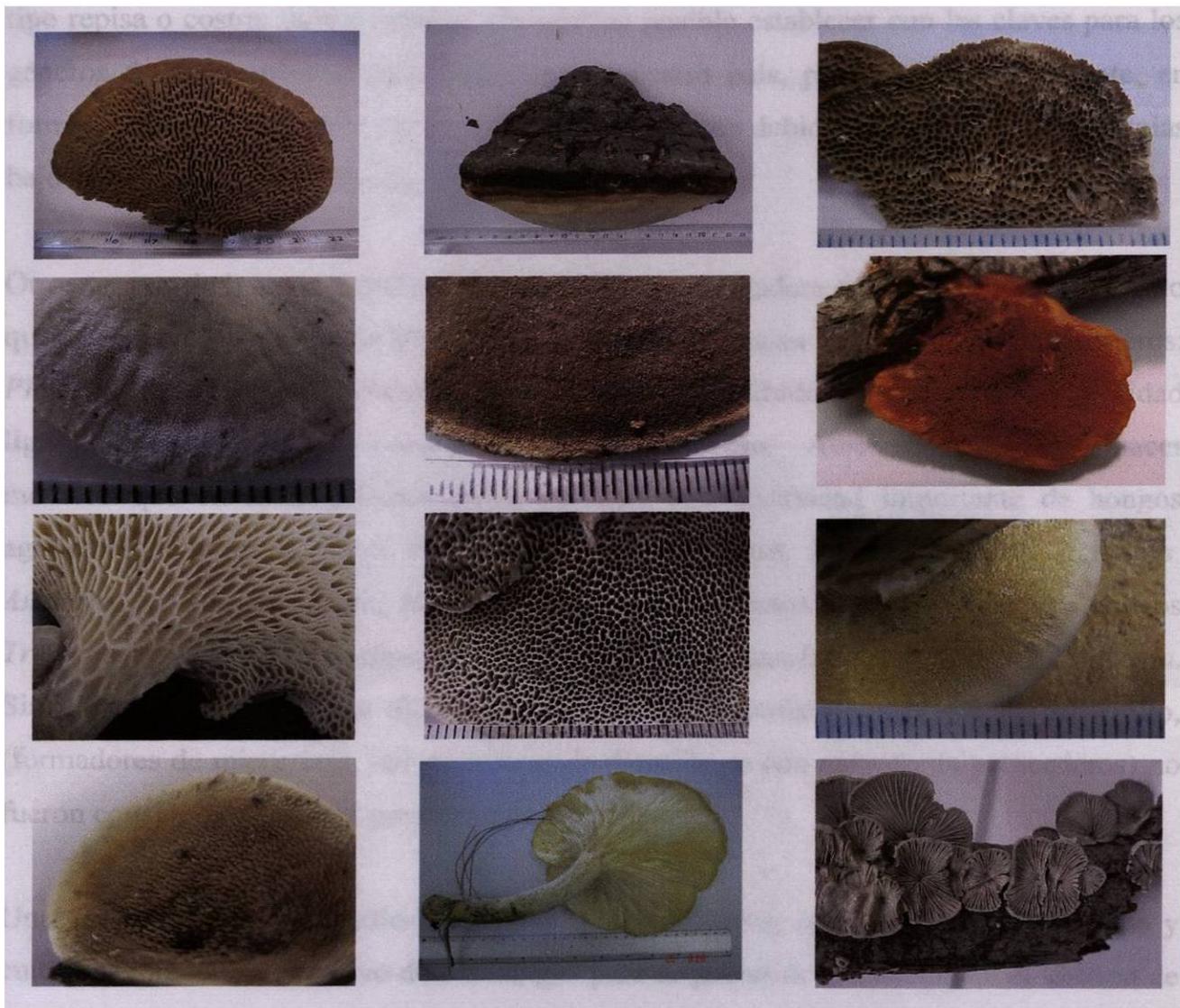


Figura 6. Registro de datos fenotípicos a nivel de laboratorio. En el laboratorio se realizaron registros de las características fenotípicas de los hongos como; forma, color y dimensiones del carpóforo, la presencia, forma y densidad de los poros, láminas u otras estructuras.

Entre los géneros identificados preliminarmente, de acuerdo a las claves macroscópicas de los hongos más comunes en México (Guzmán, G. 1980) se encuentran; *Pycnoporus*, *Polyporus*, *Schizophyllum*, *Ganoderma*, *Trametes*, *Stereum*, *Chondrostereum*, *Inonotus*, *Phellinus*, *Fomes*, *Daedalea*, *Trichaptum*, *Merulius*, *Irpex*, *Steccherinum*, *Poria*, *Hexagona*, *Lenzites* y *Cerrena*. La mayoría de estos géneros de basidiomicetos incluyen especies reportadas como causantes de la podredumbre blanca de la madera, aunque también existen algunos con especies causantes de la podredumbre café, No obstante, estos últimos también se intentaron aislar y cultivar con fines comparativos. Además de los anteriores, la colecta también abarcó una serie de hongos poliporáceos con carpóforos tipo repisa o costra cuyos géneros no nos fue posible establecer con las claves para los géneros de macromicetos más comunes de nuestro país, pero que posteriormente, en forma ya asilada, se confirmaron como basidiomicetos debido a la presencia de fibulas bajo observación microscópica.

Otros grupos de hongos basidiomicetos asociados con madera en proceso de decaimiento que se observaron con cierta frecuencia fueron los agaricales en particular de los géneros; *Pleurotus*, *Pluteus*, *Crepidotus* y *Panus*, los cuales debido a su reportada capacidad lignolítica también fueron considerados para el estudio. Adicionalmente, cabe hacer mención que en estas excursiones se observó una diversidad importante de hongos agaricales de otros géneros, como por ejemplo; *Boletus*, *Suillus*, *Collibia*, *Agaricus*, *Amanita*, *Rusulla* y *Lepiota*, así como otros basidiomicetos gelatinosos de los géneros *Tremella* y *Auricularia*, y algunos ascomicetos como *Scutelinia*, *Phyllipsia* y *Cookenia*. Sin embargo, debido a sus diferentes características ecofisiológicas y/o de desarrollo, (formadores de micorrizas, colonizadoras de mantillo, o con carpóforos perecederos) no fueron considerados para el presente estudio.

Una vez obtenidos los detalles de los cuerpos fructíferos, se procedió al aislamiento y cultivo del micelio vegetativo de los hongos para su posterior evaluación en el sistema de selección. Mediante el uso de protocolos estándar de micología se logró la creación de una colección de 91 aislados de basidiomicetos nativos de las serranías y montañas aledañas a Monterrey, N.L. Los diferentes aislados se ordenaron en la colección con una

clave compuesta por letras y números, indicando las iniciales del sitio de procedencia y la secuencia de colecta del espécimen del cual se logró el aislamiento, respectivamente. Los aislados ya purificados, presentaron diversas características en la morfología y patrón de crecimiento colonial, como; bordes (liso, dentado, aserrado, etc.), elevación (plano y convexo), volumen (escaso, moderado y abundante), textura (algodonoso, arenoso, aterciopelado, afelpado), zonación (continuo o con anillos concéntricos), así como también en la coloración de las masas de hifas y la producción de pigmentos que difunden al medio. Una descripción detallada de algunas de estas características para cada uno de los aislados obtenidos se presenta en el anexo I. Algunas fotos ilustrativas se pueden ver en la figura 7. Cabe además mencionar, que a nivel microscópico también se presentaron algunas variaciones, principalmente en el tamaño de las hifas y de las fibulas.

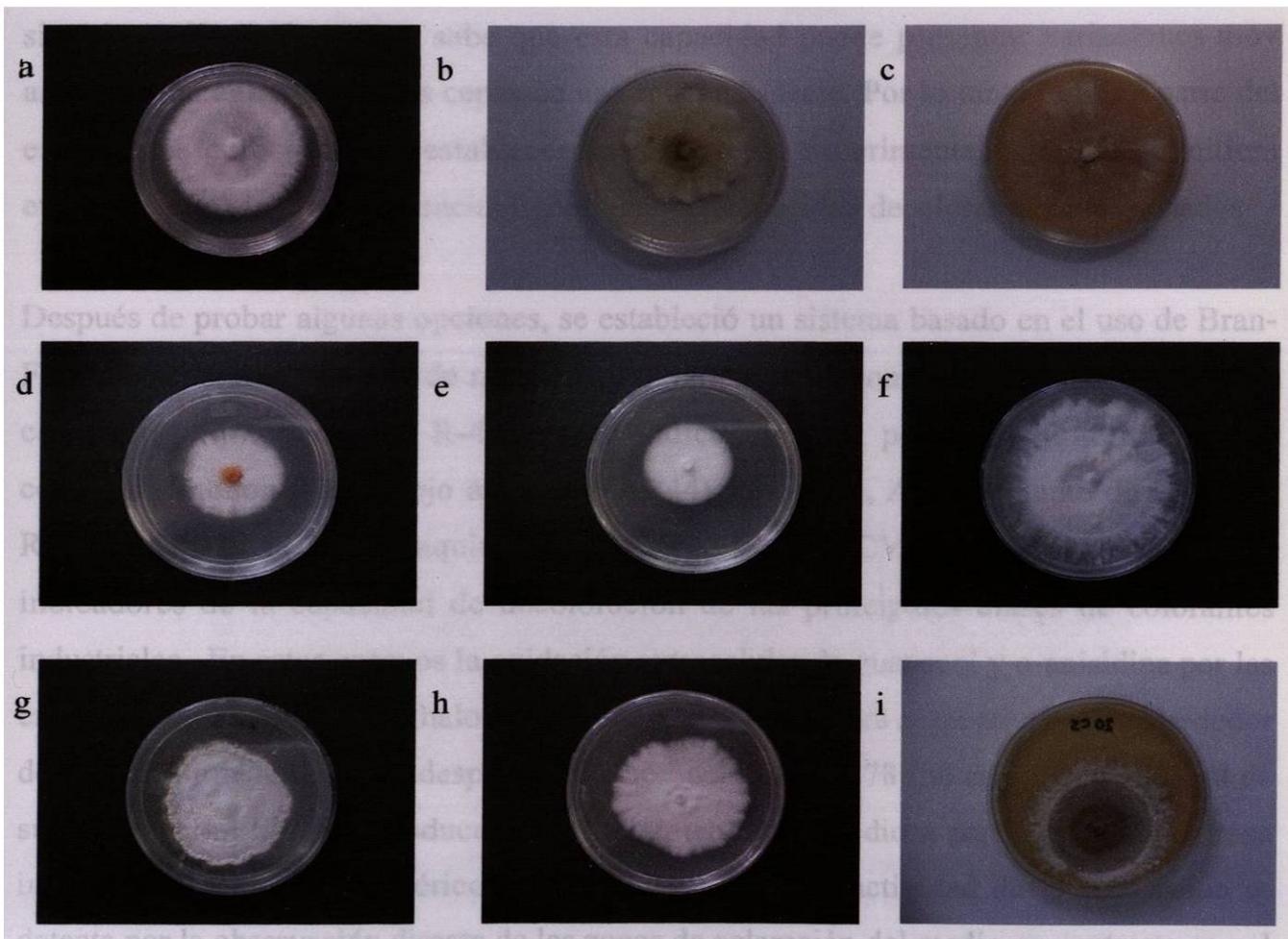


Figura 7. Características macroscópicas de los basidiomicetos aislados en cultivo como micelio vegetativo. Se presenta una muestra de los diferentes patrones de crecimiento de los hongos obtenidos en forma aislada como micelio vegetativo. Los aislados corresponden a: a) CF 7, b) CS 60, c) CS 43, d) CS 2, e) LE 31, f) CS 5, g) CS 21, h) CS 78 , i) CS 20.

Aunque las características del micelio vegetativo no se pueden tomar con fines taxonómicos, la producción de una determinada coloración en el micelio vegetativo con tonos similares a las encontradas en los cuerpos fructíferos originales, o bien, la formación de primordios de fructificación con formas y patrones de poros similares a las fuentes aislamiento, se pueden tomar como índices del logro un buen aislamiento y conservación adecuada de los cultivos a lo largo del estudio.

Selección de los aislados con la mejor capacidad lignolítica y potencial decolorante

La actividad lignolítica de los basidiomicetos se ha asociado con su habilidad para atacar y transformar oxidativamente una gran variedad de compuestos xenobióticos contaminantes, entre los cuales se incluyen los principales grupos de colorantes sintéticos. Sin embargo, se sabe que esta capacidad puede presentar variaciones muy amplias, aun entre diferentes cepas de una misma especie. Por lo tanto, en esta parte del estudio nos enfocamos en establecer una estrategia experimental que nos permitiera evaluar paralelamente el potencial lignolítico y la capacidad decolorante de los aislados.

Después de probar algunas opciones, se estableció un sistema basado en el uso de Bran-Flakes comercial en placas de medio sólido adicionadas con guayacol, o-anisidina y el colorante polimérico Poly R-478 como indicadores del potencial lignolítico y los colorantes monoméricos Rojo ácido 44 (AR44) (tipo azo), Azul Brillante de Remazol Reactivo (RBBR) (tipo antraquinónico) y Cristal Violeta (CV)(tipo triarilmetano) como indicadores de la capacidad de decoloración de las principales clases de colorantes industriales. En estos ensayos la oxidación extracelular de guayacol y o-anisidina por las enzimas lignolíticas genera halos de color naranja y púrpura respectivamente alrededor del micelio, mientras que la despolimerización del Poly R-478 (un análogo estructural de sustrato natural lignina) produce el amarillamiento del medio a partir de un color rosa intenso del colorante polimérico intacto. Por su parte, la actividad de decoloración se detecta por la observación directa de las zonas de aclaración del medio en contraste con el color inicial inherente al colorante sintético en cuestión. Esta estrategia experimental y su aplicación con algunos aislados nativos se ilustran en la figura 8.



Figura 8. Estrategia experimental para la selección de los aislados con mejor potencial lignolítico y capacidad decolorante y su aplicación con aislados nativos de basidiomicetos.

Con este protocolo se llevó a cabo la selección de los aislados con los mejores potenciales lignolíticos y capacidad decolorante. Una descripción de los resultados se presenta a continuación y también en forma tabulada en el Anexo I.

En relación con la capacidad de producción de oxidasas y peroxidasas lignolíticas por los 91 aislados nativos incluidos en este estudio se encontró que 66 (72 %) fueron positivas para la oxidación de guayacol y 67 (73.6 %) para la oxidación de o-anisidina. La capacidad de oxidar estos dos compuestos se presentó en forma conjunta, ya que con la excepción de un aislado que sólo pudo oxidar la o-anisidina, todos los demás aislados mostraron actividad sobre ambos sustratos. Las reacciones positivas aparecieron a menudo en forma casi inmediata después de la inoculación (2 - 4 h) o durante el primer día del crecimiento, aunque en algunos casos se presentaron después de varios días y ocurrieron en forma asincrónica. Asimismo, la coloración asociada con la oxidación de los sustratos presentó variaciones amplias en intensidad, desde tonos muy altos hasta tonos casi imperceptibles, indicando la existencia de diferencias cualitativas y/o cuantitativas en la producción de las enzimas lignolíticas, que podrían reflejarse en la capacidad para degradar lignina entre los diferentes aislados.

Para ilustrar los resultados anterior, en la figura 9 se presenta un comparativo a los cinco días del cultivo para la capacidad de producción de oxidasas y/o peroxidasas lignolíticas entre la cepa de referencia *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 (como control positivo) (serie 1) y los aislados nativos CS 5 (serie 2), LE 16 (serie 3), CS 11 (serie 4) y SM 2 (serie 5). Las series A y B corresponden a las placas adicionadas con guayacol vistas respectivamente desde la cubierta (para comparar el crecimiento) y el fondo (para hacer más evidente la reacción). De esta misma forma las series C y D corresponden a las placas adicionadas con o-anisidina. Se pueden ver que los aislados nativos CS 5 y LE 16 fueron positivos en ambas pruebas, aunque el primero mostró un mejor desempeño tanto en el crecimiento, como en la capacidad de reacción, que incluso superaron los mostrados por *P. chrysosporium*. Es importante recordar que esta cepa de referencia ocasiona la podredumbre blanca de la madera y posee una reconocida capacidad lignolítica cumpliendo la función de control positivo. Por su parte, los aislados CS 11 y SM 2 no dieron reacción para ninguno de los dos sustratos indicadores y aunque su crecimiento fue más limitado tampoco mostraron actividad oxidante sobre guayacol y o-anisidina a las 2-3 semanas del crecimiento cuando el micelio ocupó el total de la superficie en las placas.

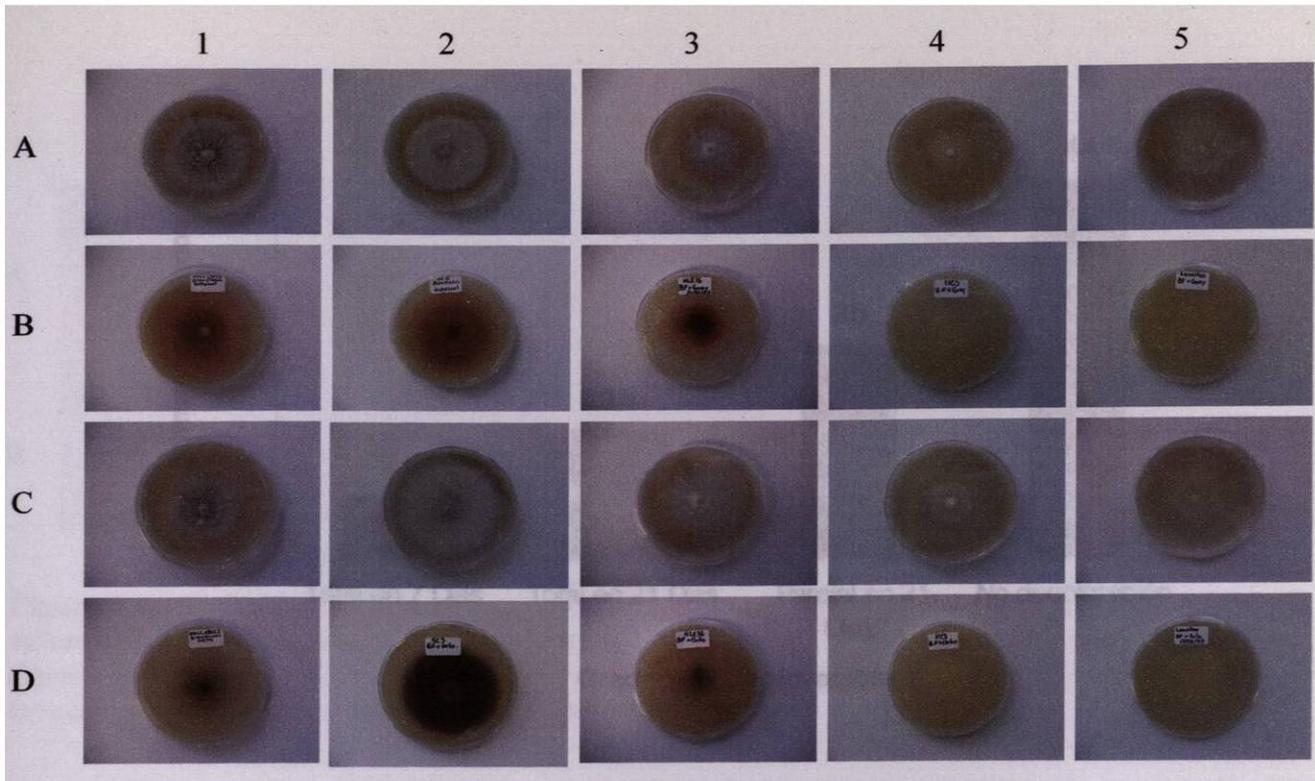


Figura 9. Comparación en la Capacidad de Producción de Oxidasas y/o Peroxidasas entre la cepa de referencia *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24735 y algunos aislados nativos. Las series verticales representan: *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24735 (1), CS 5 (2), LE 16 (3), CS 11 (4) y SM 2 (5). Las series horizontales son: Placas adicionadas con guayacol vistas desde la cubierta (A) y fondo (B), y adicionadas con o-anisidina vistas desde la cubierta (C) y fondo (D).

Con respecto a las pruebas de decoloración del Poly R-478 (figura 10), se encontró que 47 (54 %) de los aislados mostraron la habilidad para atacar total o parcialmente a este sustrato polimérico dentro de los primeros 21 días del cultivo, mientras que los aislados restantes (44) no mostraron esta capacidad. Entre los 47 aislados que mostraron la actividad de decoloración del colorante polimérico, 25 lo hicieron de forma parcial y 22 de forma total, y de estos últimos, 15 requirieron de 2-3 semanas, pero 7 lo hicieron dentro de la primera semana. Cabe mencionar que debido a las diferencias en la velocidad de crecimiento entre los aislados, el grado de decoloración dentro de la primera semana se normalizó por el área de crecimiento; Así, la decoloración total se consideró como la asociada exclusivamente con el área cubierta por el micelio al punto de registro, independientemente de si el hongo cubrió o no el total de la superficie de la placa en este tiempo.

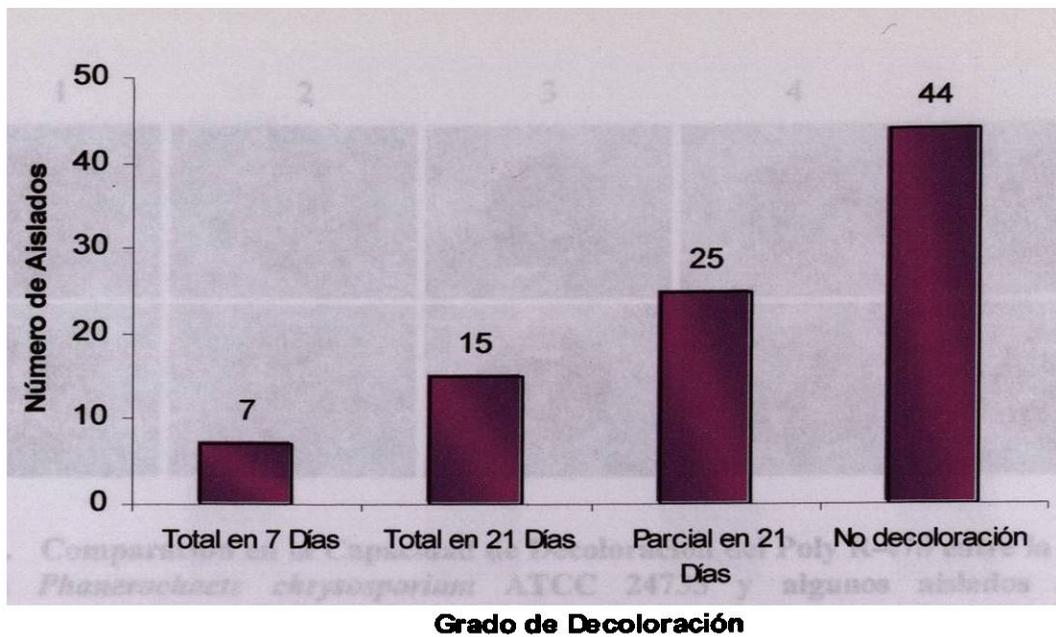


Figura 10. Resultados de los ensayos en placa mostrando la capacidad de los 91 aislados nativos probados para decolorar el Poly R-478. Los hongos se crecieron por 21 días sobre placas conteniendo 0.02% del colorante. Cada columna presenta el grado de decoloración y los días requeridos para alcanzarlo.

Todos los aislados que mostraron la habilidad para actuar sobre el Poly R-478, también mostraron la capacidad de producir las oxidasas y/o peroxidasas lignolíticas. Sin embargo, no todos los productores de estas actividades fueron también capaces de atacar al colorante polimérico (ver anexo I). Estos resultados se ilustran en la figura 11 donde se presenta un comparativo a los 5 días del cultivo entre una cepa de referencia y algunos de los aislados nativos de nuestra colección. Se puede ver que el aislado CS 5 (2) es el único que mostró la capacidad de despolimerización rápida del Poly R- 478 superando a la cepa referencia *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 (1). El aislado LE 16 no tuvo esta capacidad a pesar de ser positivo para las pruebas de producción de oxidasas y/o peroxidasas. Una posible explicación sería que la despolimerización del sustrato por este tipo de aislados dependa de la participación de mediadores de oxidorreducción, los cuales, bajo nuestras condiciones de ensayo solo serían producidos por los aislados positivos la decoloración del Poly R 478. Por su parte, lo aislados CS 11 (4) y SM 2 (5) que no mostraron la capacidad de producción de enzimas lignolíticas, también fueron negativos para la decoloración del sustrato polimérico.

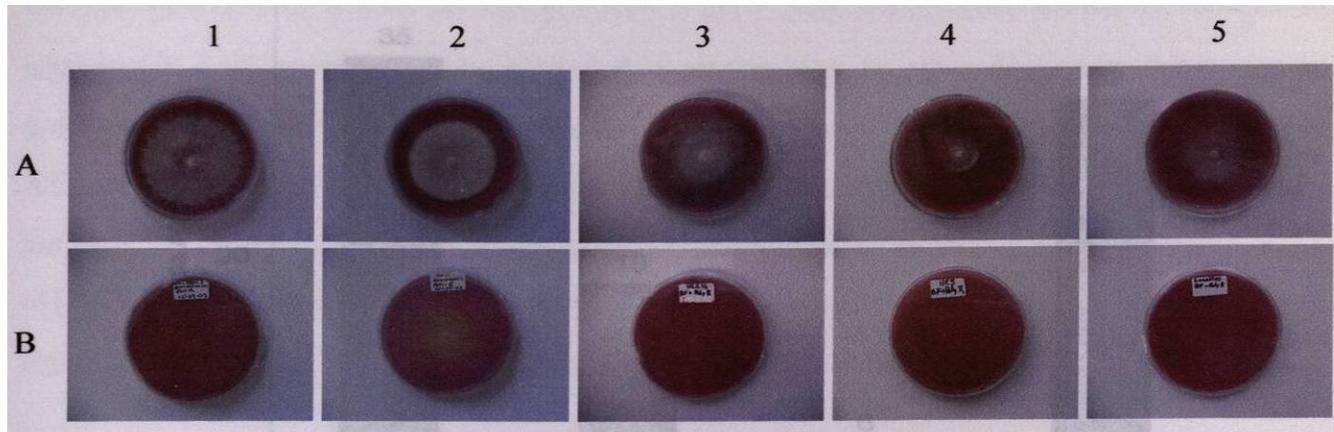


Figura 11. Comparación en la Capacidad de Decoloración del Poly R-478 entre la cepa de referencia *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24735 y algunos aislados nativos. *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24735 (1), CS 5 (2), LE 16 (3), CS 11 (4) y SM 2 (5), para las placas vistas desde la cubierta (A) y fondo (B).

Entre los colorantes sintéticos representativos de los tres grupos principales de colorantes utilizados industrialmente, se encontró que los colorantes de tipo antraquinónico Azul Brillante de Remazol Reactivo (RBBR) y azo, Rojo Ácido 44 (AR 44) resultaron los más susceptibles a decoloración en las placas de medio Bran-Flakes sólido.

En la figura 12 se puede ver que de los 91 aislados ensayados, 59 (65%) mostraron habilidad para decolorar en forma total o parcial el RBBR mientras que 32 no mostraron esta capacidad. Entre los aislados que mostraron la decoloración, 53 lo hicieron de forma total y solo 6 de forma parcial y de los aislados que mostraron la decoloración total, 35 lo lograron dentro de la primera semana, mientras que 18 requirieron de un plazo mayor.

En la figura 13 se puede ver que 61 (67%) de los aislados ensayados mostraron capacidad para decolorar total o parcialmente el colorante tipo azo AR 44. Entre todos los aislados que mostraron acción sobre este colorante azoico, 53 lo hicieron de forma total y 8 de forma parcial y de los aislados que mostraron la capacidad de decoloración total, 37 lo hicieron dentro de la primera semana mientras que 16 requirieron de un plazo mayor.

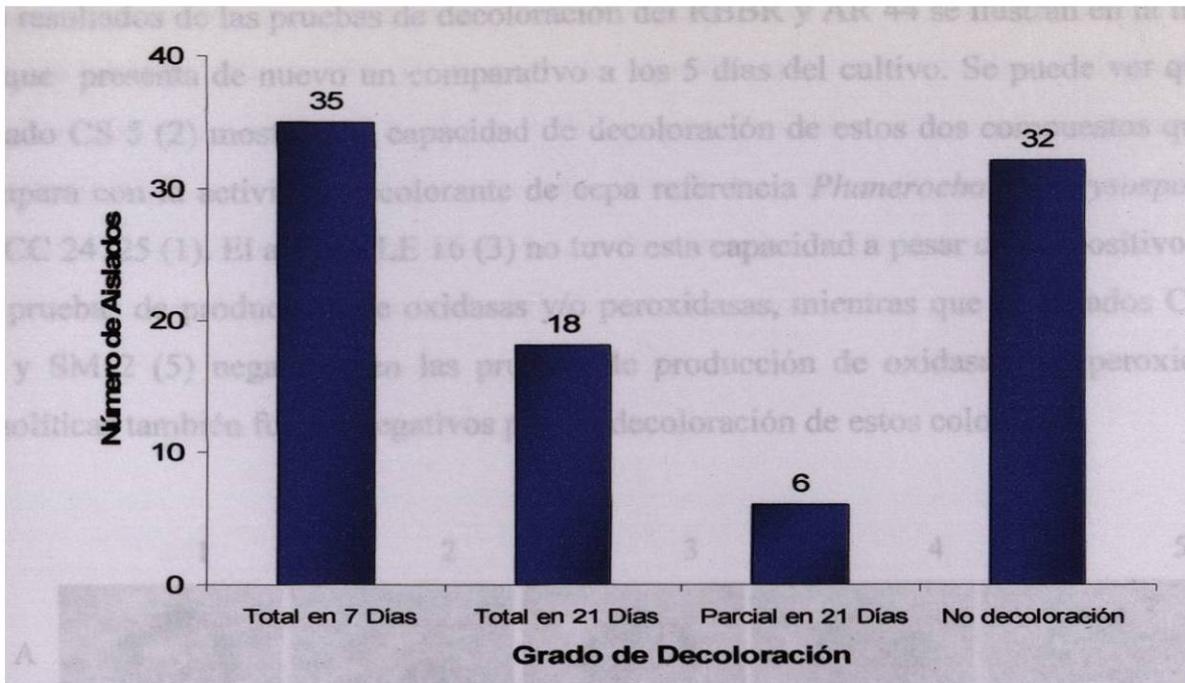


Figura 12. Resultados de los ensayos en placa mostrando la capacidad de los 91 aislados nativos probados para decolorar el Azul Brillante de Remazol Reactivo. Los hongos se crecieron por 21 días sobre placas conteniendo 0.02% del colorante. Cada columna presenta el grado de decoloración y los días requeridos para alcanzarlo.

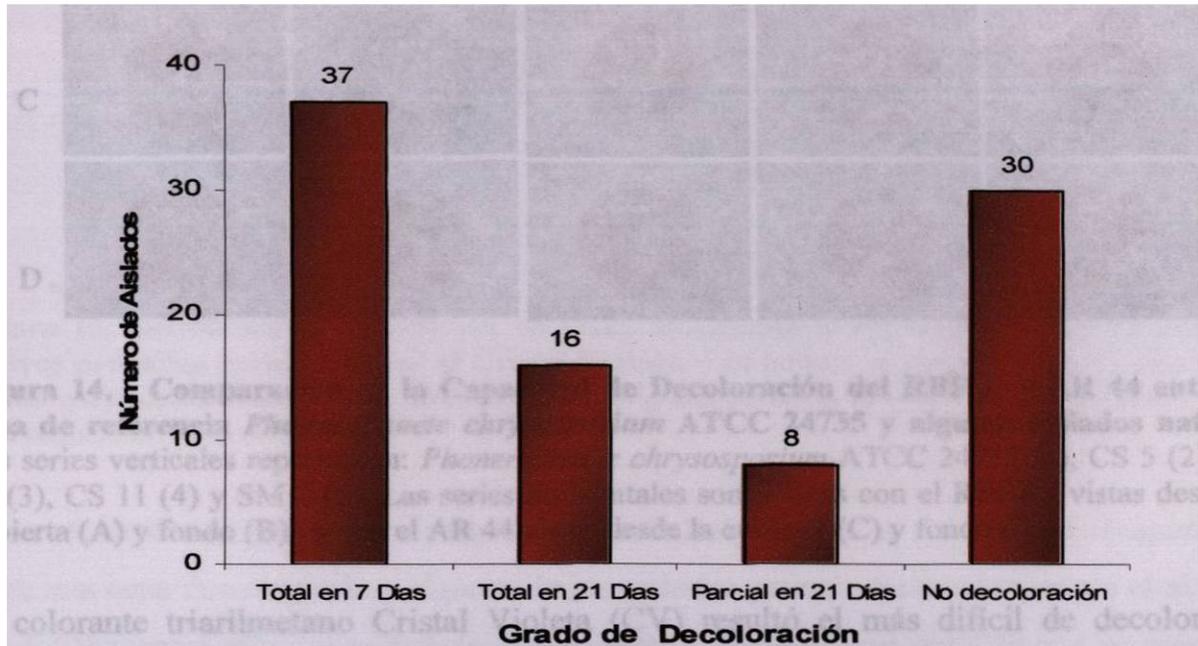


Figura 13. Resultados de los ensayos en placa mostrando la capacidad de los 91 aislados nativos probados para decolorar el Rojo Acido 44. Los hongos se crecieron por 21 días sobre placas conteniendo 0.02% del colorante. Cada columna presenta el grado de decoloración y los días requeridos para alcanzarlo.

Los resultados de las pruebas de decoloración del RBBR y AR 44 se ilustran en la figura 14 que presenta de nuevo un comparativo a los 5 días del cultivo. Se puede ver que el aislado CS 5 (2) mostró una capacidad de decoloración de estos dos compuestos que se compara con la actividad decolorante de cepa referencia *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 (1). El aislado LE 16 (3) no tuvo esta capacidad a pesar de ser positivo para las pruebas de producción de oxidasas y/o peroxidadas, mientras que lo aislados CS 11 (4) y SM 2 (5) negativos en las pruebas de producción de oxidasas y/o peroxidadas lignolíticas también fueron negativos para la decoloración de estos colorantes.

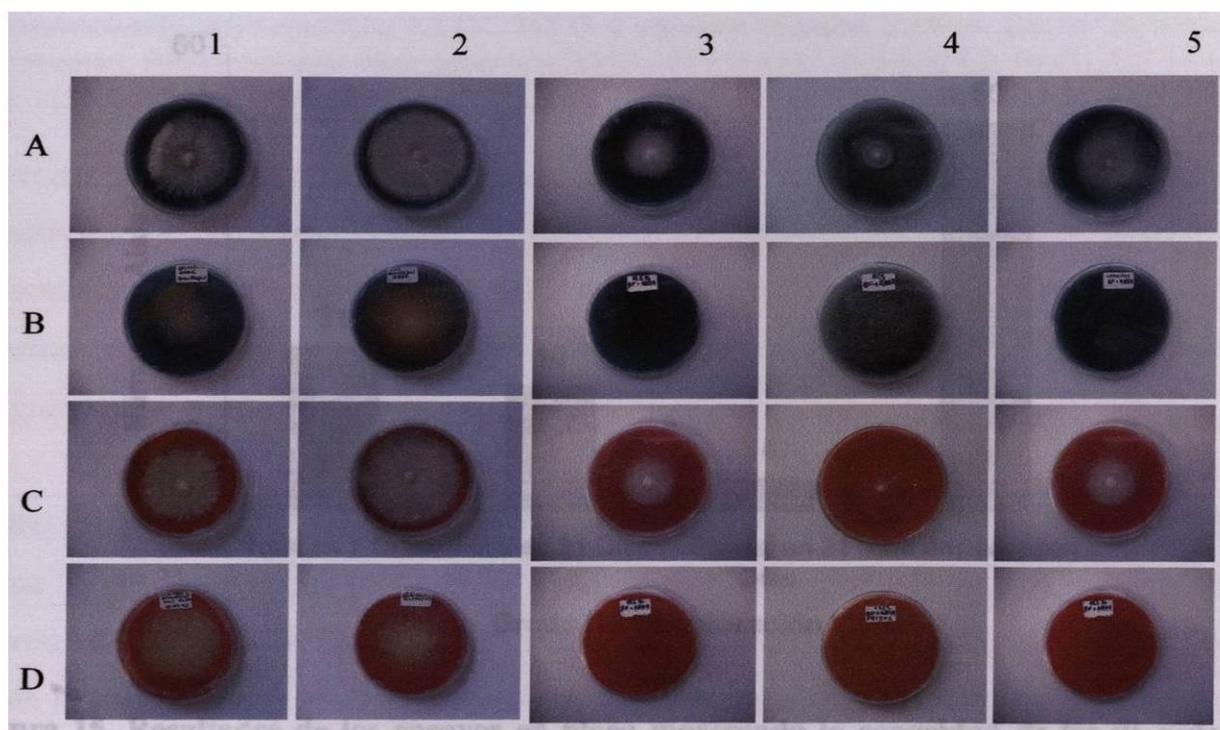


Figura 14. Comparación en la Capacidad de Decoloración del RBBR y AR 44 entre la cepa de referencia *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24735 y algunos aislados nativos. Las series verticales representan: *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24735 (1), CS 5 (2), LE 16 (3), CS 11 (4) y SM 2 (5). Las series horizontales son: Placas con el RBBR, vistas desde la cubierta (A) y fondo (B), y con el AR 44 vistas desde la cubierta (C) y fondo (D).

El colorante triarilmetano Cristal Violeta (CV) resultó el más difícil de decolorar y generalmente tuvo un efecto negativo sobre el crecimiento, llegando incluso en muchos casos a producir la inhibición total. No obstante a lo anterior, 41 de nuestros aislados nativos fueron capaces de crecer y producir la decoloración total o parcial de este colorante triarilmetano. Entre estos aislados 37 lo hicieron en forma total y 4 en forma

parcial y entre los que produjeron la decoloración total 21 lo lograron dentro de la primera semana (Figura15). Es importante recordar que para establecer el grado de decoloración se consideró sólo el área cubierta por el micelio, independientemente de si el aislado llegó a ocupar totalmente la superficie de las placas. En este caso, 31 aislados de los 50 reportados en la columna de no decoloración, realmente corresponden a los aislados que fueron completamente inhibidos en su crecimiento.

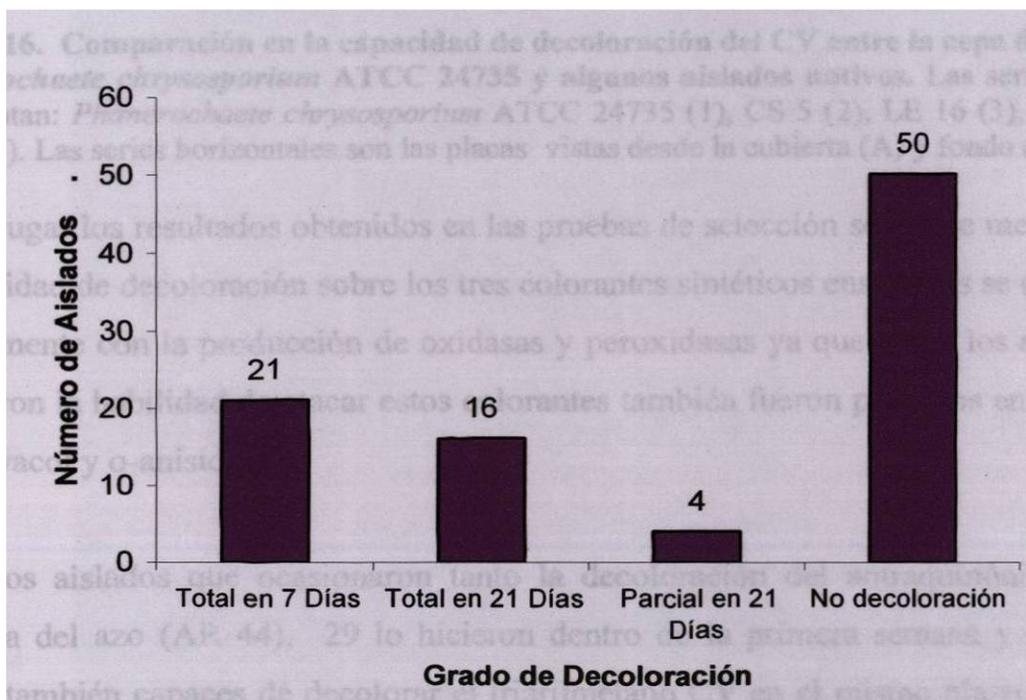


Figura 15. Resultados de los ensayos en placa mostrando la capacidad de los 91 aislados nativos probados para decolorar el Cristal Violeta. Los hongos se crecieron por 21 días sobre placas conteniendo 0.02% del colorante. Cada columna presenta el grado de decoloración y los días requeridos para alcanzarlo.

Estos resultados se ilustran en la figura 16 donde una vez más se presenta un comparativo entre una cepa de referencia y algunos de los aislados nativos. Se puede ver que el aislado CS 5 (2) mostró una capacidad de crecimiento y decoloración del CV que se compara favorablemente con los mostrados por *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 (1), en este caso el CV produjo una inhibición parcial del crecimiento. Por su parte, el resto de los aislados LE 16 (3), CS 11 (4) y SM 2 (5) fueron inhibidos totalmente por este colorante triarilmetano.

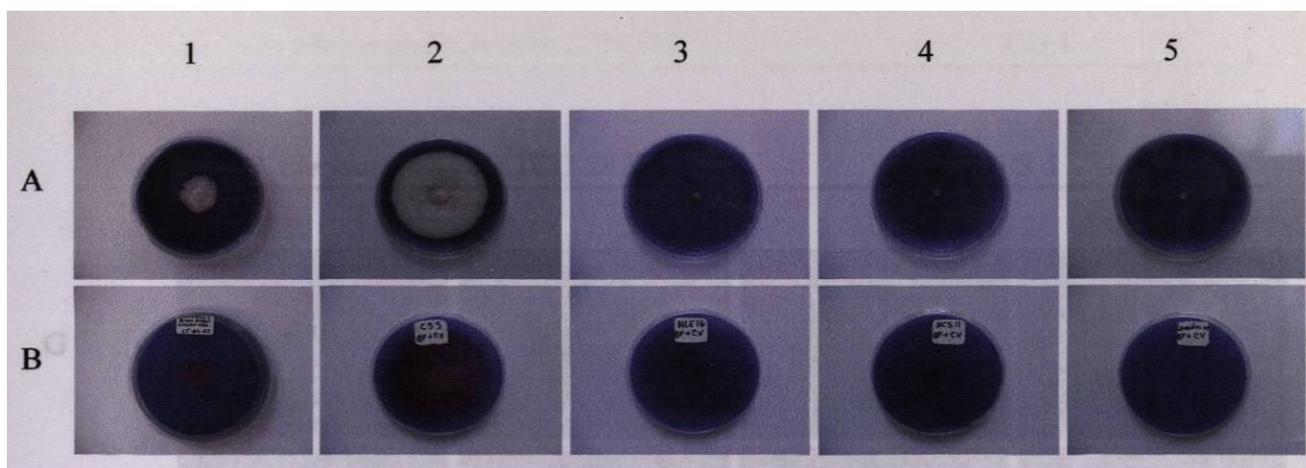


Figura 16. Comparación en la capacidad de decoloración del CV entre la cepa de referencia *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24735 y algunos aislados nativos. Las series verticales representan: *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24735 (1), CS 5 (2), LE 16 (3), CS 11 (4) y SM 2 (5). Las series horizontales son las placas vistas desde la cubierta (A) y fondo (B).

Al conjugar los resultados obtenidos en las pruebas de selección se puede mencionar que la actividad de decoloración sobre los tres colorantes sintéticos ensayados se correlaciona directamente con la producción de oxidasas y peroxidasas ya que todos los aislados que mostraron la habilidad de atacar estos colorantes también fueron positivos en las pruebas de guayacol y o-anisidina.

Entre los aislados que ocasionaron tanto la decoloración del antraquinónico (RBRR) como la del azo (AR 44), 29 lo hicieron dentro de la primera semana y de éstos 12 fueron también capaces de decolorar el triarilmetano CV en el mismo plazo. Asimismo, estos 12 aislados también fueron eficientes degradadores del Poly R-478 y 7 de estos (CS 2, CS 5, CS 61, CS 63, CU 1 y CF 4) (ver Anexo D) se encuentran entre los que más efectivamente atacaron a este colorante análogo de la lignina.

Entre estos últimos aislados se destacaron particularmente el CS 5 y CU 1 ya que además de comparar favorablemente con las cepas de referencia en las pruebas de potencial lignolítico y capacidad decolorante, también mostraron una velocidad de crecimiento alta que les permitió cubrir por completo la superficie de las placas con el medio Bran-Flakes dentro de una semana. Los resultados comparativos generales a los cinco días del cultivo para estos dos aislados contra la cepa de referencia *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24735 se presentan respectivamente en las figuras 17 y 18.

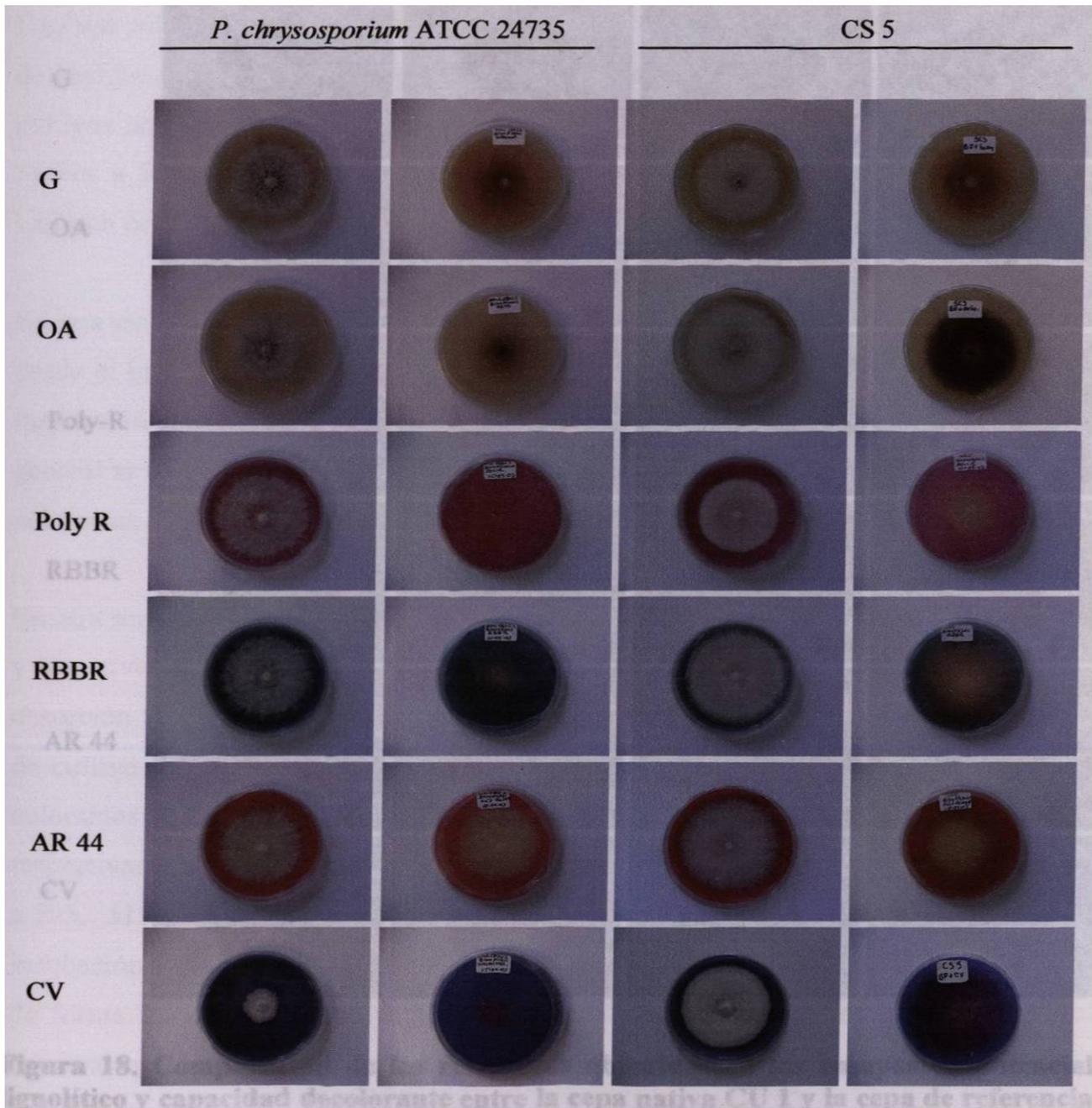


Figura 17. Comparación de los resultados obtenidos en los ensayos de potencial lignolítico y capacidad decolorante entre la cepa nativa CS 5 y la cepa de referencia *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725. Para cada caso se presentan placas a los 5 días de incubación vistas desde la cubierta para mostrar el crecimiento (izquierda) y desde fondo para mostrar la reacción o decoloración (derecha): Placas adicionadas con guayacol (G), o-anisidina (OA), Poly R-478 (Poly R), Azul Brillante de Remazol Reactivo (RBBR), Rojo Ácido (AR 44) y Cristal Violeta (CV).

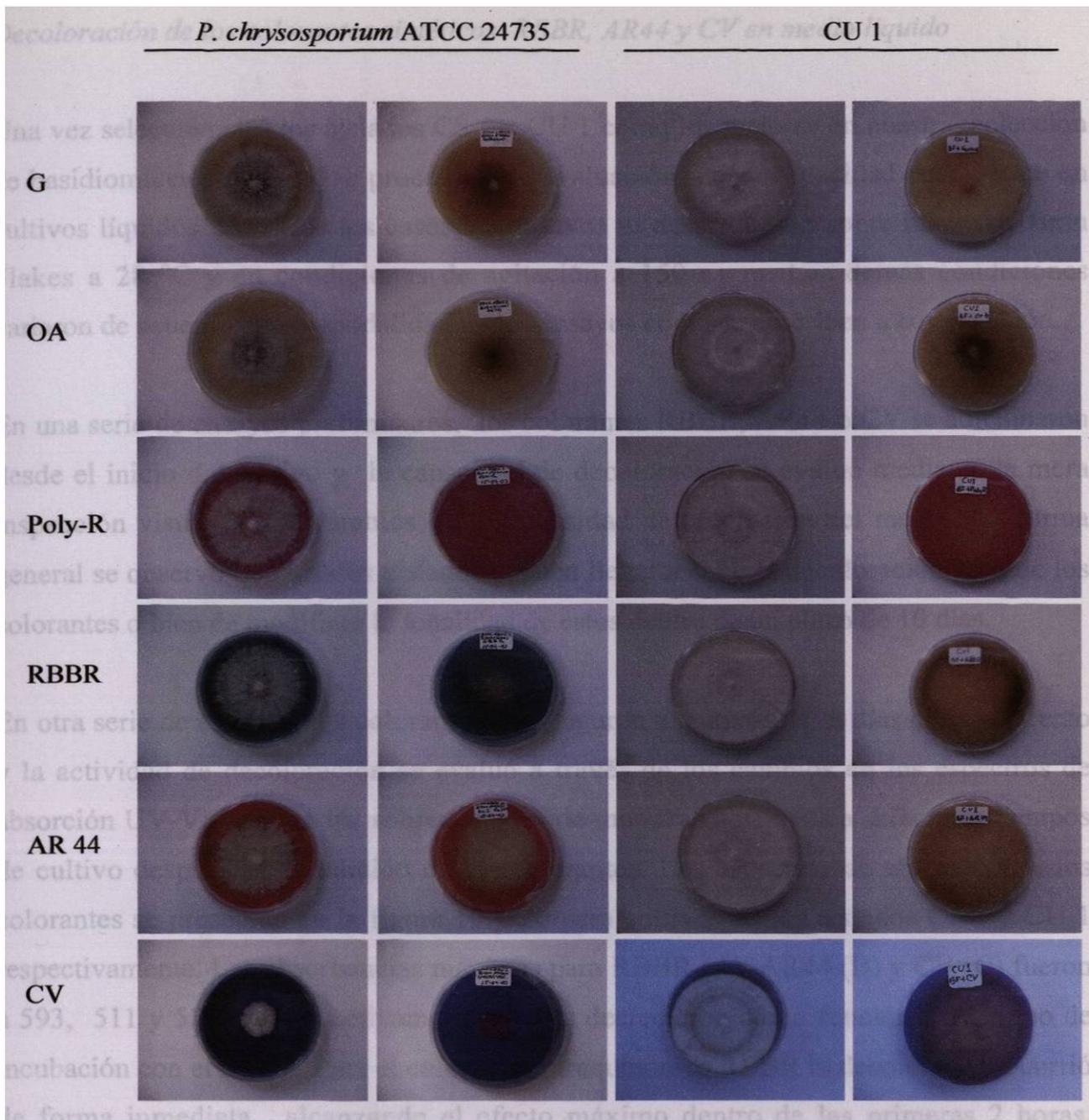


Figura 18. Comparación de los resultados obtenidos en los ensayos de potencial lignolítico y capacidad decolorante entre la cepa nativa CU 1 y la cepa de referencia *Phanerochaete chrysosporium* ATTC 24725. Para cada caso se presentan placas a los 5 días de incubación vistas desde la cubierta para mostrar el crecimiento (izquierda) y desde fondo para mostrar la reacción o decoloración (derecha): Placas adicionadas con guayacol (G), o-anisidina (OA), Poly R-478 (Poly R), Azul Brillante de Remazol Reactivo (RBBR), Rojo Ácido (AR 44) y Cristal Violeta (CV).

Decoloración de los colorantes sintéticos RBBR, AR44 y CV en medio líquido

Una vez seleccionados los aislados CS 5 y CU 1 como los mejores en nuestra colección de basidiomicetos nativos, se procedió a la evaluación de su capacidad decolorante en cultivos líquidos. En todos los casos los cultivos se desarrollaron sobre medio de Bran Flakes a 28 °C y en condiciones de agitación a 150 r.p.m. Las demás condiciones variaron de acuerdo con la modalidad de los ensayos como se describen a continuación.

En una serie de ensayos preliminares, los colorantes RBBR, AR44 o CV se adicionaron desde el inicio del cultivo y la capacidad de decoloración se evaluó mediante la mera inspección visual de los cambios en la intensidad de coloración del medio. En forma general se observó que los dos aislados pueden llevar a cabo la decoloración total de los colorantes o bien de modificar la tonalidad de estos dentro de un plazo de 10 días.

En otra serie de ensayos, los colorantes se agregaron a cultivos de 8 días de crecimiento y la actividad de decoloración se evaluó a través de los cambios en los espectros de absorción UV-Visible en los sobrenadantes de muestras obtenidas a diferentes tiempos de cultivo después de la adición de los colorantes. Los espectros de absorción de los colorantes se presentan en la figura 19 y 20 para cultivos de los aislados CS 5 y CU 1 respectivamente. Las absorbancias máximas para RBBR (A), AR44 (B) y CV (C) fueron a 593, 511 y 585 nm respectivamente y estas decrecieron como función del tiempo de incubación con el hongo. Para el colorante antraquinónico RBBR la decoloración ocurrió de forma inmediata, alcanzando el efecto máximo dentro de las primeras 2 horas, mientras que los otros dos colorantes requirieron más de 8 horas para llegar a niveles comparables. En el caso del triarilmetano CV se presentó un cambio continuo en el pico de absorbancia máximo de 588 a 564 nm en los cultivos del aislado CS 5 y de 588 a 558 nm para el CU 1. Los cambios en la relación de absorbancias (por ejemplo 511 nm vs. 328 nm) indica que la decoloración no fue por la absorción del colorante al micelio de los hongos, sino que se debe a la transformación de los colorantes a través de diferentes intermediarios (Maximo, C. *et al* 2003).

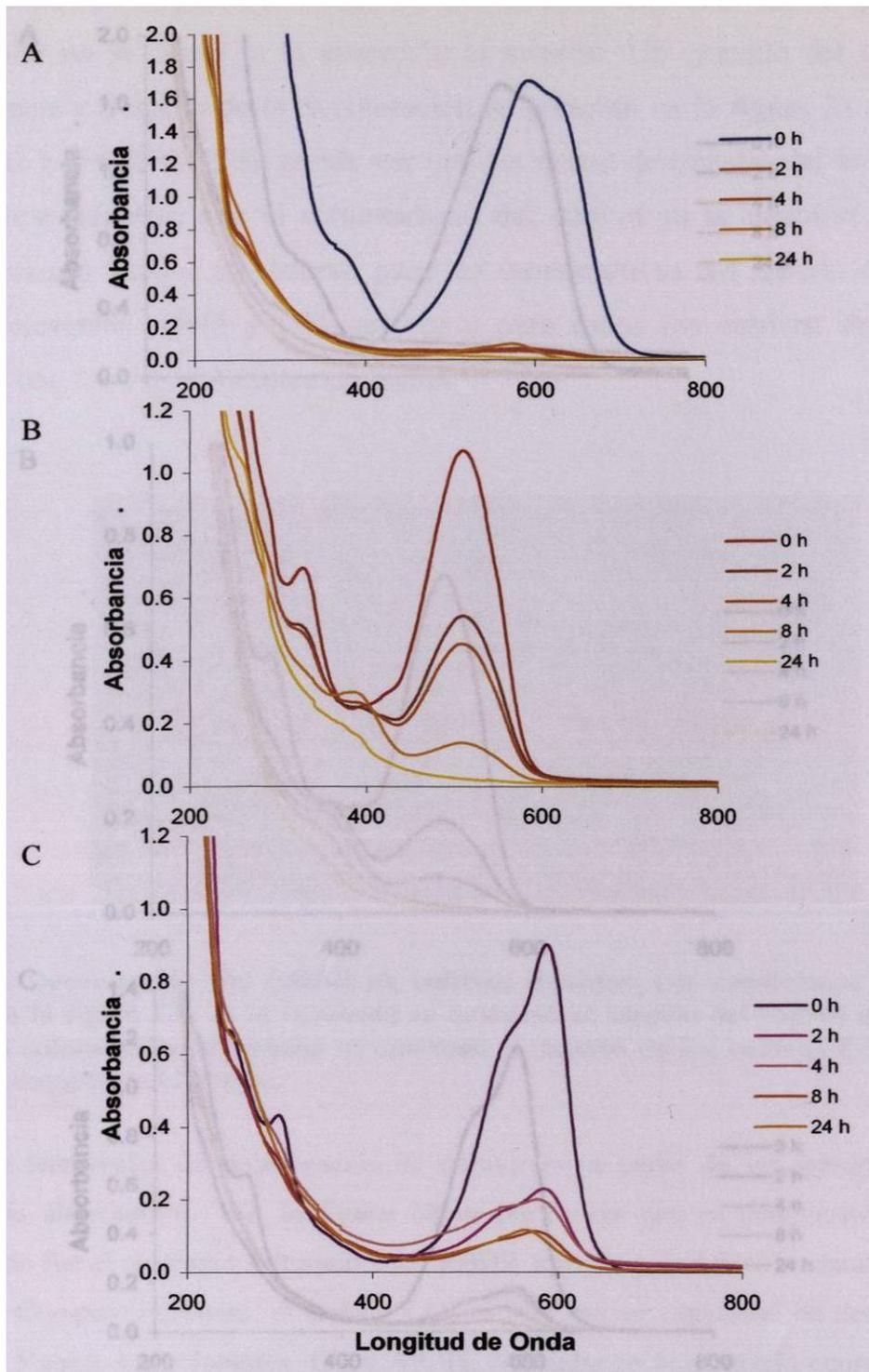


Figura 19. Espectros de absorción de los colorantes sintéticos durante la decoloración en cultivos líquidos del aislado nativo CS 5. Los cultivos se desarrollaron bajo las condiciones descritas en el texto. Los colorantes se agregaron a los 8 días del cultivo a una concentración final de 0.02%. Después de la adición, se tomaron alícuotas a los tiempos indicados y los sobrenadantes se separaron por centrifugación para obtener los espectros de absorción en la zona de UV-Vis para los cultivos adicionados con RBBR (A), AR44 (B) y CV (C).

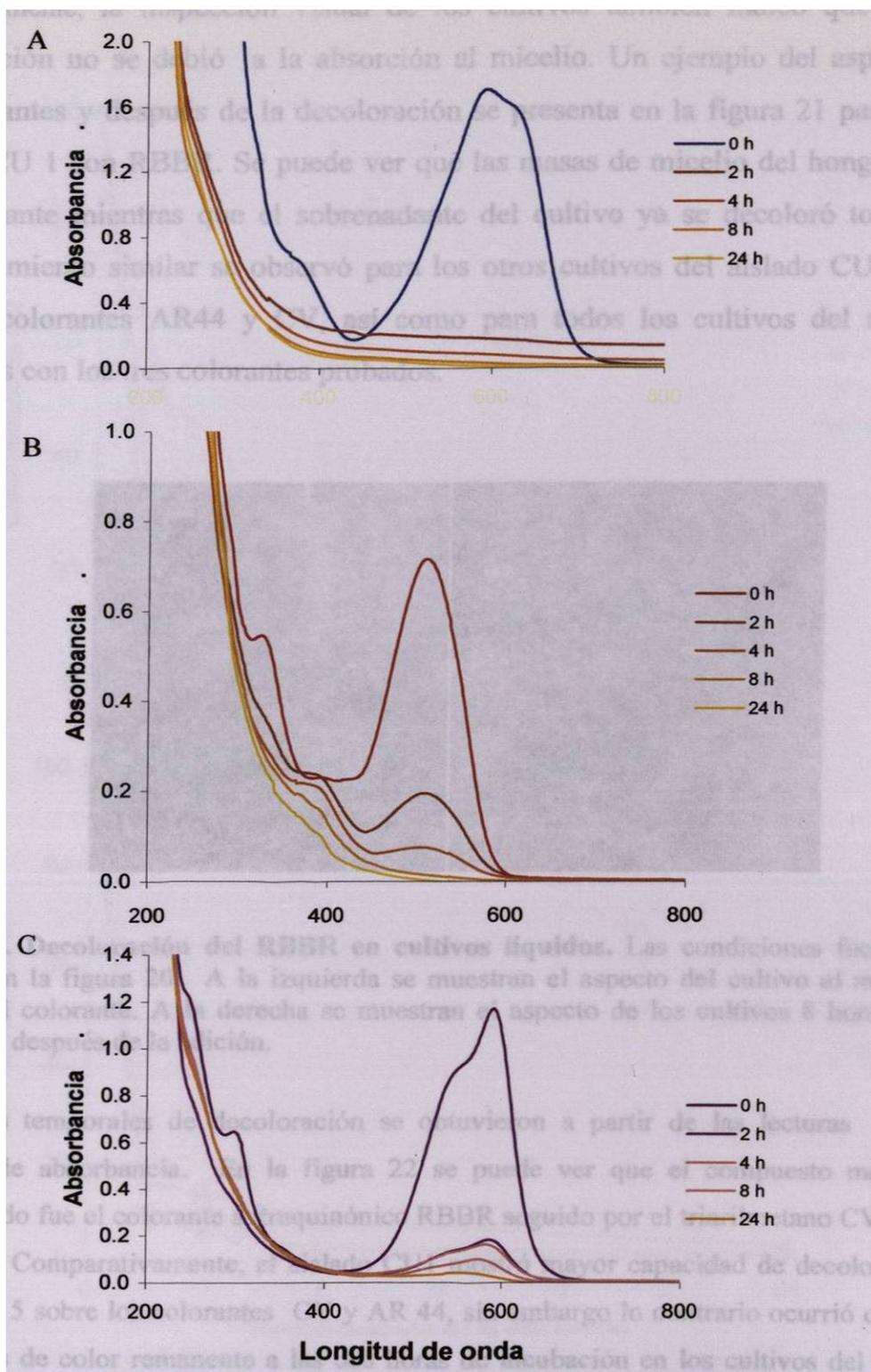


Figura 20. Espectros de absorción de los colorantes sintéticos durante la decoloración en cultivos líquidos del aislado nativo CU 1. Las condiciones de cultivo, obtención de los sobrenadantes y mediciones espectrofotométricas fueron similares a las descritas en la figura 19 para los cultivos adicionados con: RBBR (A), AR44 (B) y CV (C).

Adicionalmente, la inspección visual de los cultivos también indicó que el efecto de decoloración no se debió a la absorción al micelio. Un ejemplo del aspecto de estos cultivos antes y después de la decoloración se presenta en la figura 21 para el caso del aislado CU 1 con RBBR. Se puede ver que las masas de micelio del hongo están libres del colorante mientras que el sobrenadante del cultivo ya se decoloró totalmente. Un comportamiento similar se observó para los otros cultivos del aislado CU 1 incubados con los colorantes AR44 y CV, así como para todos los cultivos del aislado CS 5 incubados con los tres colorantes probados.

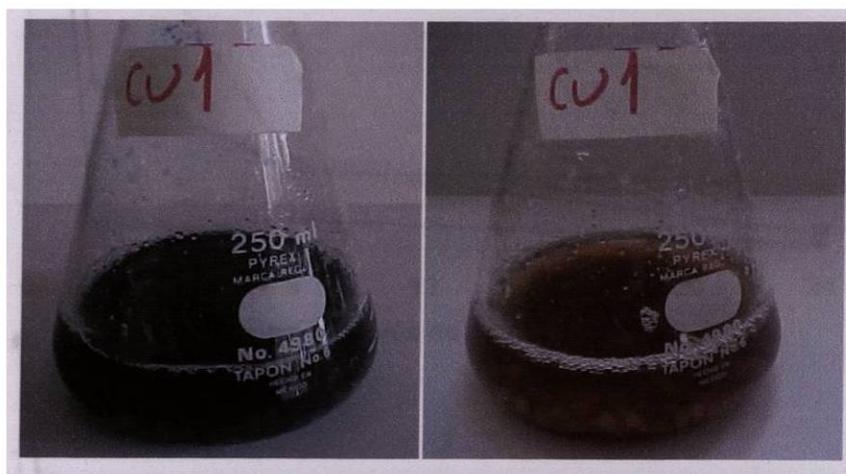


Figura 21. Decoloración del RBBR en cultivos líquidos. Las condiciones fueron como las descritas en la figura 20. A la izquierda se muestran el aspecto del cultivo al momento de la adición del colorante. A la derecha se muestran el aspecto de los cultivos 8 horas después de incubación después de la adición.

Los cursos temporales de decoloración se obtuvieron a partir de las lecturas en los picos máximos de absorbancia. En la figura 22 se puede ver que el compuesto más fácilmente transformado fue el colorante antraquinónico RBBR seguido por el triarilmetano CV y después el azo AR44. Comparativamente, el aislado CU1 mostró mayor capacidad de decoloración que el aislado CS 5 sobre los colorantes CV y AR 44, sin embargo lo contrario ocurrió con el RBBR. Los niveles de color remanente a las dos horas de incubación en los cultivos del aislado CS 5 fueron alrededor de 4.0, 26 y 50 % para el RBBR, CV y AR44 respectivamente, mientras que para el CU 1, estos valores fueron alrededor de 11, 17 y 26 %. Con la excepción de los cultivos del aislado CS 5 adicionado con CV donde a las 24 horas de incubación se encontró aún alrededor de 10 % de color remanente, en todas las otras condiciones la decoloración fue casi total (>98%).

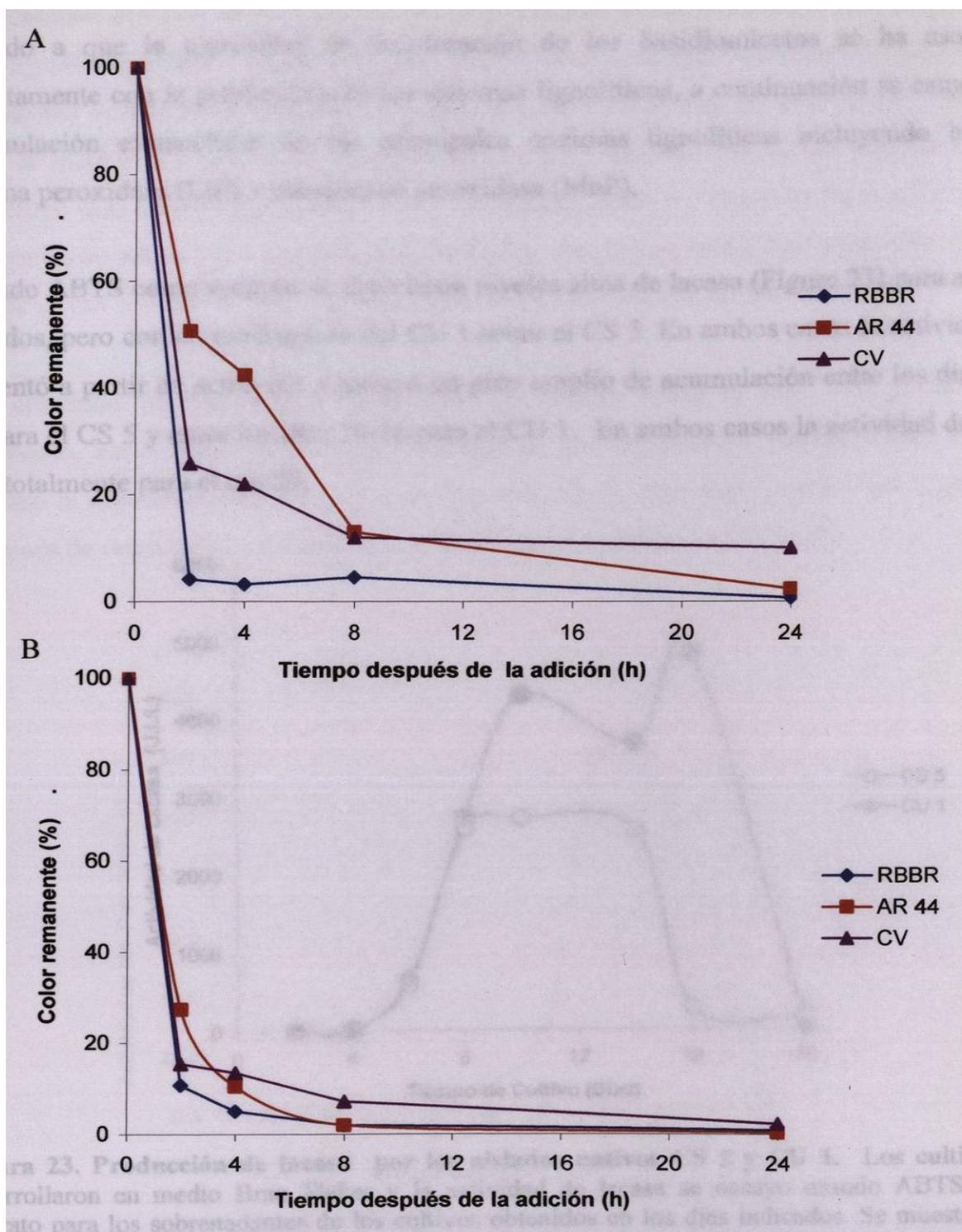


Figura 22. Curvas de decoloración de los colorantes sintéticos en cultivos líquidos de los aislados nativos. Se muestran los datos del aislado CS 5 (A) y CU 1 (B) obtenidos bajo las condiciones descritas en las figuras 19 y 20 respectivamente. Los porcentajes de color remanente se estimaron a partir de los picos de absorbancia principales para cada colorante (RBBR = 593 nm, AR44 = 511 nm y CV = 585 nm), tomando como 100% el valor de las lecturas al momento de la adición del colorante (tiempo cero).

Ensayos de producción de enzimas lignolíticas

Debido a que la capacidad de decoloración de los basidiomicetos se ha asociado directamente con la producción de los sistemas lignolíticos, a continuación se estudió la acumulación extracelular de las principales enzimas lignolíticas incluyendo lacasa, lignina peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP).

Usando ABTS como sustrato se detectaron niveles altos de lacasa (Figura 23) para ambos aislados, pero con un predominio del CU 1 sobre el CS 5. En ambos casos la actividad se presentó a partir de sexto día y mostró un pico amplio de acumulación entre los días 8 a 12 para el CS 5 y entre los días 10-16 para el CU 1. En ambos casos la actividad declinó casi totalmente para el día 20.

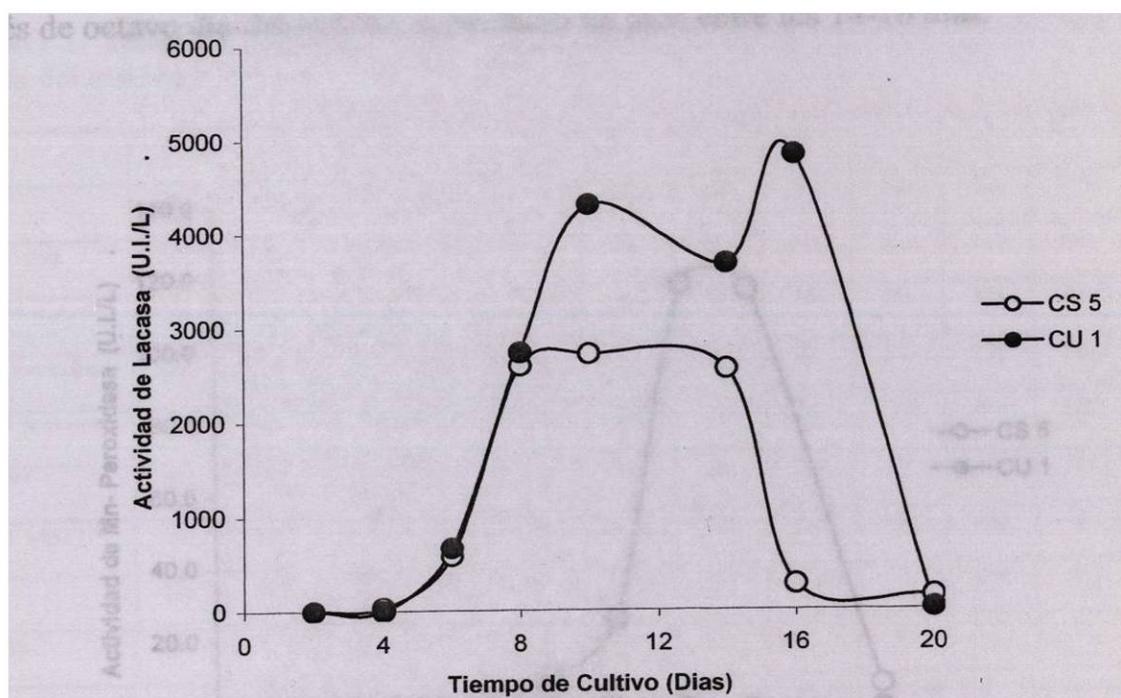


Figura 23. Producción de lacasa por los aislados nativos CS 5 y CU 1. Los cultivos se desarrollaron en medio Bran Flakes y la actividad de lacasa se ensayo usando ABTS como sustrato para los sobrenadantes de los cultivos obtenidos en los días indicados. Se muestran los datos de un experimento representativo (n = 3) por triplicado. La desviación estándar fue menor de 5 %.

El medio extracelular también se ensayó para la actividad de lignina peroxidasa, encontrando que ambos aislados mostraron actividad sobre el sistema 2,4- diclorofenol y 4-aminoantipirina (sustrato-cromógeno), sugiriendo la presencia de la LiP en los

extractos. Sin embargo, en ensayos control se observó que dicha preparaciones presentaban la capacidad de oxidar el 2,4-diclorofenol aun en ausencia del peróxido de hidrógeno. Así mismo, se encontró que estos extractos no fueron capaces de actuar sobre el alcohol veratrílico en condiciones de ensayo para actividad de peroxidasa. Debido a que el alcohol veratrílico es considerado como el sustrato específico para la LiP, se concluyó que los aislados CS 5 y CU 1 no producen esta enzima bajo las condiciones de crecimiento utilizadas en el presente trabajo y que la actividad detectada sobre el 2,4-diclorofenol se podría deber a la actividad de lacasa presente en los extractos.

La actividad de manganeso peroxidasas se ensayo sobre el Mn^{2+} en presencia de malonato. En la figura 24 se puede ver que de los dos aislados probados solo el CS 5 mostró la capacidad de producción de esta enzima. En este caso la actividad se presentó después de octavo día del cultivo, mostrando un pico entre los 14-16 días.

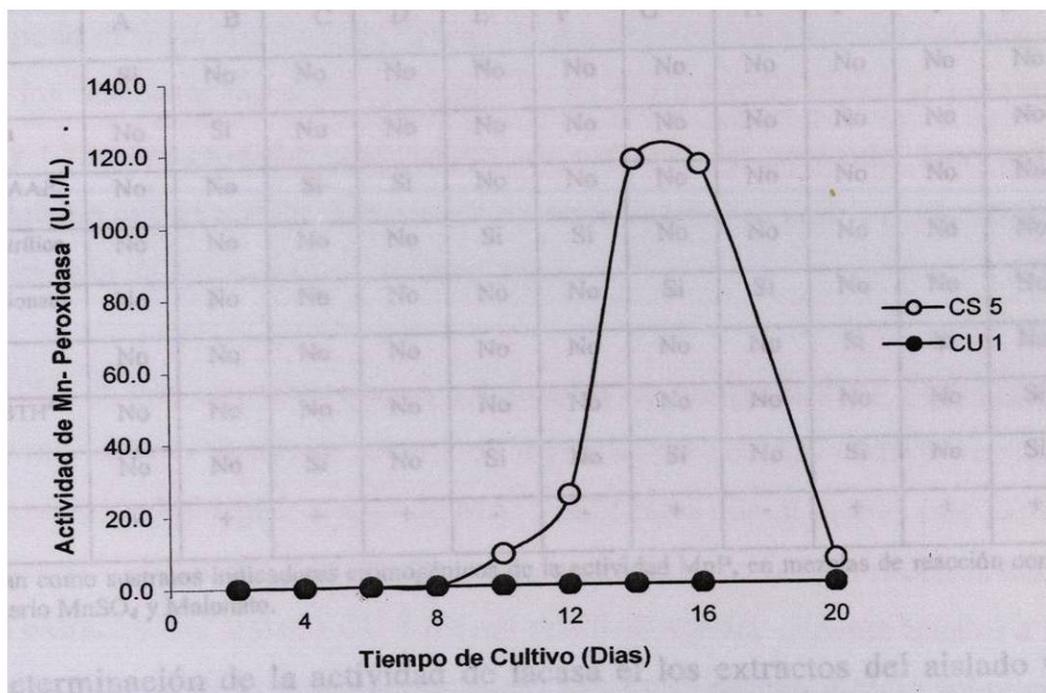


Figura 24. Producción de manganeso peroxidasa por los aislados nativos CS 5 y CU 1. Los cultivos se desarrollaron en medio Bran Flakes y la actividad de lacasa se ensayo usando ABTS como sustrato para los sobrenadantes de los cultivos obtenidos en los días indicados. Se muestran los datos de un experimento representativo (n = 3) por triplicado. La desviación estándar fue menor de 5%.

Caracterización parcial de las actividades lignolíticas y ensayos de decoloración con sobrenadantes de los cultivos

Para ensayar la capacidad de decoloración por extractos crudos libres de micelio, los aislados CS 5 y CU 1 se crecieron en medio Bran Flakes a 28°C con agitación de 150 r.p.m durante 10 días. Los sobrenadantes de los cultivos se obtuvieron por filtración a través de papel Whatman 1 y se congelaron hasta el momento de su uso. Preliminarmente, se realizaron ensayos de caracterización de la(s) actividad(es) lignolítica(s) presentes en los extractos crudos, utilizando los métodos mas comúnmente empleados en la bibliografía, de acuerdo con las condiciones descritas en la sección de materiales y métodos. Los diferentes sistemas de sustratos y cosustratos empleados y los resultados obtenidos en estos ensayos para los extractos del aislado CS 5 se resumen en cuadro I y se describen en el texto.

CUADRO I. Ensayos para la detección de las principales enzimas lignolíticas en los extractos del aislado CS 5

Ensayo	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
ABTS	Si	No										
Siringaldazina	No	Si	No									
2,4-DCP + 4-AAP	No	No	Si	Si	No							
Alcohol Veratrílico	No	No	No	No	Si	Si	No	No	No	No	No	No
MnSO ₄ + Malonato	No	No	No	No	No	No	Si	Si	No	No	No	No
2,6,-DMP*	No	Si	Si	No	No							
DMAB + MBTH ^{&}	No	Si	Si									
H ₂ O ₂	No	No	Si	No								
Reacción	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+

* & Se agregan como sustratos indicadores cromogénicos de la actividad MnP, en mezclas de reacción conteniendo el sustrato primario MnSO₄ y Malonato.

Para la determinación de la actividad de lacasa el los extractos del aislado CS 5, se emplearon inicialmente ABTS y Siringaldazina (como sustrato específico). Para el caso de la LiP los sustratos fueron 2,4-DCP + 4-AAP y el alcohol veratrílico (como sustrato específico). Para la actividad MnP se usaron, MnSO₄ + Malonato para los ensayos directos y en sistemas, que además de los compuestos anteriores, también contenían el sustrato cromogénico 2,6 -DMP o el par DMAB + MBTH.

Conforme con los resultados encontrados en los ensayos de producción, los extractos fueron positivos para los dos sustratos de lacasa (A y B). La reacción también fue positiva sobre el par 2,4-DCP + 4-AAP aún sin la presencia del H_2O_2 (C y D) sugiriendo que esta acción no se puede asociar con una peroxidasa. Otra posibilidad sería que la acción se deba a la presencia de peróxido de hidrógeno generado endógenamente a niveles adecuados para soportar esta actividad. Sin embargo, al utilizar el alcohol veratrílico, que es específico para la LiP, no fuimos capaces de detectar tal actividad aún en presencia de peróxido exógeno (E y F), descartando esta última posibilidad. Esto indicaría, una vez más que la actividad oxidante sobre el 2,4-DCP podría asociarse con la lacasa presente en los extractos. En el caso de los ensayos para la actividad de MnP, la reacción se encontró positiva sobre todos los sistemas ensayados (directo sobre Mn^{2+} , adicionado con 2,6 -DMP o adicionado con DMAB + MBTH como sustratos cromogénicos). Sin embargo, solo para en el caso del ensayo directo sobre el Mn^{2+} la reacción se pudo demostrarse específica, ya que fue negativa en ausencia del peróxido (G y H). Para los casos de los sistemas conteniendo 2,6-DMP (I y J) y el par DMAB + MBTH (K y L) la reacción fue positiva aun en ausencia del peróxido. Esto resultados también apuntan a que la actividad detectada en estos sistema se podría deber al menos en parte a la presencia de lacasa en las preparaciones.

En este sentido, en una serie de ensayos adicionales (no mostrados) se encontró que los extractos fueron capaces de actuar sobre 2,6-DMP y el par DMAB + MBTH en ausencia tanto de peróxido de hidrógeno como de Mn^{2+} , indicando que al menos una parte de la actividad detectada utilizando estos sustratos cromogénicos no se asocia con la MnP. Por su parte, los extractos del aislado CU 1 dieron resultados prácticamente iguales a los del CS 5, con la excepción de la actividad de MnP, que en el ensayo directo sobre el Mn^{2+} fue negativa. Estos resultados en conjunto indican que la actividad de lacasa detectada en nuestros aislados nativos muestra un amplio rango de acción que abarca inclusive algunos compuestos reportados como sustratos de peroxidases. Además, sugieren que la lacasa podría ser la principal actividad lignolítica asociada con la decoloración de los colorantes sintéticos

Las actividades lignolíticas detectadas en los extractos crudos, particularmente la lacasa, podrían residir en una o varias isoformas. Para indagar esta posibilidad se realizaron separaciones por electroforesis en geles de poliacrilamida. Con el fin de conocer la migración específica de los componentes y estimar el peso de la(s) enzima(s) lignolíticas, las separaciones se realizaron en condiciones nativas pero con presencia de SDS en el amortiguador de la muestra, que permitieran la detección “in situ” mediante el uso de los sustratos cromogénicos apropiados y su comparación contra estándares de peso molecular.

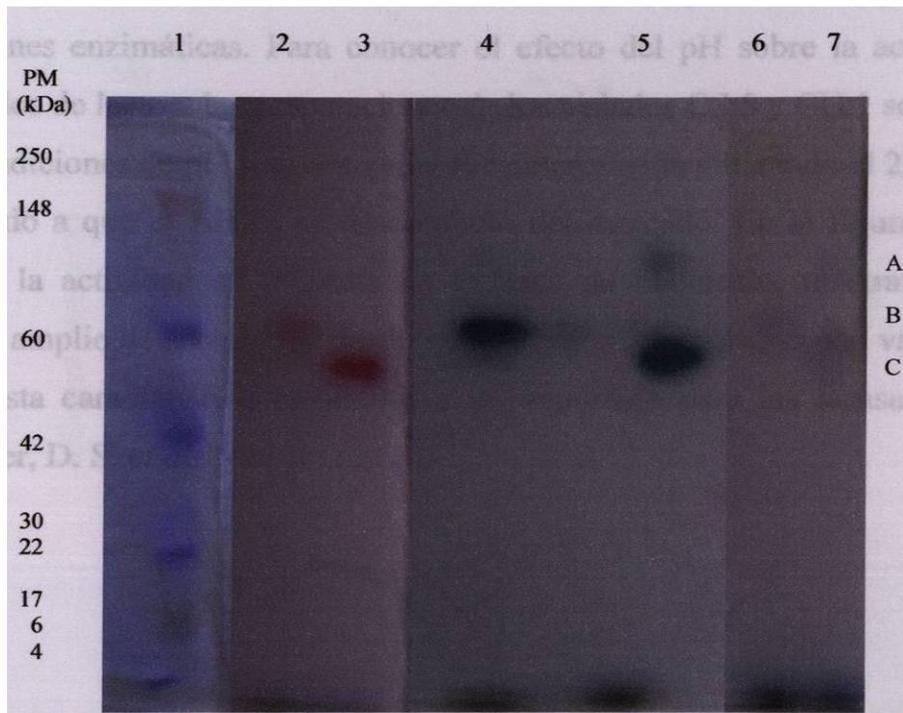


Figura 25. Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida de las enzimas lignolíticas. La separación se llevó a cabo en condiciones nativas en geles de poliacrilamida al 12%. Las muestras corresponden a: Estándares de peso molecular (1). Extractos de CS 5 (2) y CU 1 (3) revelados con 2,4-DCP en ausencia de peróxido de hidrógeno. Extracto de CS 5 (4) y CU 1 (5) revelados con ABTS y Extractos de CS 5 y CU 1 revelados con Siringaldazina.

En la figura 25 se presentan los perfiles de separación por electroforesis en gel de Poliacrilamida de los extracto de CS 5 y CU 1. Se puede ver que ambos extractos presentan al menos dos diferentes bandas de actividad sobre el ABTS (4 y 5) y la Siringaldazina (6 y 7), indicando la presencia de isoenzimas de lacasa en ambos extractos. Sin embargo, las fracciones que revelan la actividad principal para cada aislado corresponden a isoformas con diferentes tallas moleculares. En el caso del aislado CS 5 esta fracción (B) corresponde a una proteína de aproximadamente 60 kDa, mientras que

en CU1 la fracción principal (C) se encuentra alrededor de 55 kDa (C). Adicionalmente, en ambos caso se detectó una fracción (A) con una talla aproximada a 100 kDa ; que es más evidente en los extractos de CU 1. Las fracciones principales de lacasa en cada aislado también mostraron la capacidad de oxidar el 2,4-DCP en ausencia del peróxido de hidrógeno (2 y 3), confirmando que los dos aislados nativos seleccionados son capaces de oxidar sustratos típicos de peroxidasa sin la participación de mediadores.

El pH y la temperatura representan dos de los principales parámetros operativos de las transformaciones enzimáticas. Para conocer el efecto del pH sobre la actividad de los extractos crudos de lacasa, las preparaciones de los aislados CS 5 y CU 1 se incubaron en diferentes condiciones de pH y su actividad fue determinada utilizando el 2,6-DMP como sustrato, debido a que el ABTS se discontinuó del mercado. En la figura 26 se puede observar que la actividad se presenta en la zona de pH ácido, mostrando un rango relativamente amplio de acción que desde valores bajos 2.5 hasta 5.5 con valores óptimos entre 3-4. Esta característica es similar a la reportada para las lacasas fúngicas en general (Yaver, D. S. *et al* 1996).

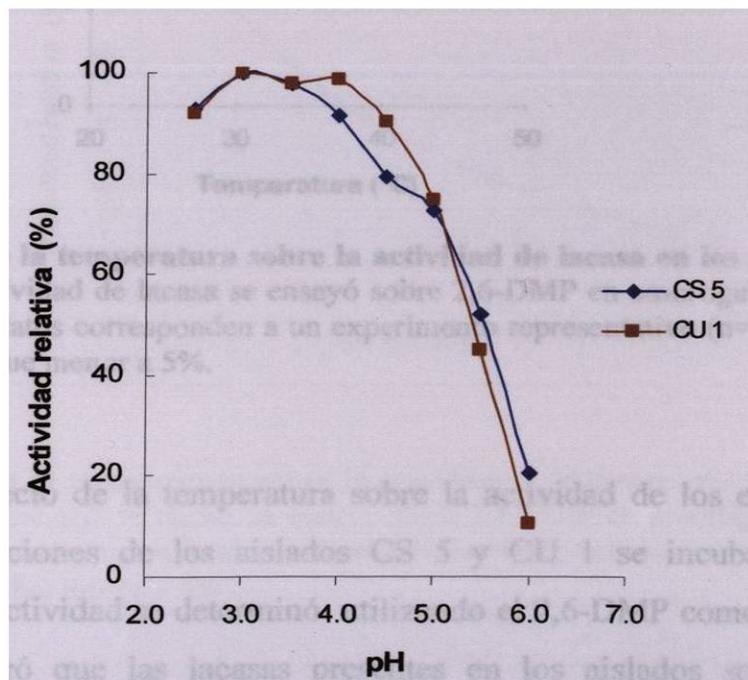


Figura 26. Efecto del pH sobre la actividad de lacasa en los extractos crudos de CS 5 y CU 1 La actividad de lacasa se ensayó sobre 2,6-DMP en amortiguador de acetatos 200 mM ajustado al valor de pH mostrado. Los datos corresponden a un experimento representativo (n=2) por duplicado. La desviación estándar fue menor a 5%.

En la figura 27 se presenta el efecto de la temperatura sobre la actividad de lacasa en los extractos crudos de los aislados CS 5 y CU 1. Se puede ver que la actividad se incrementó gradualmente, alcanzando un pico alrededor de la zona de 45°C a partir de la cual se inicia la disminución. Sin embargo, estos ensayos se limitaron hasta los 50°C debido a interferencias asociadas con la inestabilidad térmica del 2,6-Dimetoxifenol utilizado como sustrato, por lo que se recurrió a un diferente abordaje experimental para caracterizar la zona de temperatura superior a los 50°C.

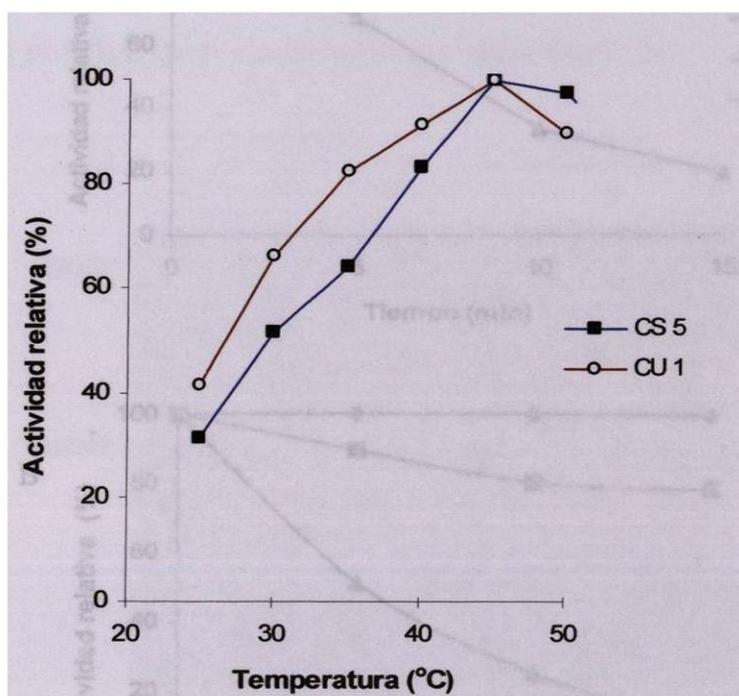


Figura 27 Efecto de la temperatura sobre la actividad de lacasa en los extractos crudos de CS 5 y CU1. La actividad de lacasa se ensayó sobre 2,6-DMP en amortiguador de acetatos 200 mM de pH 4.5 Los datos corresponden a un experimento representativo (n=3) por duplicado. La desviación estándar fue menor a 5%.

Para conocer el efecto de la temperatura sobre la actividad de los extractos crudos de lacasa, las preparaciones de los aislados CS 5 y CU 1 se incubaron en diferentes temperaturas y su actividad se determinó utilizando el 2,6-DMP como sustrato. En estos ensayos se encontró que las lacasas presentes en los aislados son moderadamente termoresistente ya que conservaron más de 80 % de su actividad después de 1 h a 55 °C, pero se inactivaron por completo después de incubarse durante 5 min a 85 °C. En el comparativo que se muestra en la figura 28 se puede ver que la actividad de lacasa

presente en los extractos del aislado CS 5 (A) fue relativamente mas termoresistente que la de CU 1 (B). Después del tratamiento durante 15min. a 65 °C , los valores de actividad remanente fueron 95 % para CS 5 y 80 % en CU 1. Mientras que a 75 °C estos valores fueron de 20 % para CS 5 y 9% para la CU1.

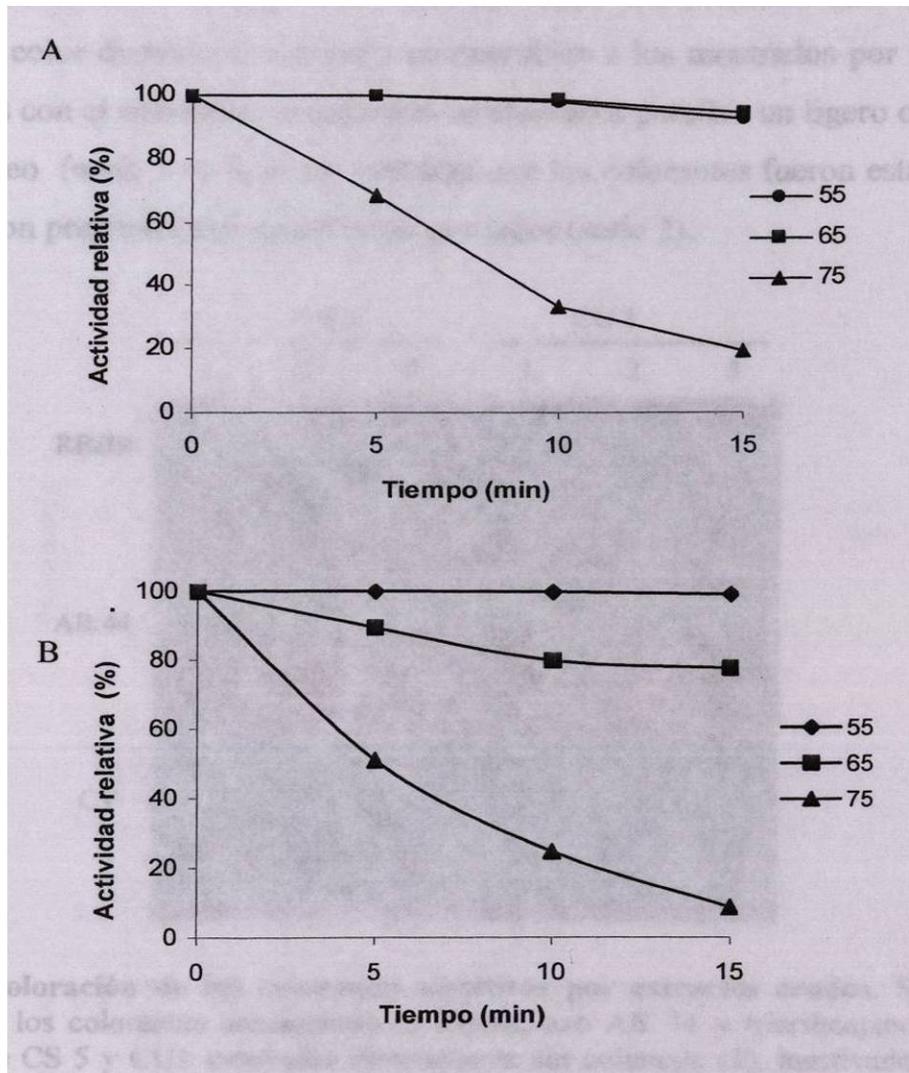


Figura 28 Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de lacasa en los extractos crudos de CS 5 y CU1. La actividad de lacasa se ensayó sobre 2,6-DMP en amortiguador de acetatos 200 mM de pH 4.5 Los datos corresponden a un experimento representativo (n=3) por duplicado. La desviación estándar fue menor a 5%.

Una vez conociendo el tipo de actividades y sus parámetros de operación, los extractos crudos de los aislados CS 5 y CU 1 conteniendo 820 y 2000 U.I de lacasa/L respectivamente, se incubaron directamente a 25 °C en presencia de los colorantes

RBBR, AR 44 y CV a concentración final de 0.02%, utilizando como controles preparaciones incubadas sin colorantes y preparaciones inactivadas por calor (tratamiento en baño maría durante 1 h). En la Figura 29 se puede observar que los colorantes RBBR y AR 44 fueron eficientemente decolorados por ambos extractos, mientras que el CV solo se decoloró parcialmente (serie 3 vs serie 2). Para los primeros dos colorantes la intensidad del color disminuyó a niveles comparables a los mostrados por los controles no adicionados con el colorante, aunque aún se alcanzó a percibir un ligero color residual con tono rosáceo (serie 3 vs serie 1), mientras que los colorantes fueron estables cuando se incubaron con preparaciones inactivadas por calor (serie 2).

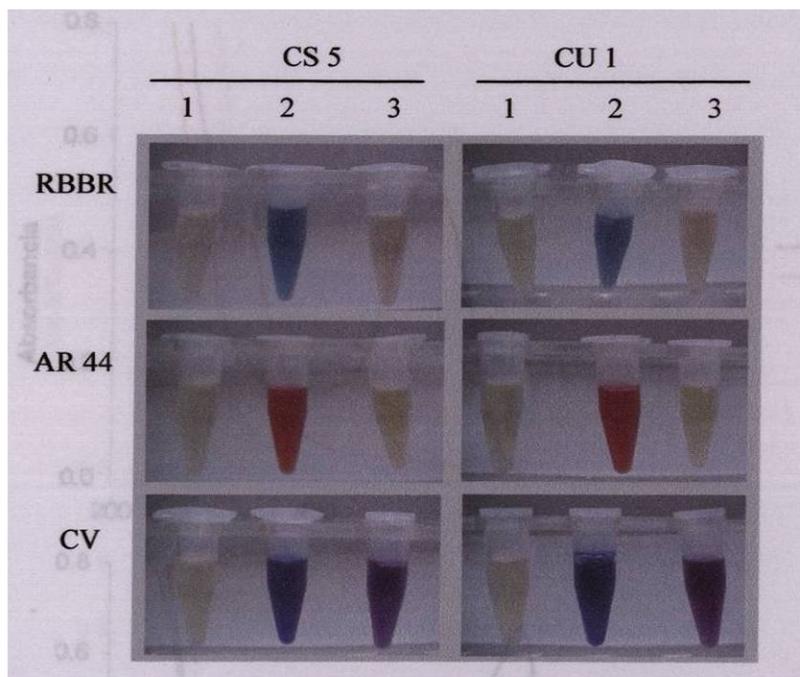


Figura 29. Decoloración de los colorantes sintéticos por extractos crudos. Se muestra la decoloración de los colorantes antraquinónico RBBR, azo AR 44 y triarilmetano CV por las preparaciones de CS 5 y CU1 incubadas directamente sin colorante (1), inactivados por calor e incubadas con el colorante (2) y incubados en presencia del colorante (3). Las condiciones de crecimiento y preparación de los extractos se explican en el texto.

La caracterización cualitativa y cuantitativa de la decoloración de los colorantes sintéticos por los extractos enzimáticos de los aislados CS 5 y CU 1 se llevó a cabo mediante ensayos de espectros de absorción. En las figuras 30 y 31 se puede observar que los espectros de absorción presentaron modificaciones que son muy parecidas a las encontradas durante la decoloración por los cultivos líquidos con micelio activo (figuras 19 y 20).

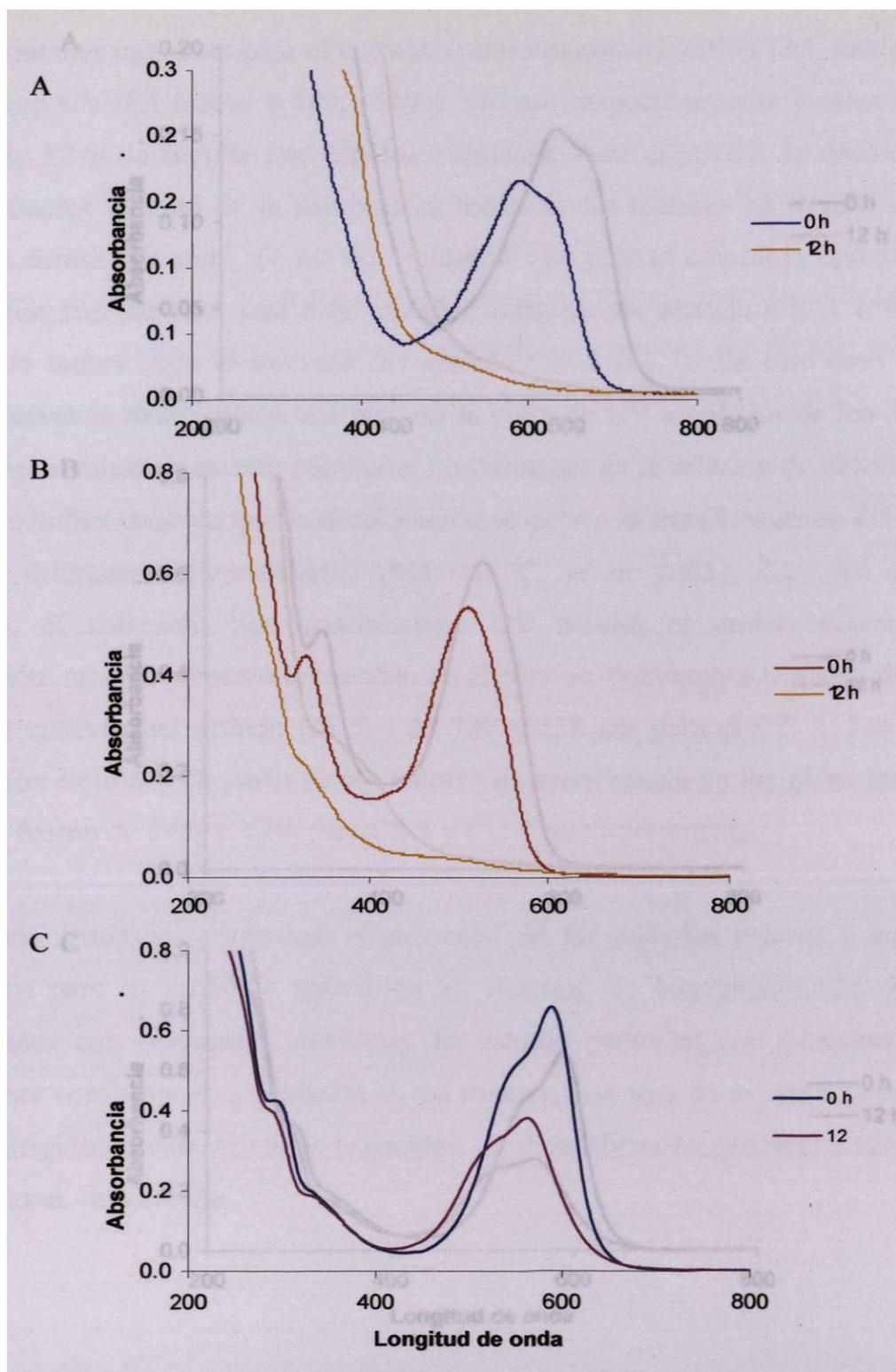


Figura 30. Espectros de absorción de los colorantes sintéticos durante la decoloración por extractos crudos del aislado nativo CS 5. Las condiciones utilizadas en la obtención de los extractos corresponden a las descritas en el texto. Se muestran los espectros de absorción para los extractos crudos del aislados CS 5 incubados en presencia de RBBR (A), AR 44(B) y CV (C), al inicio (0 h) y después de la incubación (12 h).

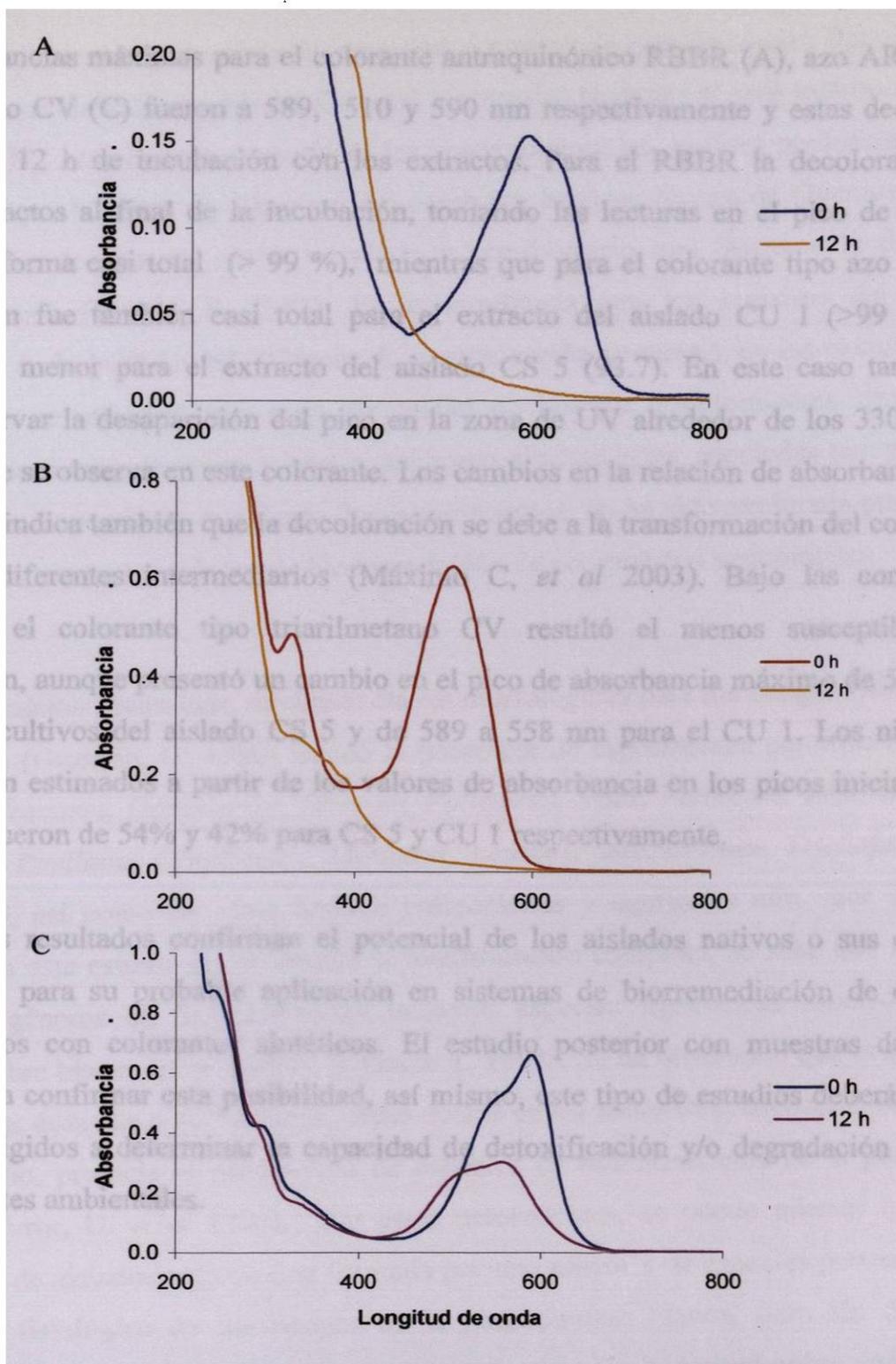


Figura 31. Espectros de absorción de los colorantes sintéticos durante la decoloración por extractos crudos del aislado nativo CU 1. Las condiciones utilizadas en la obtención de los extractos corresponden a las descritas en el texto. Se muestran los espectros de absorción para los extractos crudos del aislados CU 1 incubados en presencia de RBBR (A), AR 44(B) y CV (C), al inicio (0 h) y después de la incubación (12 h).

Las absorbancias máximas para el colorante antraquinónico RBBR (A), azo AR44 (B) y triarilmetano CV (C) fueron a 589, 510 y 590 nm respectivamente y estas decrecieron después de 12 h de incubación con los extractos. Para el RBBR la decoloración por ambos extractos al final de la incubación, tomando las lecturas en el pico de 589 nm, ocurrió en forma casi total (> 99 %), mientras que para el colorante tipo azo AR44 la decoloración fue también casi total para el extracto del aislado CU 1 (>99 %) pero ligeramente menor para el extracto del aislado CS 5 (93.7). En este caso también se puede observar la desaparición del pico en la zona de UV alrededor de los 330 nm que inicialmente se observa en este colorante. Los cambios en la relación de absorbancias 510 vs. 328 nm indica también que la decoloración se debe a la transformación del colorante a través de diferentes intermediarios (Máximo C, *et al* 2003). Bajo las condiciones ensayadas, el colorante tipo triarilmetano CV resultó el menos susceptible a la decoloración, aunque presentó un cambio en el pico de absorbancia máximo de 589 a 563 nm en los cultivos del aislado CS 5 y de 589 a 558 nm para el CU 1. Los niveles de decoloración estimados a partir de los valores de absorbancia en los picos inicial y final anteriores fueron de 54% y 42% para CS 5 y CU 1 respectivamente.

Todos estos resultados confirman el potencial de los aislados nativos o sus extractos enzimáticos para su probable aplicación en sistemas de biorremediación de efluentes contaminados con colorantes sintéticos. El estudio posterior con muestras de campo servirá para confirmar esta posibilidad, así mismo, este tipo de estudios deberán incluir ensayos dirigidos a determinar la capacidad de detoxificación y/o degradación de estos contaminantes ambientales.

Discusión.

En este trabajo se creó una colección de aislados nativos de basidiomicetos lignolíticos de algunos parajes de la Sierra Madre Oriental y serranías aledañas al área metropolitana de Monterrey, N.L. En la gran mayoría de las zonas exploradas, la flora predominante esta conformada por bosques de *Quercus*, así como por bosques mixtos de *Quercus* y *Pinus*, en los cuales destaca un clima templado y semihúmedo que favorece la diversidad fúngica (Garza Ocañas, F. 1983). En concordancia con los registros del herbario micológico de la FCB-UANL (Gómez A. comunicación personal), en las excursiones de prospección se encontró una gran diversidad de hongos basidiomicetos con cuerpos fructíferos en forma de repisa o costra, así como algunas setas, asociadas con materiales vegetales en decaimiento que, hasta donde conocemos, no ha sido explorada previamente con respecto a sus capacidades de biodegradación de compuestos xenobióticos.

La identificación preliminar, mediante claves morfológicas para los hongos más comunes de México (Guzmán, G. 1980) indicó la presencia de especímenes pertenecientes a los géneros: *Trametes*, *Ganoderma*, *Stereum*, *Polyporus*, *Irpex*, *Pleurotus*, *Lentinus*, *Fomes*, *Daedalea*, *Phellinus*, *Creptidotus*, *Meriullus*, *Lenzites*, *Steccherinum*, *Trichaptum*, *Poria* y *Cerrena*, así como de otros hongos poliporáceos y agaricales aún por identificar. Aunque en este estudio no se intentó la identificación completa, se sabe que la mayoría de estos géneros de basidiomicetos incluyen especies lignolíticas asociadas con la podredumbre blanca de la madera (Laessoe T. 1998). Se ha observado que la abundancia de maderas duras de angiospermas, como ocurre en las zonas de prospección incluidas en este estudio, propicia el predominio de especies de basidiomicetos de la podredumbre blanca (Turor, U. *et al* 1995). Por estos antecedentes, se puede afirmar que nuestra colección de aislados nativos esta formada por una mayoría de especies pertenecientes al grupo ecofisiológico de los hongos de la podredumbre blanca, pero sin descartar la presencia de algunas que podrían pertenecer al grupo de la podredumbre café. En este sentido, se conoce que algunos de estos géneros en particular aquellos que se desarrollan sobre coníferas (gimnospermas) (Turor, U. *et al* 1995) incluyen especies asociadas con la podredumbre café. Así, en estudios posteriores será necesario profundizar en la identificación taxonómica de los aislados.

Una mención especial lo merece el hecho de que para algunos poliporáceos colectados no nos fue posible su identificación, incluso a nivel de género. Por lo que cabe la posibilidad de que algunos de estos hongos aún no se encuentren en los inventarios. En un estudio de distribución de macromicetos en la parte sur de la Sierra Madre Oriental (Cifuentes-Blanco, *et al* 2004) que abarcó 113 Municipios de los Estados de Hidalgo, Querétaro, Puebla y Veracruz, los autores dan una relación de 220 especies de macromicetos que corresponden a 10 ordenes, 15 familias y 70 géneros. Donde el grupo más numeroso es el de los poliporoides con 130 especies, seguido por los agaricoides con 63 especies, los hidnoides con 20 especies y gasteroides con 7. Del género *Amaita* se determinaron 46 especies, seguido por *Psylocybe*, *Phellinus* y *Trametes* con 10 cada uno. En cuanto a la forma de vida, el 59% corresponde a especies saprótrofas, 39% biótropas y 2% necrótrofas. Mencionan además que de acuerdo a estimaciones de Guzmán, G. en México existen alrededor de 120,000 a 200,000 especies de hongos y líquenes, de las cuales apenas se conoce un 3.5 %.

El aislamiento y purificación del micelio vegetativo a partir de los carpóforos no representó un gran problema para la mayoría de los especímenes colectados, a excepción de aquellos de lento crecimiento, que fueron los más susceptibles a contaminación. La causa más común de contaminación fue el deuteromiceto *Trichoderma*, el cual es un hongo celulósico común en el mantillo del suelo que además tiene la capacidad de parasitar a otros hongos (Deacon, J. W. 1989); otros contaminantes menos frecuentes fueron algunas bacterias y levaduras. No obstante, la combinación de tratamientos de desinfección por diferentes tiempos de exposición a peróxido o hipoclorito y pasos de resiembra múltiple en medios de bajo pH, adicionados con benomyl nos permitieron en la mayoría de los casos un aislamiento exitoso, de forma tal que al final de esta fase se logró tener una colección con 91 aislados nativos de basidiomicetos. El benomyl es un fungicida semiselectivo al cual muchos basidiomicetos presentan un cierto grado de tolerancia, mientras que la mayoría de los ascomicetos son sensibles (Bollen, G. J. y Fuchs, A. 1970), por lo que se ha usado en otros estudios de aislamiento selectivo de basidiomicetos de madera en descomposición (Hale, M.D.C. y Savory, J.G. 1976, Worrall, J.J. 1991). Por otra parte, debido a la falta de esporas asexuales y otras

características morfológicas específicas en el micelio vegetativo de los hongos, los aislados fueron confirmados como basidiomicetos por la presencia de fibulas en los septos. Estas estructuras se consideran específicas de los basidiomicetos y su presencia se ha usado en otros estudios como criterio del aislamiento de basidiomicetos a partir de muestras de suelo (Thorn, R.G., *et al* 1996).

Se diseñó un sistema de selección combinado, conformado por placas de Bran-Flakes adicionadas con el colorante polimérico Poly R-478, los sustratos cromogénicos guayacol y o-anisidina y los colorantes sintéticos RBBR (antraquinónico), AR44 (azo) y CV (triarilmetano), que nos permitió evaluar al mismo tiempo el potencial lignolítico y la capacidad decolorante de los aislados. Alrededor de tres cuartas partes de los aislados mostraron la capacidad de oxidar el guayacol y o-anisidina, sugiriendo la presencia de una alta proporción de aislados con capacidad lignolítica. La ausencia de reacción en el resto de los aislados se podría deber a que éstos no tienen la capacidad de producir oxidasas y/o peroxidasas lignolíticas o bien, que su expresión requiere de diferentes condiciones. Los medios de cultivo basados en el uso de cereales comerciales, como el utilizado en el presente estudio, se ha reportado como excelentes inductores de las enzimas lignolíticas en cepas de *Coriolopsis gallica*, *Bjerkandera adusta*, *Trametes versicolor* y *Pleurotus ostreatus* (Pickard, M.A. *et al* 1999). Sin embargo, en un estudio de la producción de enzimas lignolíticas en hongos de la pudrición blanca se concluye que la producción de ligninasas es altamente dependiente de las condiciones del cultivo y/o de la cepa usada (Nerud, F. y Misurcova, Z. 1996).

Todos los aislados que mostraron la capacidad de degradar el Poly R-478 también fueron positivos para la producción de oxidasas y peroxidasas lignolíticas, pero no todos los aislados positivos para la producción de estas actividades lignolíticas fueron capaces de degradar el colorante polimérico. Por lo que las pruebas para detectar la presencia de oxidasas y/o peroxidasas lignolíticas no son por si solas suficientes para asegurar la capacidad lignolítica de los hongos, aunque si pueden ser útiles para descartar aquéllos que carecen de esta capacidad. Una posible explicación a este hecho sería que la

degradación del Poly R-478 tenga un requerimiento adicional por mediadores de bajo peso molecular y/o de los sistemas generadores de peróxido de hidrógeno, los cuáles bajo las condiciones utilizadas se estarían expresando únicamente en los aislados positivos. (Rabinovich, M.L. *et al* 2003). Por lo contrario, se ha reportado algunos hongos de la podredumbre café que pueden producir la decoloración de colorantes poliméricos sin la participación aparente de peroxidasas específicas (Freitag, M. Y Morell, J. 1992). Estos resultados indicarían la presencia de mecanismos diferentes de despolimerización de lignina en estos organismos. Por lo tanto, se puede concluir que en la selección de hongos de la podredumbre blanca, con respecto a sus habilidades lignolíticas, los ensayos de decoloración del Poly R-478 se deben combinar con los de producción de oxidasas y/o peroxidasas lignolíticas.

Con relación a la capacidad decolorante, se encontró que los colorantes antraquinónico (RBBR) y azo (AR 44) resultaron los más susceptibles, mientras que el triarilmetano (CV) resultó el más difícil. Además, este último tuvo un efecto negativo sobre el crecimiento en la mayoría de los casos. En contraste con otros estudios, como el realizado por Jarosz-Wilkoloska y colaboradores (2002), donde se encontró que el colorante azo (Acid Red 183) fue mucho más resistente a la decolorización que el colorante antraquinónico (Basic Blue 22), en nuestro trabajo se encontró que los colorantes azo (AR 44) y antraquinónico (RBBR) mostraron prácticamente la misma sensibilidad. Las diferencias entre estos resultados podrían deberse a las diferencias en la estructura de los colorantes utilizados. En nuestro caso, al igual que en el referido trabajo del grupo de Jarosz-Wilkoloska, la elección específica de los colorantes azo y antraquinónico utilizados, se debió a que estos representan dos colorantes textiles recalcitrantes a biodegradación que son difíciles de remover de los efluentes. Por su parte, el CV también se seleccionó específicamente por su alta recalcitrancia a biodegradación y conociendo que en general los colorantes del grupo de triarilmetano se usan intensivamente como colorantes textiles y resultan difíciles de remover de las aguas de desecho contaminadas, contribuyendo así al deterioro ambiental. (Bumplus, J.A. y Brock, B.J. 1991).

Todos los aislados que decoloraron eficientemente los colorantes ensayados, también fueron positivos en las pruebas de guayacol y o-anisidina. Asimismo, todos los aislados que mostraron la capacidad para atacar rápida y eficientemente el Poly R-478 y el CV también fueron capaces de decolorar rápidamente los colorantes restantes. Por lo que se propone que la decoloración temprana del Poly R 478 puede ser de utilidad predictiva de un alto potencial decolorante en los nuevos aislados. Además, su uso en forma combinada con el CV, podría resultar en el diseño de un sistema simple de selección de cepas de alta capacidad de decoloración con tolerancia a los efectos tóxicos de estos compuestos. Esta propuesta deberá ser evaluada en estudios posteriores que incorporen una gama más amplia de colorantes sintéticos de los diferentes grupos.

Entre los 91 aislados probados, nosotros encontramos hongos que tienen mejor potencial para la decoloración que las cepas de referencia *P. chrysosporium* ATCC 24725, *B. adusta* UAMH 8258 y *P. ostreatus* ATCC 58053; confirmando las características de las zonas de colecta del presente trabajo como adecuadas para la prospección por hongos con alto potencial de biodegradación de compuestos xenobióticos. Dentro del grupo de hongos que compararon favorablemente con las cepas de colección, se destacaron los aislados CS5 y CU1, ya que además de comportarse muy eficientemente en la decoloración, también mostraron altas velocidades de crecimiento en medio sólido y no producen pigmentación al desarrollarse como micelio vegetativo. Por lo que estos dos hongos resultaron los seleccionados para la siguiente fase del trabajo. Coincidente con nuestros resultados, a nivel mundial se destaca un estudio realizado en Zimbabwe (Tekere *et al.* 2001) donde la prospección por hongos de la podredumbre blanca de la madera en bosques de maderas duras, llevó al aislamiento y selección de algunas cepas nativas con alta capacidad de degradación de colorantes poliméricos y triarilmetano.

La capacidad de decoloración de los aislados seleccionados se confirmó en medios líquidos, tanto para los ensayos donde los colorantes se agregaron desde el inicio del cultivo, así como cuando el colorante se agregó al octavo día. El análisis de los espectros

de absorción de los colorantes durante la decoloración, y la observación visual de micelio del hongo al final del proceso, indicaron que la decoloración se debe a la transformación del compuesto y no a la absorción del colorante a la biomasa. Este último efecto se ha observado en *P. Chrysosporium* y *A. niger* (Gold, M. H., Glenn, J. K., y Alic M. 1988, Sumathi, S., y Manju, B.S. 2000). Aunque se ha sugerido que la absorción o captación se puede usar para el tratamiento de las descargas de plantas textiles, esto no parece ser una solución, ya que el problema del color residual no transformado permanece y además se agrava por la presencia de biomasa. El cambio complejo en los espectros de absorción sugiere que la decoloración no es una reacción de un solo paso, sino más bien un proceso donde más de una enzima puede estar involucrada. En todo caso, la decoloración parece ser una consecuencia de la transformación de la estructura molecular del cromóforo del colorante. Sin embargo, un análisis de los productos de ruptura será necesario para demostrar la biodegradación de la molécula.

En muchos trabajos se ha descrito que las enzimas lignolíticas (lacasa, LiP y MnP) pueden atacar extracelularmente un rango amplio de colorantes que incluye, entre otros, compuestos antraquinónicos, azo y triarilmetano (Ollika, P. *et al* 1993, Heifling, A., *et al* 1998, Rodríguez, E. *et al*. 1999, Abadulla, E., *et al* 2000, , McMullan, *et al* 2001, Robinson, T. *et al* 2001, Hatvani y Mécs , 2001, Tekere, M. *et al* 2001). En nuestros ensayos de curvas de producción se encontró que los dos aislados seleccionados (CS 5 y CU 1) son buenos productores de lacasa bajo las condiciones utilizadas. Adicionalmente, el aislado CS 5 también mostró la capacidad de producir MnP, sin embargo en ningún caso se pudo detectar la actividad de LiP. La presencia de las actividades de lacasa y MnP concuerda con los hallazgos de otros trabajos donde se concluye que la combinación lacasa-MnP es el grupo más común de ligninasas en los hongos de la podredumbre blanca (Nerud, F. y Misurkova, Z. 1966, Peláez F. *et al* 1995). Además, se ha propuesto que la actividad de MnP y/o lacasa puede ser suficiente para la degradación de lignina (Nerud, F. y Misurkova, Z. 1966). Esto último parece ocurrir en *Pycnoporus cinnabarinus* donde la lacasa es la única oxidasa extracelular que se ha asociado con su actividad lignolítica (Rabinovich, M.L. *et al* 2003).

En este sentido, la actividad decolorante de nuestros aislados se pudo relacionar exclusivamente con la actividad de lacasa ya que; a) para ambos hongos la decoloración en cultivos completos coincidió en el tiempo con la presencia de títulos altos de esta actividad b) en el caso de CU 1 la lacasa es la única actividad detectada, c) en el caso de CS 5 la actividad de Mn peroxidasa se incrementó sólo hasta tiempos posteriores a la decoloración, d) los extractos crudos libres de micelio de los aislados CS 5 y CU1 conteniendo 820 y 2000 U.I./L de lacasa respectivamente, fueron capaces de decolorar completamente al RBBR y AR44 y 50 % al CV dentro de un periodo de 12 h. y e) los espectros de absorción durante la decoloración bajo estas condiciones fueron similares a los encontrados en cultivos completos. La participación exclusiva y eficiente de las lacasas producidas por nuestros hongos nativos en el proceso de biodegradación de los colorantes sintéticos deberá confirmarse en un estudio posterior con preparaciones puras de las enzimas. Finalmente, la caracterización parcial de las actividades de lacasa presentes en las preparaciones de los aislados nativos sugieren la presencia de isoenzimas con tallas moleculares, pH óptimos y termoestabilidad similares a las encontradas en la mayoría de los basidiomicetos de la pudrición blanca (Thurston, C.F. 1994). Sin embargo, estas lacasas parecen tener un rango de sustratos más amplio que el común de lacasas fúngicas reportadas. Esta propiedad podría resultar de gran interés con relación a los mecanismos de acción y aplicabilidad en procesos biotecnológicos y también merece ser el tema para estudios posteriores.

Conclusiones.

1. Se logró la creación de un cepario que actualmente cuenta con 91 cepas nativas de basidiomicetos de la pudrición blanca, aislados de diferentes zonas de la Sierra Madre Oriental y serranías cercanas a la Ciudad de Monterrey Nuevo León.
2. Se desarrolló un sistema eficiente en medio sólido para la selección de cepas con el potencial para la degradación de colorantes sintéticos.
3. La selección de aislados con alta capacidad de degradar colorantes sintéticos se puede predecir en un sistema de selección simple, basado en la decoloración de Poly R-478 y Cristal Violeta.
4. Se logró la selección de basidiomicetos nativos (CS 5 y CU 1) que comparan favorablemente en la capacidad de decoloración con algunas de las principales cepas de referencia internacional. Los cuales mostraron capacidad de atacar colorantes sintéticos de los tres grupos principales en cultivos líquidos.
5. Los extractos crudos de lacasa de los hongos seleccionados también mostraron la capacidad de decoloración sobre los colorantes ensayados.
6. Las lacasas producidas por los aislados nativos, presentaron propiedades de talla molecular, pH óptimo y termoestabilidad (en extractos crudos) semejantes a las lacasas de otros basidiomicetos.
7. En extractos crudos, las lacasas producidas por los aislados nativos, presentaron un rango de sustratos más alto que el común de las lacasas.
8. La zona de la Sierra Madre Oriental y serranías circundantes a Monterrey, N.L. incluye sitios que son excelentes para la prospección de basidiomicetos de podredumbre blanca con alto potencial de aplicación en procesos de biorremediación de compuestos xenobióticos.

Bibliografía

1. Abadulla, Elias, Tzanko, T.; Costa, S., Robra, K., Cavaco-Paulo, A., and Gübitz. 2000. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *App. and Environ. Microbiol.* 66:3357-3362.
2. Bollen, G. J., Fuchs, A. 1970. On the specificity of the in vitro and in vivo antifungal activity of benomyl. *Neth. J. Plant Pathol.* 76:299-312.
3. Borokhov, O., and Rothenburger, S. 2000. Rapid dye decolorization method for screening potential wood preservatives. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(12):5457-5459.
4. Bourbonais, R. and Paice, M. G. 1990. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett.* 267:99-102.
5. Bumplus, J.A. and Brock, B.J. 1988. Biodegradation of crystal violet by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1143-1149.
6. Buswell, J.A. and E. Odier. 1987. Lignin biodegradation In *CRC Critical reviews in biotechnology.* 6(1):1-60.
7. Cifuentes J., Villegas, 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: *Biodiversidad de la Sierra Madre Oriental.* Luna, I., J.J. Morrone y D. Espinoza (eds.). Las Prensas de Ciencia, México, D.F. pp.355-374).
8. Deacon, J. W. 1989. *Introducción a la Micología Moderna.* 1ª edición. Editorial Limosa. Pp. 39.
9. Dedeyan, B., A. Klonowska, S. Tagger, T. Tron, G. Iacazio, G. Gil and J. Le Petit. 2000. Biochemical and molecular characterization of a Laccase from *Marasmius quercophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(3): 925-929.
10. Faison, B.D. and Kirk, T.K. 1985. Factors involved in the regulation of a ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:299-304.
11. Field, J. A., Jong, E., Feijoo Costal, G., Bont, J. A. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. *Appl. Environ. Microb.* 58:7:2219-2226.
12. Freitag, M, and Morell, J. Decolourization of polymeric dye Poly R-478 by wood-inhabiting fungi 1992. *Can. J. Microbiol.* 38: 811-822.

13. Garfin, D. E. 1990. *Methods in Enzymology*. Academic Press Inc. 182:425-441.
14. Garza Ocañas, F. 1983. La flora micológica (macromicetes) asociada al bosque de *Quercus rysophylla* Weatherby, en algunas localidades de la Sierra Madre Oriental en el estado de N. L. Tesis. UANL-FCB. Pp2
15. Glenn, J.K. and Gold, M.H. 1985. Purification and characterization of an extracellular Mn (II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 242:329-341.
16. Gold, M. H., and Glenn, J. K. 1985. Manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods Enzymol.* 161:258 -264.
17. Gold, M. H., Glenn, J. K., and Alic M. 1988. Use of polymeric dyes in lignin degradation assays. *Methods Enzymol.* 161:74-78.
18. Guzmán, G. 1980. Identificación de los Hongos: comestibles, venenosos, alucinantes y destructores de la madera. Editorial Limusa S.A. México
19. Hale, M.D.C., and Savory, J.G. 1976. Selective agar-media for the isolation of basidiomycetes from wood- A review. *Int. Biodeterior. Bull.* 12:112-115.
20. Hao, O. J., Kim, H., and Chiang, P.C. 2000. Decolorization of wastewater. *Critical Reviews in Environ. Sci. and Technol.* 30:449-505.
21. Hatvani, N. and Mécs, I. 2002 Effect of the nutrient composition on dye decolorisation and extracellular enzyme production by *Lentinus edodes* on solid medium. *Enzyme and Microb. Technol.* Vol. 30:381-386.
22. Heinfling, A., Martínez, M. J., Martínez, A. T., Bergbauer, M. and Szewzyk, U. 1998. Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a Manganese-independent reaction. *Appl. Environ. Microb.* 64:2788-2793.
23. Higson, F. K. 1991. Degradation of xenobiotics by white rot fungi. *Environmental Contamination and Toxicology.* 122:111-152.
24. Hofrichter, M. 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microb. Technol.* 30: 454-466.
25. Jarosz-Wilkolazka, A, Kochmsnska-Rdest, J., Malarczyk, E., Wardas, W., Leonowicz, A. 2002. Fungi and their ability to decolourize azo and anthraquinonic dyes. *Enzyme and Microb. Technol.* 30: 566-572.

26. Koroleva, O.V., Gavrilova, V.P., Stepanova, E.V., Lebedeva, V.I., Sverdlova, N.I., Landesman, E.O., Yavmetdinov, I.S., Yaropolov, A.I., 2002. Production of lignin modifying enzymes by co-cultivated white rot fungi *Cerrena maxima* and *Coriolus hirsutus* and characterization of laccase from *Cerrena maxima*. *Enzyme Microb. Technol.* 30:573-580
27. Laessle T. 1998. *Hongos: Manuales de Identificación*: Ediciones Omega, S.A. Barcelona.
28. Marzullo, L., Cannio, R., Giardina, P., Santini, M. T., San, G. 1995. Veratryl Alcohol Oxidase from *Pleurotus ostreatus* participates in lignin biodegradation and prevents polymerization of laccase-oxidized substrates. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.* 270:3823-3827.
29. Maximo, C., Pesa, M.T., and Costa-Ferreira, M. 2003. Biotransformation of industrial reactive azo dyes by *Geotrichum* sp CCM1 1019. *Enzyme and Microb. Technol.* 32:145-151.
30. McMullan, G., Meehan, C., Conneely, A., Kirby, N., Robinson, T., Nigam, P., Banat, I.M., Marchant, R. y Smyth, W.F. 2001. Microbial decolorisation and degradation of textile dyes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56:81-87.
31. Nerud, F. and Misurcova Z. 1996. Distribution of ligninolytic enzymes in white rot fungi. *Folia Microbiol.* 41:264-266.
32. Ollika, P., Alhonmaki, K., Leppanen, V-M, Glumoff, T. Rajjola, T. Suominen I. 1993. Decolourization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 4010-4016.
33. Palmieri, G. P. Giardina, C. Bianco, A. Scaloni, A. Capasso and G. Sannia. 1997. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *J. Biol. Chem.* 272:31301-31307.
34. Pelaez, F., Martinez, M.J. Martinez, A.T. 1995. Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. *Mycol. Res.* 99: 37-42.
35. Pereira-Chagas, E. and Durrant, L. R. 2001. Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju*. *Enzyme and Microb. Technol.* 29: 473-477.
36. Pickard, M. A., Vandertol, H., Roman, R., and Vazquez-Duhalt, R. 1999. High production of ligninolytic enzymes from white rot fungi in cereal bran liquid medium. *Can. J. Microbiol.* 45: 627-631.

37. Rabinovich, M.L. Bolota, A.V. and Vasil'chenko, L.G. 2003. Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: A review. *Appl. Biochem and Microbiol.* 40: 1-17.
38. Rao, S. K., and Tien, M. 1995. Oxidation of guaiacol by lignin peroxidase. *J. Biol. Chem.* 270: 22254-22258.
39. Robinson, T., Chandran, B., Nigam, P. 2001. Studies on the production of enzymes by white-rot fungus for the decolourisation of textile dyes. *Enzyme and Microb. Technol.* 29:574-579.
40. Rodriguez E., Pickard, M.A., Vazquez-Duhalt, R. 1999. Industrial dye decolorization by laccase from ligninolytic fungi. *Curr. Microbiol.* 38:27-32.
41. Sumathi, S., and Manju, B.S. 2000. Uptake of reactive textile dyes by *Aspergillus foetidus*. *Enzyme and Microb. Technol.* 27:347-355.
42. Tekere, M., Mswaka, A.Y., Zvauya, R. y Read J.S. 2001. Growth, dye degradation and ligninolytic activity studies on Zimbabwean white rot fungi. *Enzyme Microb. Technol.* 28:420-426.
43. Thorn, R.G., Reddy, C.A. Harris, D. and Paul E.A. 1996. Isolation of Saprophytic Basidiomycetes from Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4288-4292.
44. Thurston, C.F. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology.* 140:19-26.
45. Tien, M. and Kirk, T.K. 1988. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods in Enzymol.* 161:238-248.
46. Turor, U., Winterhalter, K. and Fiechter, A. 1995. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. *J. Biotechnol.* 41: 1-17.
47. Worrall, J.J. 1991. Media for selective isolation of Hymenomycetes. *Mycologia.* 83:296-302.
48. Yaropolov, A. I., Skorobogatko, O.V., Vartanov, S.S. and Varfolomeyev, S.D. 1994 "Laccase: Properties, catalytic mechanism, and applicability." *Appl. Biochem. and Biotechnol.* 49: 257-277.

49. Yaver, D.S. F. Xu, E.J. Golightly, K.M. Brown, S.H. Brown, M.W. Rey, P. Schneider, T. Halkier, K. Mondorf and H. Dalbøge. 1996. Purification, characterization, molecular cloning and expression of two laccase genes from the white rot Basidiomycete *Trametes villosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(3):834-841.
50. Yee, Dennis C., Jahng, Deokjin and Wood, Thomas K. 1996. "Enhanced Expression and hydrogen peroxide dependence of lignin peroxidase from *Streptomyces viridosporus* T74" *Biotechnol.* 12: 40-46.
51. Zarra, I., Revilla, G. 1993. "Fisiología y Bioquímica Vegetal". 1ª edición. Editorial Interamericana Mc Graw Hill. Pp. 10.
52. Zhang, F., Knapp, J.S. and Tapley, K.N. 1999. "Development of bioreactor systems for decolorization of orange II using white rot fungus". *Enzyme and Microbial Technology* 24 :48 -53.

Anexo: Tabla de Resultados Generales de los Aislados

Cepa	Guayacol	O-Anisidina	Poly R-478	RBBR	AR 44	CV	Crecimiento
CS 1	+	+	-	-	-	-	En toda la caja, moderado, algodonoso. Micelio de color blanco. &σ
CS 2	+ ^γ	+ ^γ	+++	+++	+++	χ	En toda la caja, moderado, arenoso. Micelio blanco.
CS 5	+ ^γ	+ ^γ	+++	+++	+++	+++	En toda la caja, moderado, algodonoso, micelio blanco. &
CS 5*	+	+	++	+++	+++	+++	En toda la caja, moderado, algodonoso, micelio blanco. &
CS 6	+	+ ^β	+++	+++	+++	-	En toda la caja, moderado, algodonoso, micelio blanco. δ
CS 9	+	+	-	++	-	-	En toda la caja, moderado, algodonoso, micelio blanco. δ
CS 11	-	-	-	+ ^β	+ ^β	-	En toda la caja, moderado, algodonoso, micelio blanco. δ
CS 19	+ ^γ	+ ^γ	+ ^β	++	++	-	En toda la caja, escaso, algodonoso. Micelio de color blanco. δ
CS 20	+ ^γ	+ ^γ	++	+++	+++	χ	En toda la caja, escaso, arenoso. Micelio blanco con pigmentos rojizos. δω
CS 21	+ ^γ	+ ^γ	-	++	-	-	En toda la caja, escaso, micelio de color blanco. δ
CS 22	+ ^γ	+ ^γ	-	++	-	-	En toda la caja, escaso, algodonoso, micelio blanco.
CS 24	+	+	-	++	-	-	En toda la caja, escaso, algodonoso, micelio blanco.
CS 25	+ ^γ	+ ^γ	-	-	-	-	En toda la caja, moderado, algodonoso. Micelio de color blanco. δ
CS 27	+	+	++	+++	+++	+ ^β	En toda la caja, moderado, algodonoso. Micelio de color blanco. δ
CS 31	+	+	+ ^β	++	++	-	En toda la caja, moderado, algodonoso, micelio blanco. δ
CS 39	Σ	Σ	-	+ ^β	+ ^β	-	En toda la caja, moderado, algodonoso, micelio blanco. δ
CS 41	-	Σ	+ ^β	++	++	χ	En toda la caja, moderado, micelio blanco. δ
CS 43	+	+	-	+++	-	X	Crece en toda la caja moderadamente, presenta un micelio de color rojizo, mismo tono que es difundido al medio. ω
CS 44	+	+	-	-	-	-	En toda la caja, moderado, algodonoso, micelio blanco. δ
CS 48	+ ^γ	+ ^γ	++	+++	+++	χ	En toda la caja, moderado, algodonoso, micelio blanco. δ
CS 50	-	-	-	-	-	-	En toda la caja, moderado, arenoso, micelio blanco. δ
CS 52	+	+	+ ^β	+ ^β	-	-	En toda la caja, escaso, algodonoso, micelio blanco. δ
CS 54	+ ^γ	+	+ ^β	+++	+++	+++	En toda la caja, moderado, algodonoso, micelio blanco. δ
CS 60	+	+	-	+ ^β	+++	χ	En toda la caja, moderado, algodonoso. Micelio de color blanco.
CS 61	+ ^γ	+ ^γ	+++	+++	+++	χ	En toda la caja, moderado, algodonoso, micelio blanco. δ

CS 62	+ ^γ	+ ^γ	+ ^β	+++	+++	+++	En toda la caja, moderado, algodonoso, micelio blanco.
CS 63	+ ^γ	+ ^γ	+++	+++	+++	+++	En toda la caja, moderado, algodonoso, micelio blanco. δ
CS 64	+ ^γ	+ ^γ	++	+++	+++	+++	En toda la caja, moderado, algodonoso, micelio blanco. δ
CS 65	+	+	-	-	-	-	En toda la caja, moderado, algodonoso, micelio pigmentado en tonos pardos. δ ω
CS 66	+ ^γ	+ ^γ	-	-	-	-	En toda la caja, moderado, algodonoso. Micelio pigmentado en tonos grises. δ ω
CS 67	-	-	-	-	-	-	En toda la caja, moderado, algodonoso. Micelio pigmentado en tonos oscuros (gris y negro).δ ω
CS 77	Λ	Λ	Λ	Λ	Λ	Λ	En toda la caja, abundante, algodonoso. Micelio café y productor de un pigmento rojizo, por lo que no se distinguen los cambios en el medio. ω
CS 78	+ ^γ	+ ^γ	+ ^β	++	++	++	En toda la caja, moderado, arenoso. Micelio color crema y con tonos pardos. ω
LE 5	+	+	++	+++	+++	+++	En toda la caja, moderado, algodonoso, micelio blanco. δ
LE 7	+	+	+ ^β	+++	+++	χ	En toda la caja, moderado, algodonoso, micelio blanco. δ
LE 13	+	+	++	+++	+++	+++	En toda la caja, moderado, algodonoso, micelio blanco. δ
LE 16	+	+	-	-	-	-	En toda la caja, moderado, algodonoso, micelio crema con tonos pardos.
LE 24	+ ^γ	+ ^γ	-	++	++	χ	En toda la caja, escaso, algodonoso, micelio blanco. δ
LE 31	+ ^γ	+ ^γ	++	+++	+++	χ	En toda la caja, moderado, algodonoso, micelio blanco. δ
LE 32	+	+	+ ^β	+++	+++	χ	En toda la caja, moderado, algodonoso. Micelio de color blanco. δ
LE 33	-	-	-	-	-	-	Poco (7 cm), escaso, algodonoso. Micelio blanco.
LE 34	+	+	+ ^β	+++	+ ^β	-	En toda la caja, moderado, algodonoso, micelio blanco. δ
LE 35	+	+	+ ^β	+++	+++	χ	En toda la caja, moderado, algodonoso, micelio blanco. δ
LE 44	+	+	-	-	-	-	En toda la caja, moderado, algodonoso, micelio blanco.
LE 45	+ ^γ	+ ^γ	++	+++	+++	χ	En toda la caja, moderado, algodonoso, micelio blanco.
LE 48	+	+	+ ^β	++	++	χ	En toda la caja, arenoso, seco y de micelio púrpura con tonos pardos
LE 50	-	-	-	-	-	-	En toda la caja, escaso. Micelio blanco.
LE 52	+	+	-	-	-	+	En toda la caja, moderado, algodonoso. Micelio verde oscuro.
LE54	+	+	++	+++	++	χ	En toda la caja, moderado, algodonoso. Micelio de color blanco.
LE 55	+	+	++	+++	+++	χ	En toda la caja, moderado, algodonoso. Micelio de color blanco. δ
LE 56	-	-	-	-	-	-	En toda la caja, moderado, algodonoso. Micelio de color blanco.
LE 57	+	+	-	+++	+ ^β	χ	En toda la caja, moderado, algodonoso. Micelio de color blanco.
							Toda la caja, moderado, algodonoso.

LE 58	+	+	-	-	-	-	Micelio de color blanco
LE 61	+	+	-	-	-	-	En toda la caja, moderado, algodonoso. Micelio de color verde oscuro con tonos pardos
LE 63	+	+	-	-	+ ^β	-	En toda la caja, moderado, algodonoso. Micelio de color verde oscuro con tonos grises
LE 64	-	-	+ ^β	-	-	-	En toda la caja, moderado, algodonoso, micelio blanco
LE 65	+	+ ^β	-	++	++	-	En toda la caja, moderado, algodonoso, micelio blanco
LE 66	Λ	Λ	Λ	Λ	Λ	+ ^β	En toda la caja, algodonoso, abundante. Micelio de color gris
LE 67	+ ^γ	+ ^γ	+ ^β	+ ^β	++	++	En toda la caja, escaso, algodonoso. Micelio de color blanco. δ
LE 68	-	-	-	-	-	-	En toda la caja, moderado, algodonoso. Micelio de color blanco
LE 69	+	+	+ ^β	++	+++	+++	En toda la caja, moderado, algodonoso. Micelio de color blanco
LE 72	-	-	-	-	-	-	En toda la caja, moderado, algodonoso. Micelio de color blanco.
LE 73	-	-	-	-	-	+ ^β	En toda la caja, moderado, algodonoso. Micelio de color verde.
LE 75	+	+	++	++	-	+ ^β	En toda la caja, moderado, algodonoso. Micelio de color amarillo.
LE 76	+	+	+ ^β	++	++	++	En toda la caja, moderado, arenoso. Micelio de color blanco con zonas café.
LE 78	+	+	+ ^β	+++	+++	+++	En toda la caja, moderado, algodonoso. Micelio de color blanco. δ
LE 79	+ ^γ	+ ^γ	+ ^β	+++	++	+ ^α	En toda la caja, moderado, algodonoso. Micelio blanco.
CU 1	+ ^γ	+ ^γ	+++	+++	+++	+++	En toda la caja, moderado, algodonoso. Micelio blanco.
CP 1	-	-	-	-	+ ^β	-	En toda la caja, moderado, algodonoso. Micelio de color blanco.&
SM 1	-	-	-	-	-	-	En toda la caja, escaso, algodonoso. Micelio blanco y es productor de un pigmento rojo. ω
CF 2	+	+	+ ^β	+++	++	χ	En toda la caja, moderado, algodonoso con aspecto seco. Micelio color amarillo con tonos café.
CF 3	+	+	-	-	-	-	En toda la caja, moderado. ω
CF 4	+ ^γ	+ ^γ	+++	+++	+++	+++	En toda la caja, moderado, algodonoso. Micelio de color amarillo con tonos pardos.
CF 5	+ ^γ	+	+ ^β	+++	+++	χ	En toda la caja, moderado, algodonoso. Micelio de color blanco. δ
CF 6	Σ	Σ	-	-	-	-	En toda la caja, moderado, algodonoso. Micelio de color naranja. δ
CF 7	+	+	+ ^β	++	++	χ	Toda la caja, abundante, algodonoso, micelio de color amarillo. δ
CF 9	+	+	++	+++	+++	χ	En toda la caja, moderado, algodonoso, micelio color crema. δ
CF 10	+	+	+ ^β	+++	+++	χ	En toda la caja, escaso, algodonoso, micelio crema. δ
CF 11	+	+	+ ^β	+++	+++	-	En toda la caja, escaso, algodonoso, micelio café. δ
CF 12	+	+	-	++	+ ^β	-	En toda la caja, escaso, algodonoso,

							micelio blanco.
CV 1	Σ	Σ	+ ^β	++	++	-	En toda la caja, escaso, algodonoso, micelio blanco.
CV 2	-	-	-	-	-	-	En toda la caja, escaso, algodonoso, micelio blanco.
CV 3	-	-	-	-	-	-	En toda la caja, moderado, algodonoso, micelio café. δ
G. aplanatum	+	+	++	++	++	-	En toda la caja, moderado, algodonoso, micelio blanco con tonos pardos.
L. edodes	+	+	++	+++	+++	χ	En toda la caja, moderado, algodonoso, micelio blanco con tonos amarillos.
SM2 Lenzites sp	Σ	Σ	-	-	++	-	En toda la caja, moderado, algodonoso, micelio de color naranja.
Pleurotus sp	+	+	+ ^β	+++	+++	+++	En toda la caja, escaso, algodonoso, micelio blanco de lento crecimiento
EM 1	-	+	-	-	-	+ ^β	Toda la caja, moderado, algodonoso. Micelio blanco.
EM 3	-	-	-	-	-	-	Toda la caja, moderado, algodonoso. Micelio café.
EM 5	Σ	-	-	-	-	++	En toda la caja, escaso, algodonoso, micelio blanco.
EM 6	-	-	-	+ ^β	-	χ	En toda la caja, escaso, arenoso. Micelio rosado.
ATCC 58053 <i>P. chrysosporium</i>	+	+	+	+	+	+	
ATCC 2472 <i>P. ostreatus</i>	+	+	-	-	-	-	
UAMH 8258 <i>B. adusta</i>	+	+	-	-	+	+	

Negativo	-
Reacción positiva	+
Decoloración total a los 20 días	++
Decoloración total a los 5 días	+++
Absorbancia del colorante por el micelio	&
Se diferencia	δ
Produce pigmento	ω
Aclara la reacción a los 20 días	γ
Parcial a los 5 días	+ ^α
Parcial a los 20 días	+ ^β
Reacción positiva hasta el día	Σ
No perceptible por el pigmento producido	Λ
No se probó	χ

