

Acción de *Stereum hirsutum* (Wild) Pers. en la degradación de colorantes

Nora Mouso, Luis Diorio y Flavia Forchiassin

Laboratorio de Micología Experimental, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina

Resumen *Stereum hirsutum*, un basidiomicete responsable de la pudrición blanca de la madera, mostró un buen desarrollo durante un proceso de fermentación en estado sólido. Esta se realizó en salvado de trigo, salvado de soja o en una mezcla de ambos. En salvado de soja presentó la mayor actividad decolorante sobre xilidina (Ponceau 2R), índigo-carmin y verde de malaquita. Se obtuvieron valores óptimos de decoloración y detoxificación con una relación de 30 g de peso fresco (sustrato+hongo) en 500 ml de solución de verde de malaquita, con una actividad lacasa de 42 U/l. El proceso de decoloración se llevó a cabo sin el agregado de nutrientes ni de mediadores. Los máximos de decoloración no fueron coincidentes con las máximas actividades enzimáticas, pero la acción oxidante de la lacasa producida por *S. hirsutum* sobre los colorantes quedó confirmada con el análisis electroforético, que permitió relacionar la actividad de dicha enzima y su acción decolorante, utilizando geles teñidos con índigo-carmin y con verde de malaquita, con ABTS (2,2'-azino-bis-3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfónico) como mediador. La detoxificación se estableció en base al crecimiento de *Phanerochaete chrysosporium*, un hongo sensible al verde de malaquita.

Palabras clave *Stereum hirsutum*, Hongo de la pudrición blanca, Decoloración, Detoxificación, Lacasa

Stereum hirsutum (Wild) Pers. action in dye degradation

Summary *Stereum hirsutum*, a white rot fungus, has a good growth in solid state fermentation. This was carried on with wheat bran, soy bran and a mixture of both. Mycelia grown on soy bran showed the highest decolorization activity on Ponceau 2R (xyloidine), indigo carmine and malachite green. Optimal relationship between decolorization and detoxification of malachite green was 30 g of fresh weight (mycelia plus substrate) in 500 ml malachite green solution, 42 U/l of laccase was measured in this solution. Decolorization was carried on without the addition either of nutrients or mediators. Conditions for maximal decolorization did not agree with those for maximal ligninolytic enzyme production, but effectiveness of laccase activity on decolorization was evidenced by electrophoretic analysis, that allowed laccase identification and its decolorization activity in gels stained with indigo carmine and malachite green, with ABTS as mediator. Detoxification was assayed using the sensible fungus *Phanerochaete chrysosporium*.

Key words *Stereum hirsutum*, White rot fungi, Decolorization, Detoxification, Laccase

Grandes cantidades de compuestos aromáticos recalcitrantes son volcados al medio ambiente año tras año. Los procesos de biorremediación permiten reducir la toxicidad de estos compuestos, disminuyendo su impacto so-

bre el ambiente. Los basidiomicetes de la pudrición blanca son organismos promisorios para ser aplicados en procesos de biorremediación [18], ya que producen exoenzimas oxidativas que pueden degradar dichos compuestos xenobióticos. Pertenecen a este grupo de enzimas las peroxidasa ligninolíticas con alto potencial redox (lignin peroxidasa, manganeso peroxidasa y peroxidasa versátil) y las oxidasa como la lacasa [13].

La capacidad degradativa de estos hongos ha sido ampliamente estudiada tanto actuando sobre hidrocarburos aromáticos [24], dibenzo-*p*-dioxina, dibenzofuran, bifenilo y difenil éter [14], verde de malaquita [17], y en la reducción de contaminantes derivados de la industria del papel [2,20]. Los derivados de la industria textil son también una importante fuente de contaminación que alcanza volúmenes de alrededor de 800 kt/año. La similitud existente entre la estructura química de los monómeros de la lignina y de los colorantes industriales hace posible la aplicación de las enzimas extracelulares de los hongos de la

Dirección para correspondencia:

Dra. Nora Mouso
Laboratorio de Micología Experimental
Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires
Ciudad Universitaria, Pab II, piso 4
1428, Buenos Aires, Argentina
Fax: +54 11 4576-3384
E-mail: mouson@bg.fcen.uba.ar

Aceptado para publicación el 22 de mayo de 2007

©2007 Revista Iberoamericana de Micología
Apdo. 699, E-48080 Bilbao (Spain)
1130-1406/01/10.00 €

putridión blanca de la madera en la degradación de dichos colorantes [9,22,27]. Las investigaciones recientes en biorremediación utilizando estos organismos muestran una clara tendencia al uso de mecanismos basados en la acción de las enzimas purificadas e inmovilizadas en columnas [1], la acción biológica del micelio puesto en contacto con los residuos contaminantes [7], o el uso del micelio inmovilizado en soportes sintéticos o naturales con mecanismos de retroalimentación [4,23].

Stereum hirsutum es un basidiomicete de la pudrición blanca con una alta producción de lacasa y manganeso peroxidasa en medio líquido [15], y con un profuso crecimiento en fermentación en sustrato sólido. En este trabajo se analiza el poder de decoloración y detoxificación de *S. hirsutum* sin la aplicación de co-sustratos, mediadores o nutrientes en el sustrato sólido, tal como ocurre en otras especies [5,19], con el fin de encontrar un sistema de decoloración de colorantes industriales de aplicación sencilla y económica.

Material y métodos

Organismos. Se utilizaron las cepas de colección *S. hirsutum* BAFC 2234, y *Phanerochaete chrysosporium* BAFC 232 y BAFC 246. Estas fueron mantenidas en tubos

pico de flauta con medio de agar extracto de malta (agar 2%, extracto de malta 1,2% y glucosa 1%) a 4 °C.

Condiciones y medios de cultivo. Se utilizó como sustrato sólido salvado de trigo, salvado de soja o una mezcla de ambos en proporción 1:1. Todos los cultivos se desarrollaron a 28 °C, en matraces tipo Erlenmeyer de 100 ml con 4 g (peso seco) del sustrato sólido hidratado con agua corriente hasta alcanzar un contenido final del 80%. Los inóculos se realizaron con cultivos de cinco días en medio agar extracto de malta.

Ensayos de decoloración. Se utilizaron soluciones de Ponceau 2R, 20 µM; índigo-carmin, 20 µM; y verde de malaquita, 10 µM. A 30 ml de cada solución se le agregaron 2 g (peso fresco) de sustrato con el hongo. Se midió la absorbancia en tiempo cero (antes de la inclusión del agregado sustrato-hongo) y a intervalos de 10 min durante la primera hora, y cada 30 min durante la segunda hora. Las longitudes de onda utilizadas fueron de 505 nm para la xilidina (Ponceau 2R), 605 nm para el índigo-carmin y 615 nm para el verde de malaquita, correspondientes a sus máximos de absorción.

Ensayos de detoxificación. Para estos ensayos se utilizó a *P. chrysosporium* como organismo test siguiendo la técnica propuesta por Papinutti y Forchiassin [17]. Se realizaron sobre muestras originadas por la decoloración de soluciones de verde de malaquita. Cada muestra fue

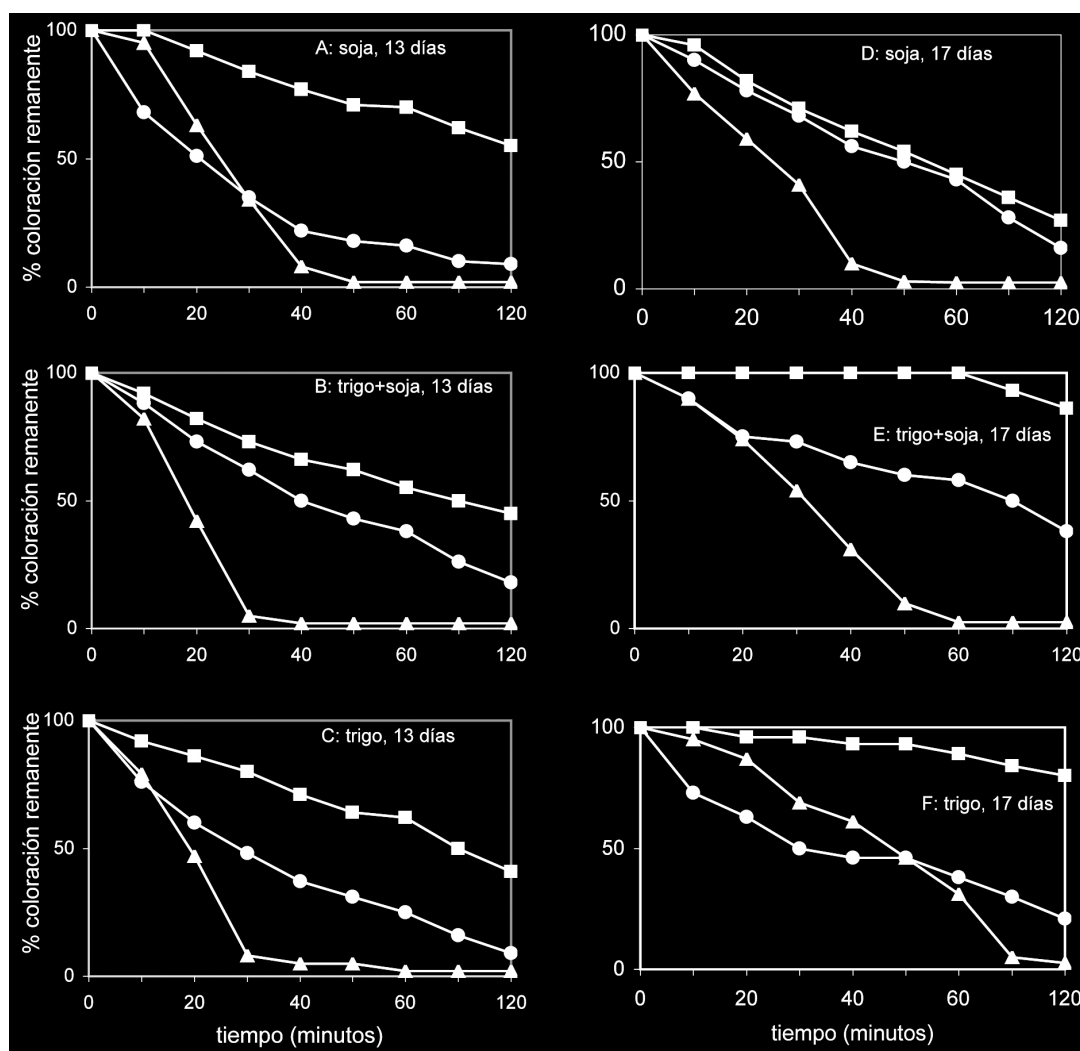


Figura 1. Degradación de los colorantes verde de malaquita 10 µM (●), índigo-carmin 20 µM (▲) y xilidina 20 µM (■) por *S. hirsutum* creciendo en tres sustratos sólidos en dos momentos de su curva de crecimiento: día 13 (A,B,C) y día 17 (D,E,F)

complementada con glucosa (1%) y extracto de malta (1,2%). Cada una de estas muestras enriquecidas fueron usadas como medio de cultivo para *P. chrysosporium*, cuyo crecimiento se evaluó. Como testigos del nivel de detoxificación se realizaron en forma paralela cultivos en glucosa-malta con verde de malaquita en concentraciones 0, 2, 4, 8 y 16 μM .

Valoración de enzimas. Una porción de 4 g (peso fresco) del agregado sustrato-hongo se suspendió en 20 ml de agua destilada y se agitó durante 20 min. El sobrenadante se centrifugó a 2.000 rpm, y el extracto crudo se congeló a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su utilización.

Actividad lacasa: se valoró por oxidación del sustrato ABTS (2,2'-azino-bis-3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfónico) 5 mM [16]. La reacción se realizó a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, en buffer acetato de sodio (pH 3,5) y se midió el incremento de absorbancia a 420 nm ($\epsilon_{420} = 36/\text{mM cm}$).

Actividad manganeso peroxidasa: fue medida usando como sustrato rojo fenol en tampón 0,1 M sodio dimetilsuccinato (pH 4,5) a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\epsilon_{610} = 22/\text{mM cm}$) [12].

Actividad glioxal oxidasa: fue determinada usando dos reacciones acopladas, metilglioxal como sustrato de la enzima, y rojo fenol como sustrato de la manganeso peroxidasa ($\epsilon_{610} = 22/\text{mM cm}$) [11]. La unidad de actividad enzimática (U) se define como 1 mmol de producto oxidado producido por minuto, y se expresa como U/g de sustrato seco.

Electroforesis. Los extractos crudos se corrieron en geles de poliacrilamida con sodio dodecilsulfato (SDS-PAGE) al 9% en sistema vertical. Como solución conductora se utilizó Tris-glicina (pH 8,3). Finalizada la electroforesis, los geles se fijaron durante 10 min en 10% (v/v) de ácido acético y 40% (v/v) de metanol, y después se sumergieron durante 10 min en solución de índigo-carmin 20 μM o verde de malaquita 10 μM en tampón acetato (pH 3,6). Se preservaron de la desecación con film transparente y se incubaron a $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ con los siguientes tratamientos: a) sin ningún agregado, b) con el agregado HBT (1-hidroxibenzotriazol) 8 mM, y c) con el agregado ABTS 0,5 mM.

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. Los valores que se representan tienen una desviación estandar menor al 10%.

Resultados

Ensayos de decoloración y detoxificación. *S. hirsutum* creció formando una trama de micelio muy consistente y de difícil disgregación, que convirtió al agregado sustrato-hongo en una masa uniforme, firme y de apariencia corchosa. El sistema mostró una alta flotabilidad de manera que se encontraba en contacto con la solución del colorante y con la atmósfera, asegurando así una degradación aeróbica.

Los ensayos de decoloración mostraron diferencias entre los distintos sustratos sólidos sobre los que se cultivó el hongo y el colorante aplicado. El hongo cultivado en diferentes sustratos varió su actividad decolorante, siendo en general más activo cuando el sustrato fue salvado de soja. Esto se observó, principalmente, en los muestreos de los días 13 y 17. Los cultivos de 13 días fueron más eficaces en la decoloración de verde malaquita y de índigo-carmin (Figura 1 A, B y C). Se observó a los 13 días de desarrollo que el agregado sustrato-hongo, con salvado de soja como sustrato, fue eficaz en la degradación de índigo-carmin y de verde-malaquita (Figura 1A). Los cultivos de 17 días fueron más eficaces en la decoloración de xilidina (Figura 1D); en este caso, la cepa también creció sobre salvado de soja como sustrato. En los días 20 y 28 de cultivo la actividad decolorante del hongo creciendo sobre los tres

sustratos alcanzó niveles similares, siempre menores a los registrados en los cultivos más jóvenes, y requerido de mayores tiempos de contacto. El hongo cultivado en un sustrato mezcla de salvado de soja y de trigo en proporción 1:1, arrojó resultados que no son intermedios a cuando se lo cultivó en cada sustrato por separado (Figura 1). En la tabla 1 de muestran las mejores condiciones de degradación de cada colorante con respecto a cada tipo de sustrato utilizado.

Detoxificación del V. de malaquita

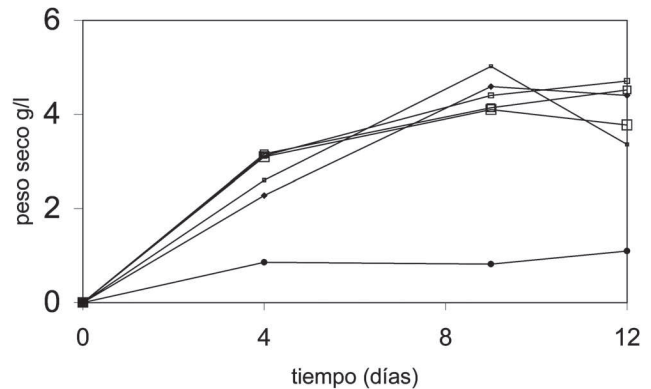


Figura 2. Curva de crecimiento de *P. chrysosporium* en las soluciones de verde de malaquita 20 μM decoloradas y detoxificadas durante diferentes tiempos de contacto entre la solución y el agregado sustrato-hongo (\square 2 horas de contacto, \square 4 horas de contacto, \square 24 horas de contacto) Crecimiento testigo (\bullet) Crecimiento con verde de malaquita 2 μM (\bullet).

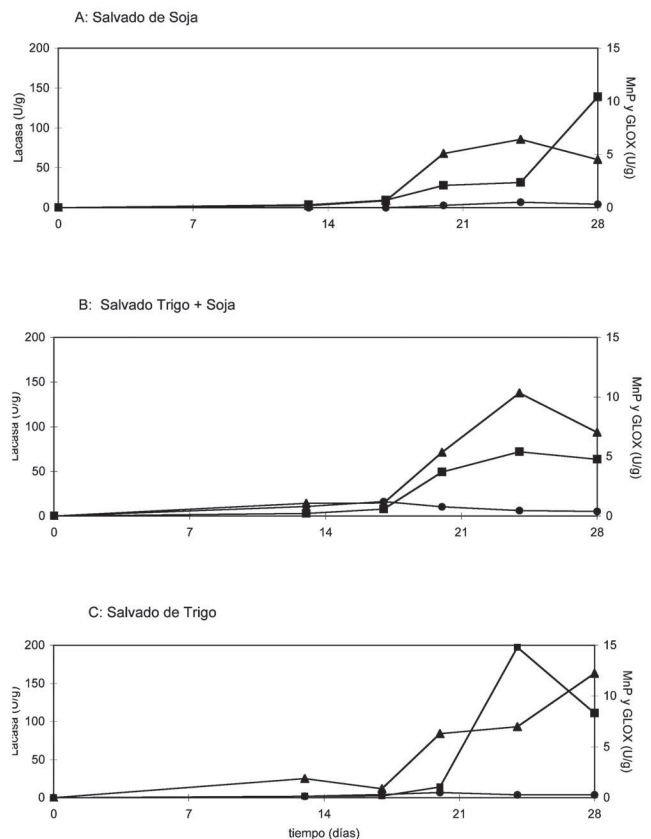


Figura 3. Producción de ligninasas: lacasa $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ (\blacksquare), manganeso peroxidasa $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ (\blacktriangle), y de glioxal oxidasa $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ (\bullet), en función del tiempo para tres sustratos sólidos. A: salvado de soja, B: salvado de soja + salvado de trigo 1:1, y C: salvado de trigo.

Tabla 1. Sistemas óptimos de decoloración para cada colorante.

Colorante	Decoloración (%)	Sustrato sólido	Día de cultivo (días)	Tiempo contacto (minutos)
Xilidina	77	S. Soja	17	120
Índigo	98	1Trigo:1Soja	13	40
V. malaquita	97	S. Soja	13	120

Tabla 2. Diferentes tratamientos detoxificantes para el verde de malaquita y muestreo seriado indicando los resultados de decoloración y de detoxificación a diferentes tiempos.

V de Malaquita (µM)	T de contacto (h)	Decoloración (%)	Toxicidad (%)
10 + 10	24 + 24	96	0
20	2	66	0
20	3	80	0
20	4	86	0
20	24	96	0

Tomando como condición óptima de decoloración al sistema sustrato-hongo constituido por soja, y con *S. hirsutum* con 13 días de crecimiento, se realizaron dos tipos de estudios: a) Secuencial: se suspendieron muestras de 30 g de *S. hirsutum* crecido en el sustrato sólido en 500 ml de una solución 10 µM de verde de malaquita. Tras 24 h de contacto, la solución fue llevada nuevamente a una concentración de 10 µM con verde de malaquita fresco; b) No secuencial: se agregaron 30 g del sistema sustrato-hongo a 500 ml de una solución 20 µM de verde de malaquita. En ambos casos se realizaron muestreos de las soluciones decoloradas a las 2, 3, 4 y 24 h de contacto (Tabla 2).

Sobre las soluciones decoloradas se realizaron estudios de toxicidad. El grado de detoxificación se estableció con *P. chrysosporium*, un basidiomicete sensible al verde de malaquita [17]. La cepa se cultivó en medio de malta líquido con verde de malaquita en concentraciones 0, 2, 4, 8 y 16 µM, como control del nivel de resistencia de *P. chrysosporium* al colorante. De forma paralela, se cultivó el hongo en las soluciones decoloradas suplementadas con glucosa y extracto de malta. Los resultados (Figura 2 y Tabla 2) muestran la total detoxificación. El proceso fue altamente eficiente, siendo suficientes 2 h de contacto entre el sistema sustrato-hongo y la solución de verde de malaquita 20 µM para la detoxificación. *P. chrysosporium* creció en todas las soluciones decoloradas con la misma cinética que en el medio testigo sin colorante (concentración 0 de verde de malaquita). Se registró un leve crecimiento fúngico en una concentración de 2 µM del colorante; en concentraciones mayores no hubo crecimiento.

Valoración de enzimas. Se realizó la valoración de las concentraciones de lacasa, manganeso peroxidasa y glioxal oxidasa presentes en los agregados sustrato-hongo con cada sustrato utilizado (Figura 3). La producción de enzimas ligninolíticas se incrementó después de 20 días de cultivo, pero la estimación de glioxal oxidasa mostró otro comportamiento: su actividad máxima se observó en el sustrato constituido por la mezcla de soja con trigo (Figura 3B), y fue menor en trigo, con máximos en los cultivos más jóvenes (Figura 3C). Cuando el sustrato fue soja la actividad fue mucho menor, con máximos similares a las enzimas lacasa y manganeso peroxidasa (Figura 3A).

Electroforesis y decoloración. La discrepancia entre los máximos de decoloración y los máximos de enzimas ligninolíticas llevó a valorar el poder decolorante de las

enzimas. Se realizó un ensayo combinado de electroforesis y decoloración. Los geles fueron fijados y teñidos con índigo-carmin o con verde de malaquita durante 10 min.

En los geles teñidos tanto con índigo-carmin como verde de malaquita no se observó inicialmente decoloración. Cuando se agregó ABTS, un mediador de la enzima lacasa, el desarrollo de la decoloración fue inmediato en los geles teñidos con índigo-carmin (Figura 4 B), y esta acción decolorante continuó durante las siguientes horas ampliando la zona decolorada (Figura 4 C). En los geles teñidos con verde de malaquita se puso de manifiesto la decoloración tras tres horas de incubación, y continuó durante las 24 h siguientes (Figura 4 A). Cuando se agregó HBT, otro mediador de la lacasa, la decoloración se limitó a la banda de lacasa en el gel teñido con índigo-carmin (dato no mostrado). En los geles teñidos con verde de malaquita no se observó decoloración.

La utilización del ABTS como mediador [8,17] permitió ver la decoloración y verificar simultáneamente el rol decolorante de la lacasa, dado que, finalizada la pérdida de color, comienza la reacción de la enzima con el ABTS, observándose la mancha verde indicadora de la actividad de esta enzima.

Discusión

Los sustratos naturales son un medio económico donde pueden crecer los basidiomicetes de la pudrición blanca. *S. hirsutum* mostró en este trabajo una gran capacidad para aprovechar estos sustratos como soporte para un crecimiento denso y profuso. La posibilidad simultánea de crecer sobre el soporte nutritivo y degradar compuestos recalcitrantes permitiría alcanzar la mineralización completa de estos últimos. *S. hirsutum* se nutrió del sustrato sin la necesidad de realimentación para mantener sus propiedades detoxificantes como ocurrió en *Trametes versicolor* que necesitó el agregado de glucosa [23]. Tampoco requirió del agregado de mediadores de la actividad lacasa [6,19]; los intermediarios para las reacciones de oxidación habrían sido suministrados por el metabolismo del hongo. Camarero et al. [3] determinaron que los fenoles producidos por la degradación natural de la lignina, podrían actuar como intermediarios en la oxidación de colorantes.

Los parámetros evaluados en este trabajo permitieron observar que la acción del hongo sobre los compuestos recalcitrantes no coincidía con los máximos de actividad de las enzimas ligninolíticas determinados. Posiblemente, durante los primeros días de cultivo, la cepa tiene una actividad más alta para degradar el sustrato y

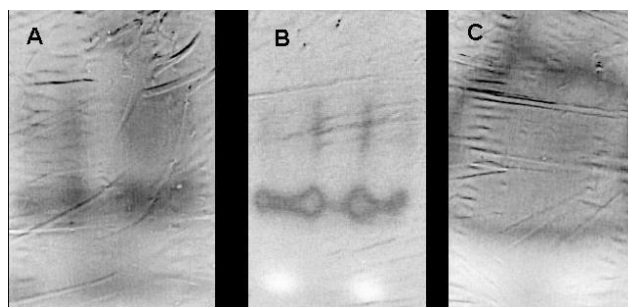


Figura 4. Geles de extractos crudos del agregado sustrato-hongo teñidos con verde de malaquita (A) y índigo-carmin (B y C). En A se observa el gel decolorado coincidiendo con las dos bandas de lacasa (24 horas de incubación). En el gel B se observa la decoloración del índigo-carmin en ambas bandas de lacasa y el inicio de la reacción indicadora de presencia de la enzima con ABTS (1 hora). C muestra la evolución del gel B a las 24 horas: hay una amplia zona de decoloración y de reacción con el ABTS.

establecerse. La mayor actividad fisiológica produciría la presencia de mediadores e intermediarios internos o la potenciación de las ligninasas. Un posible mediador interno en la cadena de oxidación es la citocromo P450 monoxigenasa. El rol de la citocromo P450 monoxigenasa en la degradación de compuestos xenobióticos ha sido descrita; su inhibición frenó procesos de oxidación de compuestos xenobióticos en *Phlebia lindtneri* [14]. En el presente trabajo los ensayos electroforéticos mostraron la participación de las enzimas lignolíticas, particularmente la lacasa, en el proceso de decoloración. La decoloración de los geles teñidos con índigo-carmín y verde de malaquita, coincidentes con la posición de la enzima detectada con ABTS, es una prueba relevante. La decoloración de los geles fue óptima cuando se utilizó ABTS como mediador, y no HBT. Ünyayar et al. [25] utilizaron un método similar en el cual los geles teñidos con Drimarene Blue X3LR fueron decolorados y luego sumergidos en una solución de guayacol para revelar la presencia de lacasa.

El sistema sustrato-hongo mostró una alta eficiencia: 4 g de sustrato seco, hidratado e inoculado, produjeron 21 gramos de sistema sustrato-hongo fresco, con un total de 15 U de lacasa. Cuando establecimos las condiciones de detoxificación, se agregaron 30 g de sistema sustrato-hongo fresco a 500 ml de solución de verde de malaquita

20 µM, con una concentración de 0,042 U/ml. En estas condiciones se produjo una detoxificación del 100% en dos horas de contacto. En general, en otros reportes sobre actividad decolorante se requieren concentraciones mayores de enzimas. Con extractos crudos de *Pleurotus ostreatus* se requirieron 30 U/ml de lacasa para obtener degradación [8]. El proceso de decoloración llevado a cabo en un biorreactor de 2 litros de capacidad con *Trametes versicolor* utilizó 1,5 U de lacasa por mililitro [21].

El tiempo requerido para alcanzar la decoloración en nuestro sistema también es menor que el encontrado en otros casos. Ensayos de decoloración de remazol azul brillante R con cultivos inmobilizados de *Irpex lacteus* en forma estacionaria requirieron de dos días de contacto [10].

Dada la abundancia de residuos agroindustriales que se generan en Argentina y la interacción entre *S. hirsutum* y estos sustratos naturales, es posible incrementar la velocidad de compostaje y mineralización de estos residuos en forma conjunta con procesos de biorremediación.

Al CONICET (PIP6069) y a UBACYT (X033) por el soporte financiero.

Bibliografía

1. Abadulla E, Tzanov T, Costa S, Robra K, Cavaco-Paulo A, Gübitz GM. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. Appl Environ Microbiol 2000; 66: 3357-3362.
2. Ali M, Sreekrishnan, TR. Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents: a review. Adv Environ Res 2001; 5: 175-196.
3. Camarero S, Ibarra D, Martínez MJ, Martínez AT. Lignin-Derived Compounds as Efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. Appl Environ Microbiol 2005; 71: 1775-1784.
4. Chang H, Joyse TW, Kirk TK, Huynh N. Process of degrading chloro-organics by fungi, US Patent (No. 4554075); 1985: 1-6.
5. Coulibaly L, Gourene G, Agathos NS. Utilization of fungi for biotreatment of raw wastewaters. African J Biotechnol 2003; 2: 620-630.
6. Fabbrini M, Galli C, Gentili P. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. J Mol Catal B: Enzym 2002; 16: 231-240.
7. Haglund C, Levin L, Forchiassin F, Lopez M, Viale A. Degradation of environmental pollutants by *Trametes troglia*. Rev Arg Microbiol 2002; 43: 157-162.
8. Hou H, Zhou J, Wang J, Du Cuihong, Yan B. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. Process Biochem 2004; 39: 1415-1419.
9. Jarosz-Wilkolazka A, Kochmanska-Rdest J, Malarczyk E, Wardas W, Leonowicz A. Fungi and their ability to decolorize azo and anthraquinonic dyes. Enzyme Microb Technol 2002; 30: 566-572.
10. Kasinath A, Novotny C, Svobodova K, Patel KC, Sasek V. Decolorization of synthetic dyes by *Irpex lacteus* in liquid culture and packed-bed bioreactor. Enzyme Microb Technol 2003; 32: 167-173.
11. Kersten PJ. Glioxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: its characterization and activation by lignin peroxidase. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 2936-2940.
12. Kuwahara M, Glenn JK, Morgan MA, Gold MH. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Lett 1984; 169: 247-250.
13. Martínez AT, Speranza M, Ruiz-Dueñas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillén F, Martínez MJ, Gutiérrez A, del Río JC. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. Int Microbiol 2005; 8: 195-204.
14. Mori T, Kondo R. Oxidation of dibenzo-*p*-dioxin, dibenzofuran, biphenyl, and diphenyl ether by white-rot fungus *Phlebia lindtneri*. Appl Microbiol Biotechnol 2002; 60: 200-205.
15. Mouso N, Papinutti L, Forchiassin F. Efecto combinado del cobre y pH inicial del medio de cultivo sobre la producción de lacasa y manganeso peroxidasa por *Stereum hirsutum* (Willd) Pers. Rev Iberoam Micol 2003; 20: 176-178.
16. Niku-Paavola, ML, L. Raaska, M. Itavaara. Detection of white-rot fungi by non-toxic stain. Mycol Res 1990; 94: 27-31.
17. Papinutti VL, Forchiassin F. Modification of malachite green by *Fomes sclerodermeus* and reduction of toxicity to *Phanerochaete chrysosporium*. FEMS Microbiol Lett 2004; 231: 205-209.
18. Pointing SB. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. Appl Microbiol Biotechnol 2001; 57: 20-33.
19. Pozdnyakova NN, Rodakiewicz-Nowak J, Turkovskaya O. Catalytic Properties of Yellow Laccase from *Pleurotus ostreatus* D1. J Mol Catal B: Enzym 2004; 30: 19-24.
20. Raghukumar C, Mohandass C, Kamat S, Shailaja MS. Simultaneous detoxification and decolorization of molasses spent wash by the immobilized white-rot fungus *Flavodon flavus* isolated from a marine habitat. Enzyme Microb Technol 2004; 35: 197-202.
21. Rancaño G, Lorenzo M, Molares N, Rodríguez Couto S, Sanromán MA. Production of laccase by *Trametes versicolor* in an airlift fermentator. Process Biochem 2003; 39: 467-473.
22. Robinson T, McMullan G, Marchant R, Nigam P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. Biore Technol 2001; 77: 247-255.
23. Shin M, Nguyen T, Ramsay J. Evaluation of support materials for surface immobilization and decoloration of amaranth by *Trametes versicolor*. Appl Microbiol Biotechnol 2002; 60: 218-223.
24. Song HG. Biodegradation of aromatic hydrocarbons by several white-rot fungi. J Microbiol 1997; 35: 66-71.
25. Ünyayar A, Mazmanci MA, Atcag H, Erkurt EA, Coral G. A Drimarene Blue X3LR dye decolorizing enzyme from *Funalia troglia*: one step isolation and identification. Enzyme Microb Biotechnol 2005; 36: 10-16.
26. Wessenberg D, Kyriakides I, Agathos SN. White-rot and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. Biotechnol Adv 2003; 22: 161-187.
27. Yang Q, Yang M, Pritsch K, Yediler A, Hang A, Schloter M, Ketrup A. Decolorization of synthetic dyes and production of manganese-dependent peroxidase by new fungal isolates. Biotechnol Lett 2003; 25: 709-713.