



Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas,
Químicas y Naturales. Departamento de Genética

Tesista

César Adrián Preussler

**Estudios en el efecto de la inducción
de la enzima Lacasa en el hongo de
pudrición blanca *Trametes villosa***

**Tesis presentada para obtener el título de
“Licenciada en Genética”**

Directora

Dra. Laura Villalba

Co-Director

Dr. Pedro Darío Zapata

Posadas, Misiones 2008



Esta obra está licenciado bajo Licencia Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>



UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES

Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales

Tesina para optar al grado de

LICENCIADO EN GENÉTICA

“Estudios en el efecto de la inducción de la enzima
Lacasa en el hongo de pudrición blanca
Trametes villosa”

ALUMNO

CÉSAR ADRIÁN PREUSSLER

DIRECTORES

Dra. Laura Villalba

Dr. Pedro Darío Zapata

LUGAR DE REALIZACIÓN

Laboratorio de Biotecnología Molecular

AÑO

2008



ÍNDICE

Índice General.....	I
Siglas y Abreviaturas utilizadas en el trabajo.....	II
1. Introducción	
1.1. La contaminación ambiental y tipos de contaminación.....	1
1.2. La contaminación ambiental en la Argentina.....	2
1.3. Biotecnología.....	3
1.4. Biorremediación: Organismos que limpian el ambiente.....	4
1.5. Los hongos y el ambiente.....	5
1.6. Lignina: nociones básicas de su estructura.....	7
1.7. Sistema enzimático presente en los hongos.....	8
1.8. Estructura molecular de las principales enzimas ligninolíticas.....	10
1.9. Posibles aplicaciones y usos de las enzimas.....	13
2. Objetivos.....	16
3. Materiales y Métodos.....	17
3.1 El modelo biológico.....	17
3.2 Preparación de los tacos.....	18
3.3 Medios de cultivo sólidos.....	19
3.4 Medios de cultivo líquido.....	19
3.5 Colorantes utilizados.....	20
3.6 Degradación en medio sólido.....	20
3.7 Determinación de la actividad enzimática.....	20
3.8 Extracción de ADN.....	22
3.9 Amplificación de un fragmento génico por medio de la técnica PCR.....	22
3.10 Medición de proteínas totales.....	24
3.11 Aislamiento de RNA total.....	26
3.12 Obtención de DNAc a partir de mRNA por medio de RT.....	27
3.13 Amplificación de ADNc por PCR.....	28
4. Resultados.....	30
4.1 Análisis comparativo de la actividad oxidativa del hongo <i>Trametes villosa</i> en medios sólidos.....	30



4.2 Efecto del Cu sobre la Actividad Enzimática de Lacasa.....	34
4.3 Efecto del Cu sobre los niveles de mRNA de Lacasa.....	35
4.4 Extracción de ADN.....	37
4.5 Medición de proteínas totales.....	38
5. Discusión.....	40
6. Conclusión.....	44
7. Anexos.....	46
8. Referencias Bibliográficas.....	63
9. Agradecimientos.....	74



SIGLAS Y ABREVIATURAS

CO₂	Dióxido de carbono
kDa	Kilo Daltons
Lac	Lacasa
MnP	Manganeso Peroxidasa
LiP	Lignin Peroxidasa
H₂O₂	Peróxido de Hidrógeno
Mn⁺	Ión Manganeso
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)
Cu⁺	Ión Cobre
DDT	1,1,1-Tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)-etano
CuSO₄	Sulfato de Cobre
Cl₂Mg	Cloruro de Magnesio
LN	Licor Negro
AMG	Agar Malta Glucosado
ASAB	Agar Sabouraud
VM	Verde de Malaquita
AB	Azul de Bromofenol
μM	Micro molar
DMP	2,6-dimetoxifenol
GF/C	Filtros de fibra de vidrio
UI	Unidades Internacionales
Abs	Absorbancia
mL	Mili litro
mM	Mili molar
EDTA	Etilen diamino tetra acético
SDS	Dodecil sulfato sodico
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
TBE	Tris-borato-EDTA
BrEt	Bromuro de Etidio
UV	Ultravioleta
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
GuSNC	Tiocinato de Guanidinio
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
RT-PCR	Trascripción reversa de la reacción en cadena de la Polimerasa
MMLV	Virus de Leucemia Murina de Maloney
DNA	Acido desoxirribonucleico
RNA	Acido Ribonucleico
mRNA	Acido Ribonucleico mensajero



INTRODUCCIÓN

La Contaminación Ambiental y Tipos de Contaminación

La contaminación es la introducción en un medio cualquiera de un contaminante, es decir, la introducción de cualquier sustancia o forma de energía con potencial para provocar daños, irreversibles o no, en el medio inicial. (Nevel B., Wrigth, 1999) Se denomina **contaminación ambiental** a la presencia en el ambiente de cualquier agente (físico, químico o biológico) o bien de una combinación de varios agentes en lugares, formas y concentraciones tales que sean o puedan ser nocivos para la salud, la seguridad o para el bienestar de la población, o que puedan ser perjudiciales para la vida vegetal o animal, o impidan el uso normal de las propiedades y lugares de recreación y goce de los mismos. La contaminación ambiental es también la incorporación a los cuerpos receptores de sustancias sólidas, líquidas o gaseosas, o mezclas de ellas, siempre que alteren desfavorablemente las condiciones naturales del mismo, o que puedan afectar la salud, la higiene o el bienestar del público. (Nevel B., Wrigth, 1999)

La contaminación se clasifica según los grandes medios en la que se la puede encontrar:

- Contaminación del suelo
- Contaminación del aire o contaminación atmosférica
- Contaminación del agua o contaminación hídrica

Contaminación atmosférica

La contaminación atmosférica es causada principalmente por las emisiones en la atmósfera terrestre, en especial, de dióxido de carbono. Los contaminantes principales son los productos de procesos de combustión convencional en actividades de transporte, industriales, generación de energía eléctrica y calefacción doméstica, la evaporación de disolventes orgánicos y las emisiones de ozono y freones. (Nevel B., Wrigth, 1999)



Contaminación hídrica

Se refiere a la presencia de contaminantes en el agua (ríos, mares y aguas subterráneas). Los contaminantes principales son los vertidos de desechos industriales (presencia de metales y evacuación de aguas a elevada temperatura) y de aguas servidas (saneamiento de poblaciones). (Nevel B., Wrigth, 1999)

Contaminación del suelo

Se refiere a la presencia de contaminantes en el suelo, principalmente debidos a actividades industriales (almacenes, vertidos ilegales), vertido de residuos sólidos urbanos, productos fitosanitarios empleados en agricultura (abonos y fertilizantes químicos) y purines de las actividades ganaderas. (es.wikipedia.org/wiki/Contaminación)

La contaminación ambiental en la Argentina

En general, la contaminación ambiental en la Argentina es mayor que lo que se podría esperar de un país con un nivel de desarrollo mediano a alto. Estos problemas son consecuencia principalmente del aumento gradual de la población urbana y del desarrollo industrial, junto con un marco de reglamentaciones inadecuado y un déficit de décadas en materia de infraestructura sanitaria y de tratamiento de desperdicios. La capacidad y autoridad institucional para la gestión ambiental está fragmentada entre numerosos organismos en los niveles nacional, provincial y municipal, lo que conduce a la superposición de jurisdicciones, a la debilidad del control y al incumplimiento de las normas. Como consecuencia de esa fragmentación de responsabilidades institucionales y falta de coordinación, se ha producido un marco institucional y regulatorio confuso para la gestión ambiental. (Nevel B., Wrigth, 1999)

Uno de los mayores obstáculos es la escasez de información ambiental, debido a que hay muy poco monitoreo de la contaminación del aire y de cuerpos de agua, y virtualmente no existen análisis de sus efectos sobre la salud y de otros costos económicos. Los problemas más serios parecen encontrarse en las áreas urbanas más densamente pobladas, especialmente en derredor de los bolsones de pobreza remanentes, en los principales conglomerados industriales y en los distritos comerciales centrales. También existe la contaminación rural, principalmente la proveniente de las actividades agrícolas y



ganaderas, pero sus efectos son menos graves que los de las áreas urbanas. (Nevel B., Wriath, 1999)

Bioteología

La bioteología es una actividad definida en términos generales como el uso de seres vivos, sus procesos o sus partes para la obtención de bienes y/o servicios, y ofrece soluciones reales a los grandes retos a los que nos enfrentamos en la actualidad, tanto en el sector salud como en el agropecuario.

(www.porquebiotecnologia.com.ar/doc/biotecnología/biotec.asp)

También se la podría definir como "toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos".

La bioteología posee enormes e interminables beneficios para ofrecerle a la humanidad. Es considerada la ciencia aplicada de más rápido crecimiento de los últimos tiempos y ha pasado a formar parte de la vida humana como contribuyente de las más importantes áreas, tales como productos químicos e industriales, producción de comidas, protección de cultivos, cuidados de la salud humana, y eliminación y tratamiento de residuos, los cuales son el empuje o la idea central del desarrollo biotecnológico en todo el mundo (Pandey and Banerjee, 2002). Un número de acercamientos biotecnológicos han sido sugeridos por investigaciones recientes con potencial interés hacia la lucha en contra de las fuentes de contaminación de una manera ecoeficiente, incluyendo el uso de bacterias u hongos, a menudo en combinación con procesos fisicoquímicos. (Willmott *et al* , 1998; Mc Mullan *et al* , 2001; Robinson *et al*. 2001a; Borchert and Libra, 2001; Beydilli *et al*. 1998; Zissi and Lyberatos, 2001)



Biorremediación: Organismos que limpian el ambiente

Es un proceso por el cual organismos vivos, normalmente plantas o microorganismos, son utilizados tecnológicamente para remover o reducir (remediar) las concentraciones de contaminantes en el ambiente. Este proceso biotecnológico de remediación ha sido intensamente investigado y recomendado por la comunidad científica como una alternativa viable para el tratamiento de problemas de contaminación en varios tipos de ambientes - incluyendo aguas superficiales y subterráneas, suelos – por residuos y efluentes industriales. (**Casal et al., 2004**)

Aunque otras tecnologías no biológicas sean también utilizadas para descontaminar ambientes contaminados, la biorremediación es la alternativa ecológicamente mas correcta y eficaz para el tratamiento de ambientes contaminados con moléculas de difícil degradación y metales tóxicos. Moléculas de difícil degradación denominadas “recalcitrantes”, pueden ser de origen natural, sintetizadas por el metabolismo biológico, o sintéticas, producidas por la tecnología moderna y extrañas al ambiente natural, por esa razón denominadas “xenobióticas” (*xenos*, del griego: extraño). Las moléculas xenobióticas, introducidas en el ambiente desde el inicio del siglo XX, comprenden compuestos de diferentes clases químicas y categorías de aplicación, incluyendo agrotóxicos, colorantes, fármacos, polímeros y plásticos pudiendo ser tóxicas y/o recalcitrantes, una vez que no formen parte del conjunto de moléculas producidas por el metabolismo evolutivo que propicia la vida en la tierra. Luego, esas moléculas xenobióticas pueden acumularse en el ambiente y acarrear serios problemas de contaminación. Por esta razón, hay actualmente una gran preocupación que se desarrollen tecnologías de biorremediación para descontaminar los ambientes contaminados con xenobióticos. (**Borém, A. 2005**)

Tipos de biorremediación

En los procesos de biorremediación generalmente se emplean mezclas de ciertos microorganismos (remediación microbiana) o plantas (fitorremediación) capaces de degradar o acumular sustancias contaminantes tales como metales pesados y compuestos orgánicos derivados de petróleo o sintéticos. Sin embargo también pueden utilizarse únicamente las enzimas responsables de estos procesos (degradación enzimática). (Figura 1).



Figura 1: Diferentes modos de biorremediación. Tomado de www.porquebiotecnologia.com.ar. **Los Hongos y el Ambiente**

Dentro del Reino *Fungi* se encuentra una gran variedad de organismos eucariotas que se han adaptado a distintos ambientes, los hongos xilófagos se restringen mayoritariamente al *Phyllum* Basidiomicetes (**Lobos et al., 2001**)

Los hongos son reconocidos por sus aptitudes superiores para producir una gran variedad de proteínas extracelulares, ácidos orgánicos y otros metabolitos, y por su capacidad para adaptarse a medios ambientes severos, sin restricciones. (**Lilly & Barnett, 1951; Cochrane, 1958**)

Más allá de la producción de tales metabolitos, los hongos han llamado la atención con creciente interés por el biotratamiento (eliminación o destrucción) de ingredientes de aguas contaminadas tales como metales, nutrientes inorgánicos y componentes orgánicos. (**Field et al., 1993; Feijoo and Lema, 1995; Palma et al., 1999; Coulibaly, 2002**)

De todos los químicos orgánicos producidos naturalmente, la lignina es probablemente el más recalcitrante. Esto es consistente con su función biológica, la cual es brindar a las plantas vasculares la rigidez necesaria para su postura vertical y para proteger sus polisacáridos estructurales (celulosa y hemicelulosa) del ataque de otros organismos. (**Crawford, 1981**)

Los organismos principalmente responsables de la degradación son hongos filamentosos, y los mejores degradadores en este grupo son los basidiomicetes. (**Kirk and Farrell, 1987**)



Los hongos degradadores de lignina son clasificados dentro de tres categorías basadas en el tipo de descomposición de la madera que producen estos organismos: hongos de pudrición blanca, hongos de pudrición marrón y hongos de pudrición blanda. **(Boominathan and Reddy, 1992)**

Los hongos de pudrición marrón comprenden un relativamente pequeño grupo de basidiomicetes que descomponen preferencialmente la celulosa de la madera. Estos no degradan la lignina extensamente, aunque la modifican por demetilación de la misma.

Los hongos de pudrición marrón producen una importante contribución en la descomposición de la madera, especialmente en bosques de coníferas **(Dix and Webster, 1995)**, y la modificación residual de la lignina dejándola como un importante precursor del humus **(Hudson, 1986)**.

Los hongos de pudrición blanda son Ascomicetes y Deuteromicetes que descomponen maderas saturadas de agua, más bien maderas propensas a fluctuar su régimen de humedad.

Los hongos de pudrición blanda son descomponedores más lentos y menos agresivos que los hongos de pudrición marrón y los hongos de pudrición blanca, y son, probablemente descomponedores menos importantes en sentido cuantitativo. **(Dix & Webster, 1995)**.

Los hongos de pudrición blanca son los que presentan el principal interés para ser usados en varios procesos utilizando lignocelulosa, debido a su capacidad para degradar a la lignina. La mayoría de los hongos de pudrición blanca degradan a la celulosa y a la hemicelulosa en adición a la lignina. **(Blanchette, 1991; Daniel, 1994; Eriksson et al., 1990)**

Sin embargo esta variabilidad es sustancial, entre especies y entre cepas de las especies, en la suma y en la secuencia en que cada componente se la pared celular es degradado.

Algunos de los hongos de pudrición blanca degradan preferencialmente a la lignina y algunos a la hemicelulosa, pero no eliminan mucho a la celulosa. **(Blanchette, 1991)**

De estos tres grupos, los hongos de pudrición blanca son los más efectivos degradadores de lignina y ha sido el grupo más extensivamente estudiado.

En este grupo el modelo de organismo mas comúnmente usado en estudios de biodegradación de lignina son las cepas de *Phanerochaete chrysosporium*. **(Boominathan & Reddy, 1992)**

Los hongos de pudrición blanca comprenden una colección heterogénea de varios miles de especies de basidiomicetes. **(Ainsworth et al, 1973)**



Como se mencionaba anteriormente, los hongos de pudrición blanca, los responsables de la biodegradación de la lignina en la madera, son extraordinarios en su habilidad para degradar una gran variedad de contaminantes medioambientales. (**Bumpus *et al.*, 1985; Bumpus & Aust 1986; Aust 1990**)

Químicos insolubles, generalmente recalcitrantes, son mineralizados por estos hongos. También mineralizan (oxidando a CO₂) algunos químicos que se hallan ya altamente oxidados.

En general se piensa que esta habilidad biodegradativa esta relacionada con la habilidad que poseen estos hongos para degradar a la lignina. Esta habilidad, a la cual nos referimos, la cual es única en lo hongos de pudrición blanca, se piensa que dependen de una familia de peroxidasas secretadas por el hongo. (**Tien & Kirk 1983**)

Lignina: Nociones Básicas de su Estructura

El término lignina deriva del latín “lignum” que significa madera. Es uno de los tres componentes esenciales de la madera junto con los carbohidratos y extraíbles (**Sjostrom, 1981**). La lignina es un polímero heterogéneo compuesto por unidades metoxiladas de fenilpropano que se encuentra formando parte de los tejido vasculares de las plantas superiores, a las que proporciona soporte estructural, impermeabilidad y resistencia frente al ataque microbiano y al estrés mecánico (**Higuchi, 1990**)

Aunque la estructura exacta de la lignina se desconoce, los nuevos métodos analíticos de identificación de productos de hidrólisis y métodos espectroscópicos han permitido conocer muchas características estructurales de este polímero (**Addler, 1977**)

La síntesis de este polímero se produce por la unión de radicales fenoxi que se originan en la oxidación enzimática de alcoholes precursores (**Kirk & Farrell, 1987**)

Biosintéticamente, la lignina proviene de tres alcoholes precursores: el alcohol *p*-hidroxicinamílico (cumarílico), el alcohol 4-hidroxi-3-metoxicinamílico (coniferílico) y el alcohol 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinamílico (sinapílico). La copolimerización por radicales libres de estos alcoholes, iniciada por peroxidasas vegetales, da lugar al polímero de lignina (**Kirk & Farrell , 1987**). Químicamente este polímero es heterogéneo, amorfo, ópticamente inactivo y altamente ramificado (**Fritsche & Hofrichter, 1999**)

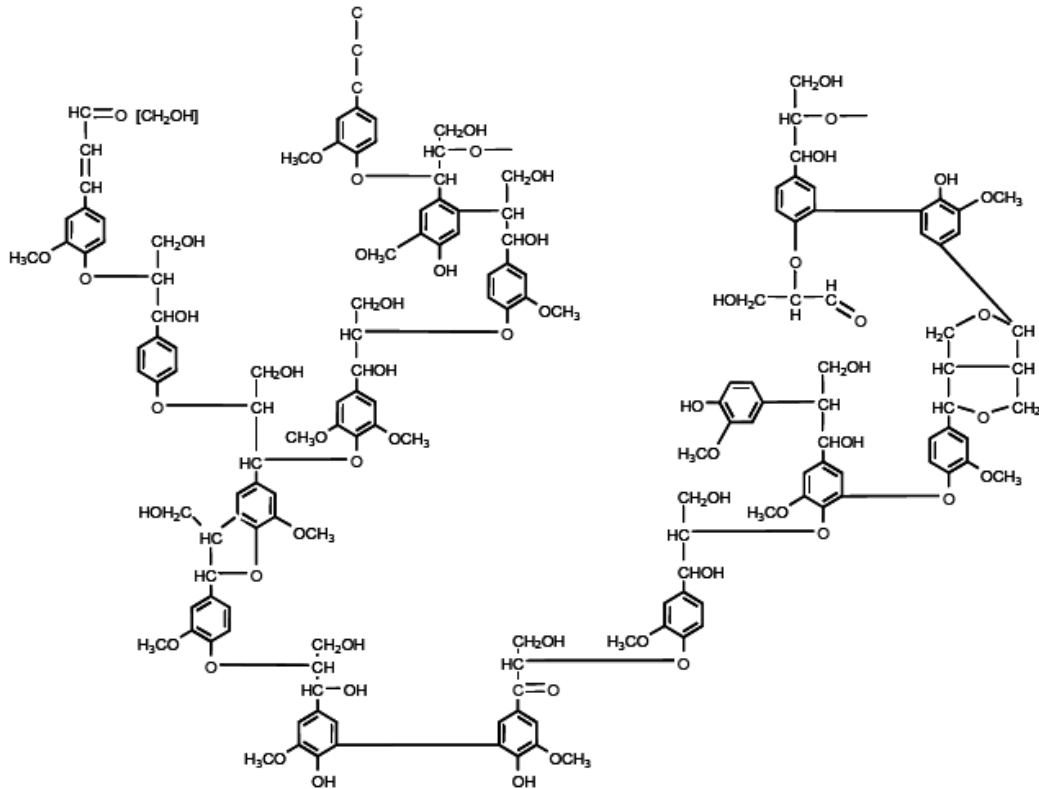


Figura 2: Estructura parcial de la lignina. (G. Dávila; R Vázquez-Duhalt, 2006)

Las características estructurales de este heteropolímero vegetal imponen ciertas restricciones para su biodegradación. Definiendo a una molécula de lignina con un peso molecular de entre 600-1000 kDa, es evidente que su tamaño le impide poder ser degradada intracelularmente (Kirk & Farrell , 1987). Además, por el tipo de enlaces covalentes que presenta (aril-éter, aril-aril y carbono-carbono) y su heterogeneidad, no puede ser degradado por mecanismos típicos de hidrólisis (Fengel & Wegener, 1989). Por lo tanto, cualquier enzima o grupo de enzimas capaces de atacar inicialmente la lignina, deben ser además de extracelulares, no hidrolíticas y bastante inespecíficas (Kirk & Farrell, 1987) .

Sistema Enzimático presente en los Hongos

El sistema enzimático de degradación de la lignina de los hongos de pudrición blanca es extracelular y excepcionalmente inespecífico. Las peroxidasas y peróxido de hidrógeno secretados por el hongo catalizan reacciones de los radicales libres, resultantes de la despolimerización y degradación de la lignina. Aunque la lignina es naturalmente un



polímero altamente oxidado, puede eventualmente, ser completamente oxidada a dióxido de carbono por los hongos de pudrición blanca. **(Steven & Benson, 1993)**. Esta propiedad esta basada en que los hongos de pudrición blanca poseen la capacidad de producir una o mas de estas enzimas extracelulares, las cuales, gracias a su baja especificidad de sustrato, son capaces de degradar un amplio rango de componentes xenobióticos.

Los hongos de pudrición blanca producen varias isoformas de oxidasas extracelulares, incluyendo Lacasa (Lac), Manganese peroxidasa (MnP), y Lignina peroxidasa (LiP), las cuales están involucradas en la degradación de la lignina en sus sustratos lignocelulósicos naturales. **(Wesenberg et al., 2003)**

Algunos de los hongos de pudrición blanca producen todas estas enzimas, mientras que otros hongos producen únicamente algunas de ellas. **(Hatakka, 1994)**

A partir de los estudios realizados con hongos ligninolíticos en los años setenta, se comprobó que la degradación de la lignina daba lugar a productos que provenían de la ruptura oxidativa de anillos aromáticos. Por lo que se pensó que las oxigenasas extracelulares podían estar involucradas en la transformación de la lignina **(Kirk & Chang, 1975)**. Algunos años después, tres grupos reportaron de manera independiente, el descubrimiento de una ligninasa capaz de oxidar y despolimerizar la lignina y compuestos modelo, con una actividad enzimática dependiente del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) **(Glenn et al., 1983; Shimada & Higuchi, 1983; Tien & Kirk, 1983)**. Se estimaron pesos moleculares de entre 41-42 kDa y se encontró que contenía un grupo prostético hemo. **(Tien & Kirk, 1984)**. A esta enzima se la denomina actualmente lignina peroxidasa (LiP). A partir de este hallazgo, se encontró la producción de otra hemoperoxidasa, la manganese peroxidasa (MnP) que oxida el Mn^{2+} a la especie oxidante Mn^{3+} **(Glenn J.K; Gold M. H. (1985)**.

Además de estas peroxidases, se detectó la producción en estos hongos ligninolíticos de otra enzima, una fenol oxidasa denominada lacasa (Lac). Esta enzima reduce el oxígeno molecular a agua, y a través la utilización de ciertos compuestos rédox puede ser capaz de ampliar su espectro de sustratos, logrando así la oxidación de porciones no fenólicas de la lignina **(Bourbonnais & Paice, 1990)**.

Además de estos sistemas enzimáticos, se ha considerado que la participación de compuestos de bajo peso molecular es también esencial en la degradación de la lignina. Esto se postula debido a que la lignina en su estado natural es inaccesible para enzimas



tales como la LiP y MnP. Entre los cofactores importantes para la transformación de la lignina se encuentran el manganeso, el alcohol veratrílico, el oxalato y el 2-cloro-1,4-dimetoxibenceno. (Have & Teunissen, 2001)

La actividad de estas enzimas puede ser incrementada por el uso de mediadores como el ABTS (2,2'-azino-bis[3-etilbenziazolina-6-ácido sulfónico]), e intermediarios de la degradación de la lignina entre los que se encuentra el alcohol veratrílico (Bourbonnais, 1995; Johannes, 1996; Majcherczyk, 1999), así como iones metálicos como Mn^{+2} para la enzima MnP y Cu^{+2} para la enzima Lac (Galhaup & Haltrich, 2001; Kirk & Farrell, 1987)

Estructura molecular de las principales enzimas lignolíticas

Lignino peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP):

Estas enzimas comparten la estructura del grupo prostético férrico protoporfirina IX (grupo hemo) presente en su sitio activo. Normalmente en las hemo-peroxidasas, el átomo de hierro se encuentra penta coordinado. Cuatro posiciones de coordinación son ocupadas por los átomos de nitrógeno de los anillos pirrólicos. La quinta posición se localiza en el lado proximal del grupo hemo y es comúnmente ocupada por un nitrógeno perteneciente al anillo imidazol de un residuo de histidina. La sexta posición de coordinación en la enzima en su estado basal está vacante y se ubica en el lado distal del grupo hemo. Esta cavidad distal es la región en la que ocurren muchas de las reacciones de las hemoperoxidasas.

A pesar de la baja homología en secuencia entre diversas peroxidasas (menor al 20%) el plegamiento y la estructura secundaria se encuentran conservados. (Banci, 1997)

La enzima se divide en dos dominios estructurales (proximal y distal) que envuelven al grupo prostético (Figura 3) y su estructura está conformada principalmente por 10 a 11 α -hélices.

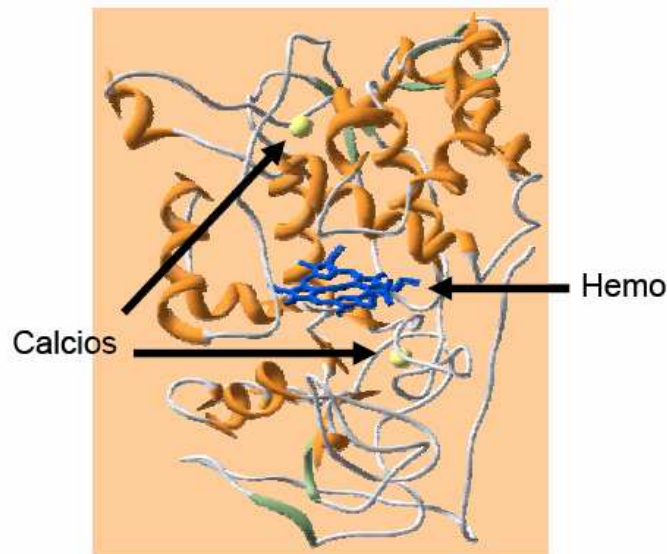


Figura 3: Modelo molecular teórico de la MnP de *Pleurotus eryngii*. Se muestran las posiciones de las α -hélices, del grupo hemo, del Mn^{2+} y las posiciones C y N terminal.

Lacasa (Lac):

Las fenoloxidasas son enzimas que catalizan la oxidación de un amplio espectro de compuestos fenólicos y aminas aromáticas utilizando el oxígeno molecular como aceptor de electrones, reduciéndolo a agua. (**Shah & Nerud, 2002**)

La lacasa fúngica (bencendiol: oxígeno oxidorreductasa) es una fenoloxidasa extracelular producida por el micelio de basidiomicetos, ascomicetos y deuteromicetos (**Bollag & Leonowicz, 1984**), siendo los mejores productores de estas enzimas los hongos ligninolíticos. (**Leonowicz et al., 2001**)

Esta enzima contiene átomos de cobre y se encuentra ampliamente distribuida en las plantas superiores, diversas clases de hongos y algunas bacterias. (**Gianfreda et al., 1999**)

Todas las lacasas son glicoproteínas extracelulares (**Reinhamar, 1984**) con pesos moleculares entre 60 y 80 kDa, correspondiendo del 15 al 20% de su peso molecular esta dado por carbohidratos (**Shah & Nerud, 2002**).

Bioquímicamente, la lacasa es una enzima que oxida una variedad de compuestos aromáticos. Cataliza la remoción de un electrón y un protón de hidroxilos fenólicos o de grupos aminos aromáticos, para formar radicales libres fenoxilo y radicales amino, respectivamente. Este grupo de enzimas, posee cuatro átomos de cobre en su estado de oxidación $^{2+}$ que les confieren una coloración azul.



Esta enzima oxida no solamente ácidos fenólicos y metoxifenólicos, sino que también los descarboxila (**Agematu et al., 1993**) y ataca sus grupos metoxilo mediante la desmetilación (**Leonowicz et al., 1984**) o desmetoxilación (**Potthast et al., 1995**). Todas estas reacciones pueden representar un paso importante en la transformación inicial de la lignina.

La lacasa también reacciona con polifenoles y otros compuestos aromáticos derivados de la lignina, los cuales, pueden ser polimerizados o despolimerizados, o incluso actuar como mediadores rédox de bajo peso molecular (**Bourbonnais et al., 1995**). La utilización de sistemas mediador-lacasa es una alternativa promisorio para procesos biotecnológicos con aplicaciones ambientales. Entre ellos, los de blanqueo de la pulpa de papel (**Bourbonnais et al., 1995; Li et al., 1998**), la decoloración de colorantes textiles (**Reyes et al., 1999; Rodríguez et al., 1999**) y la oxidación de hidrocarburos polinucleoaromáticos (**Bohmer et al., 1998; Pickard et al., 1999a; Vandertol-Vanier et al., 2002**).

La regulación de la expresión de genes de la lacasa difiere de un organismo a otro, reflejando probablemente las diferentes funciones fisiológicas de estas enzimas en los hongos. La expresión de genes de lacasa es constitutiva en algunos hongos, mientras que en otros, la expresión es sensible a las condiciones del medio de cultivo y es afectada por las concentraciones de nitrógeno y las fuentes de carbono. (**Collins & Dobson, 1997; Mansur et al., 1998**)

La expresión constitutiva es a menudo aumentada por inductores. El incremento en la transcripción de lacasa en respuesta a componentes aromáticos, tales como el 2,5-xylidine, ha sido reportado para genes de lacasa de, por ejemplo; *Trametes versicolor* (**Yaver et al., 1996**), *Trametes villosa* (**Smith et al., 1998**), y *Agaricus bisporus*. (**Johannes et al., 1996**).

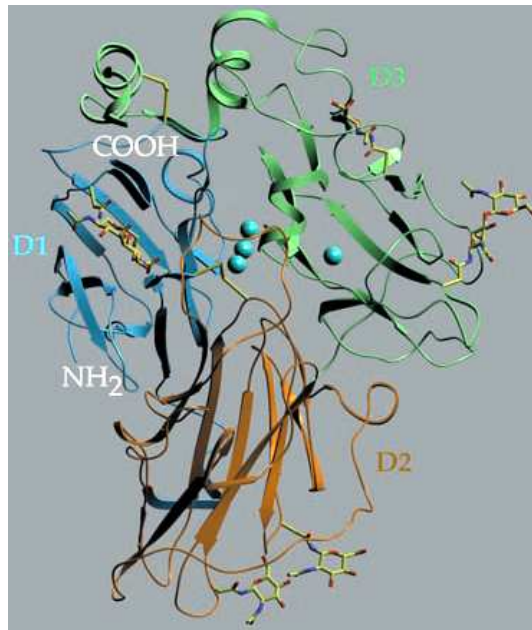


Figura 4: El arreglo de los dominios estructurales están representados en diferentes colores (D1–D3). Los iones de cobre están representados como esferas azules. Los enlaces carbohidratos y disulfuros están incluidos en modelo de ramas. (96 cita)

Posibles aplicaciones y usos de las enzimas

Los hongos de pudrición blanca son los reguladores claves en el ciclo global del carbono. Sus enzimas, lignino peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y lacasa (Lac) se hallan directamente involucradas, no solo en la degradación de la lignina en sustratos lignocelulíticos naturales (Becker & Sinitsyn, 1993; Hatakka, 1994), sino también en la degradación de varios componentes xenobióticos (Barr & Aust, 1994; Pointing, 2001; Scheibner *et al.*, 1997) incluyendo a los colorantes. (Glenn & Gold, 1983; Pasti-Grigsby *et al.*, 1992; Paszczynski *et al.*, 1992; Spardaro *et al.*, 1992)

Como se ha indicado previamente, gracias a su inespecificidad enzimática, estos hongos son capaces de transformar un extenso rango de componentes orgánicos. Ante todo, la decoloración de colorantes poliméricos sulfonados fueron usados para ensayos de actividad lignolítica (Glenn & Gold, 1983, Freitag & Morrell, 1992) y para evaluar las capacidades biodegradativas de los hongos de pudrición blanca. (Field *et al.*, 1993; Cripps *et al.*, 1990)

Posteriormente, numerosas cepas de hongos de pudrición blanca fueron usados para la decoloración de distintos colorantes textiles sintéticos y de efluentes sintéticos, como los



generados por mezcla de colorantes. (**Jarros-Wilkolazka et al., 2002; McMullan et al., 2001**)

Los hongos de pudrición blanca son también capaces de degradar una extensa variedad de contaminantes medioambientales a dióxido de carbono, incluyendo un número de contaminantes clorados tales como el DDT [1,1,1-Tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)-etano], Lindano (1,2,3,4,5,6-hexachlorociclohexano), Clordano (1,2,4,5,6,7,8,8 - octacloro - 3a,4,7,7a-tetrahidroindano), Bifenilos policlorados, 2,3,7,8-TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxina) y 3,4 dicloroanilina. (**Aust and Bumpus 1987; Sutherland et al. 1991; Yadav and Reddy 1993; Barr and Aust 1994; Fernando et al. 1989**)

Para la producción de pulpas celulósicas se utilizan materias primas fibrosas y no fibrosas. La presencia de residuos de lignina afecta negativamente algunas de las propiedades de la fabricación de la pulpa y productos del papel. Por eso la lignina es selectivamente extraída durante el pulpado, sin la significativa degradación de las fibras de celulosa. La eliminación de la lignina depende en gran medida, tanto del proceso de pulpado como de la materia prima utilizada. Entre las alternativas para la producción de pulpa, los llamados procesos Kraft y a la soda, son los más comunes. En estos procesos se genera un considerable volumen de efluentes contaminantes (licor negro).

El licor negro es caracterizado por su elevada alcalinidad y el elevado contenido de sólidos disueltos, principalmente álcali-lignina y productos de degradación de polisacáridos. Si el licor negro no es incinerado en unidades de recuperación, se convierte en un efluente significativo. El impacto medioambiental del licor negro, resulta no solo de su naturaleza química, sino también de la coloración oscura que reduce la disponibilidad de oxígeno y afecta negativamente a la fauna y flora acuática. (**Jones, 1973**)

Como se ha mencionado, las enzimas ligninolíticas producidas por los hongos de la pudrición blanca son catalizadores poco específicos, que incluyen peroxidasas y lacasas. En ambos casos el mecanismo de reacción involucra la formación de radicales libres. Estas dos características son muy buenas para fines ambientales ya que son capaces de oxidar una gran diversidad de compuestos orgánicos con estructuras químicas diversas.

Por otro lado en algunos casos la producción a gran escala, no parece representar un reto mayor. Sin embargo su clonación y expresión heteróloga es aún difícil y no se ha logrado más que la obtención de un número limitado de enzimas ligninolíticas. Esto último limita las posibilidades de realizar modificaciones moleculares con el objetivo de incrementar el



potencial catalítico y especialmente la estabilidad operativa de las enzimas. (**G. Dávila; R Vázquez-Duhalt, 2006**)



OBJETIVOS

Objetivo General

Analizar el efecto del cobre como inductor en la producción de la enzima Lacasa del hongo *Trametes villosa*.

Objetivos particulares

Analizar el comportamiento del hongo *Trametes villosa* en distintos medios de cultivo primario.

Determinar el potencial degradativo del hongo *Trametes villosa* sobre los colorantes azul de bromofenol y verde de malaquita.

Cuantificar la actividad de la enzima lacasa producida por el hongo *Trametes villosa* en medio líquido con y sin estimulación con sulfato de cobre (CuSO_4).

Establecer la relación entre la cantidad de proteínas totales secretada y la actividad lacasa en medio líquido.

Amplificar una región génica perteneciente al dominio conservado de unión al Cu, para los genes de lacasa del hongo *Trametes villosa*.

Determinar de manera semicuantitativa los niveles relativos de mRNA para lacasa para el hongo *Trametes villosa* con y sin estimulación con sulfato de cobre (CuSO_4).

Evaluar la potencial aplicación biotecnológica del hongo *Trametes villosa* mediante ensayos de degradación del efluente licor negro.



MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 El modelo biológico

Los hongos utilizados en estos estudios, *Trametes villosa* BAFC 2755 y *Pycnoporus sanguíneus* (L.:Fr.) Murr. BAFC 2126 (tomado como patrón de referencia debido a su comprobada capacidad lignolítica) provenientes del cepario del Laboratorio de Biotecnología Molecular, los cuales fueron previamente provistos por el Departamento de Micología Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

Trametes villosa posee un basidioma de 12-32 x 10-20 x 1-2 mm., es anual y sésil. Su píleo es gris, de color café claro a café oscuro hacia la base, con tintes verdosos debido a la presencia de algas.

Su himenóforo es blanco, de color crema, amarillo, café tabaco, café oscuro, casi negro. Contexto de hasta 1 mm. de grosor, de color blanco. (90).



Figura 3.1 *Trametes villosa*



Reino: *Fungi*

Phyllum: *Basidiomycota*

Clase: *Agaricomycetes*

Orden: *Polyporales*

Familia: *Coriolaceae*

Género: *Trametes*

Especie: *Trametes villosa*

Figura 3.2 Ubicación taxonómica del organismo en estudio *Trametes villosa*

Fuente: Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI)

3.2 Preparación de los tacos

Para la preparación de tacos se utilizaron cultivos primarios en medio agar/extracto de malta (MEA), en placas de Petri de 100 mm de diámetro, las cuales fueron inoculadas por punción con ansa aguja en el centro de la placa, con el microorganismo en estudio. Se dejó incubar durante 5-7 días a 29 ± 1 °C en estufa.

Este tiempo fue suficiente como para obtener una colonia de tamaño considerable para la generación de tacos de micelio destinados a la siembra del resto de los experimentos.

Los tacos de agar con micelio se extrajeron a partir de los márgenes de la colonia en crecimiento con la ayuda de un sacabocados de metal, de forma cuadrangular de 36mm² de diámetro.

Los tacos obtenidos de este modo fueron utilizados la para la inoculación de los medios de cultivo sólidos así como también para los medios de cultivo líquidos.



En el caso de los medios de cultivo sólidos, se procedió a colocar un taco con micelio en el centro de cada placa de Petri con cada medio de cultivo utilizado, mientras que para los medios de cultivo líquidos, se transfirió un taco a un Erlenmeyer de 250 mL conteniendo dicho medio.

3.3 Medios de cultivo sólido

Los medios de cultivo sólidos utilizados para los ensayos fueron:

AMG(*): extracto de malta 12,7 g/L; agar 20 g/L y glucosa 10 g/L (Britania).

ASAB (agar/ Sabouraud): agar 18 g/L; peptona de carne 10 g/L; glucosa 40 g/L. (Britania).

Licor negro glucosado (LN): agar 20 g/L; glucosa 10 g/L (Britania) y el licor negro dilución de 1:15 (v/v), a pH 11 y pH 4,7. El licor negro es el efluente proveniente de industria celulósica-papelera, resultante del proceso de cocción de maderas de eucaliptos, realizado en la planta piloto de la FCEQyN de la U.Na.M.

(*) Este medio se preparó de acuerdo al manual de Micología Experimental de la UBA.

3.4 Medio de cultivo líquido

Los ensayos en medio de cultivo líquido fueron llevado a cabo en Erlenmeyers de 250 mL de capacidad a los cuales se les adicionó 50 mL de medio compuesto por 12,7 g/L de extracto de malta, 0,5% de concentrado soluble de maíz (**Mouso *et al*, 2003**) y agua destilada..

Estos medios fueron inoculados e incubados a 29 ± 1 °C en estufa de manera estática en aerobiosis durante un período de tiempo comprendido entre 5, 7, 10 y 14 días, en todos los casos por duplicado.

En cada uno de los días antes mencionados se procedió a la separación del micelio del medio de cultivo líquido por medio de filtración mediante Büchner, con filtros de fibra de



vidrio (GF/C) previamente secados en estufa a 80 °C durante 30 minutos, en cada filtración se utilizaron 5 mL de agua destilada para enjuagar.

Los sobrenadantes fueron congelados y posteriormente utilizados para la determinación de la actividad enzimática (**D'Souza *et al*, 1996**).

Los micelios resultantes de la filtración fueron congelados para luego proceder a la extracción de ADN de los mismos.

3.5 Los colorantes utilizados en los ensayos

Los colorantes utilizados para los ensayos en los medios sólidos fueron el verde de malaquita y el azul de bromofenol, ambos provistos por Bronfield, debido a su ya probada eficacia para estos ensayos (**Shimizu *et al*. 2006; Velez Rueda *et al*. 2007**).

3.6 Degradación en medio sólido

Los ensayos de degradación en medio sólidos fueron llevados a cabo en los medios AMG y en el medio ASAB por duplicado con y sin colorantes. La concentración de colorantes utilizada fue de 50 µM. (**Wolfaardt *et al*, 2004**)

Para controles de crecimiento se tomaron los medios de cultivos inoculados sin colorantes. Para control negativo de degradación los medios de cultivos con colorantes pero sin el inóculo respectivamente.

También se llevaron a cabo ensayos de degradación en medios de cultivo conteniendo el efluente licor negro, en las condiciones mencionadas anteriormente.

3.7 Determinación de la actividad enzimática

La determinación de la actividad enzimática para lacasa se realizó a partir de los sobrenadantes congelados obtenidos por filtración. Para ello primeramente se procedió al descongelamiento de los mismos llevándolos a temperatura ambiente. Posteriormente se determinó la variación de la absorbancia del sustrato DMP (2,6-dimetoxifenol) adicionado a cada muestra, evidenciado mediante la utilización de un espectrofotómetro 8500 II *Techcomp* siguiendo la técnica propuesta por **Field *et al*, 1993**.



La actividad enzimática se expresa en **Unidades Internacionales (UI)**: $\mu\text{moles}/\text{min} \times \text{mL}$.

Una UI es equivalente a 1 μmol de producto formado o sustrato degradado, por minuto.

Los valores obtenidos para la actividad enzimática se obtuvieron a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{UI } (\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mL}) = \frac{\text{Abs.} \times 2,5 \text{ mL (vol. de reacción)}}{\epsilon \times \text{tiempo de incubación (min)} \times \text{vol. enzima (mL)}}$$

Donde ϵ = coeficiente de extinción molar

Técnica de determinación de la actividad de Lacasa (Field *et al*)

Sustrato: 2,6-dimetoxifenol (DMP), provisto por Fluka Chemie, a 5 mM (77,1 mg/ 100

mL buffer acetato), pH 3,6

Reacción:

- ▶ 2,5 mL en cada tubo
- ▶ 5 minutos en baño a 30 °C
- ▶ Transcurrido ese tiempo se agrega 50 μL del sobrenadante (solución conteniendo a las enzimas)
- ▶ Se incuba los minutos necesarios
- ▶ Se lee en espectrofotómetro a 469 nm.
- ▶ El blanco es el reactivo solo
- ▶ $\epsilon_{469} = 27,5 \text{ mM cm}$.

Zimograma

Veinte ng de proteínas totales se separaron mediante electroforesis no desnaturizante en geles de poliacrilamida al 7,5% (ND-PAGE) determinándose la actividad enzimática de lacasa mediante una solución de 2,6-dimetoxifenol a 5 mM en buffer de acetato de sodio 0,1 M **Manchenko P.** (1994). Los geles fueron escaneados inmediatamente mediante Scanner HP Deskjet F300 All-in-One series.



3.8 Extracción de ADN

Para proceder a la extracción del DNA se utilizaron los micelios congelados que fueron obtenidos anteriormente por medio del filtrado de los medios líquidos. Estos micelios fueron trozados y luego macerados con nitrógeno líquido hasta obtener un fino polvo. Luego se procedió a llevar a un volumen final de 800µl con 640 µl de buffer de extracción conteniendo Tris 100 mM; EDTA 50 mM y ClNa 500 mM, 80 µl SDS (10x), 80 µl CTAB (20%) y 5 µl de proteinasa K 1 mg /mL.

Para la digestión se incubaron las muestras durante 45 a 60 minutos a 65 ° C agitándolas con vórtex cada 10 minutos. Posteriormente se hicieron 2 lavados con cloroformo - isoamílico 24:1 a un volumen final de 1,5 mL. Se centrifugó la muestra durante 10 minutos a 10000 rpm.

Para precipitar las proteínas se le adicionó 150 µl de acetato de potasio 3 M frío. Luego de esto se centrifugó la muestra durante 5 minutos a 12000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un tubo cónico nuevo. A este sobrenadante se le adicionó 1 mL de isopropanol y se lo dejó en freezer a – 20 ° C durante toda la noche.

Posteriormente se centrifugó la muestra durante 5 minutos a 12000 rpm, se descartó el sobrenadante y se le adicionó 1 mL de etanol al 70%. Se volvió a centrifugar a 12000 rpm durante 5 minutos y se le extrajo todo el alcohol y se dejó secar la muestra a temperatura ambiente.

Luego de secada la muestra se la resuspendió en agua destilada estéril y se la conservó a – 20 ° C hasta el momento de su utilización.

Para corroborar la eficacia de la técnica utilizada para la extracción y la calidad del material genético extraído se corrieron las muestras en geles de agarosa al 1% con tampón TBE, teñidos con bromuro de etidio (BrEt) y luego fotografiados con cámara digital sobre luz UV.

Además las muestras fueron analizadas en espectrofotómetro a 280 nm.

3.9 Amplificación de un fragmento génico por medio de la técnica PCR

Para llevar a cabo la reacción en cadena de la enzima polimerasa (PCR) se utilizaron 10 pmoles de cada cebador (sentido y antisentido), 10 mM de dNTPs, 1,5 mM de



Cl₂Mg y 1 U de Taq Polimerasa en buffer al 1 x, además de agua deionizada para llevar a volumen de reacción deseado.

El programa de ciclado utilizado fue el siguiente:

- ▶ Un ciclo a 94 °C por 2 minutos
- ▶ 35 ciclos de 15 segundos a 94 °C, 56 °C y 72 °C respectivamente.
- ▶ 2 minutos a 72 °C como paso de finalización de la reacción.

Los resultados de la amplificación fueron corroborados por electroforesis en geles de agarosa a una concentración del 2% utilizando una cuba electroforética (Sub System 70 de Labnet International Inc.), teñidos con Bromuro de Etidio (BrEt) y fotografiados con cámara digital marca ACER.

Los cebadores utilizados en esta técnica fueron diseñados en base a secuencias conservadas en la región de unión al cobre del extremo amino y publicados por D'Souza *et al.*, 1996, para las lacasas de otros basidiomicetes. El diseño se basó en la deducción de la secuencia aminoacídica de la enzima y contemplando las variables que pudieran presentarse al considerarse la hipótesis del balanceo

La secuencia de los cebadores utilizados es la siguiente:

LacA – sentido 5`- CAYTGGCAYGGNTTYTTYCA

LacA – antisentido 5`- RTGRCTRTGRTACCARAANGT

La codificación utilizada de acuerdo a la nomenclatura internacional IUPAC fue la siguiente:

R = A / G

Y = C / T

N = A / C / G / T



Estos cebadores fueron además evaluados mediante el programa bioinformático Primer3 dando resultados aceptables en cuanto a autocomplementariedad y formación de dímeros se refiere.

Las bandas amplificadas con los cebadores degenerados fueron purificadas y secuenciadas. El análisis de la secuencias se realizó mediante el programa BLASTn.

3.10 Medición de proteínas totales

Para la medición de las proteínas totales de las muestras se utilizó la técnica de Bradford (Bio-Rad Protein Assay) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Este ensayo esta basado en el equilibrio de tres formas del colorante Azul de Coomassie G, el cual es componente del reactivo. Bajo condiciones ácidas, el colorante es mas estable de forma doble protonada de color rojo. Cuando este se une a las proteínas, sin embargo, es mas estable en su forma desprotonada, dando una coloración azul.

Técnica Bradford: Proteínas de sobrenadante:

- Reacción:

- ▶ Se toman 2,5 ml de reactivo de Bradford + alícuota de sobrenadante para un buen rango de lectura.
- ▶ Se agita y se lee inmediatamente a 595 nm contra blanco de Bradford solo.
- ▶ La curva patrón se construye con una solución patrón de BSA (Albúmina de Suero Bovino) 1 mg/ml de agua.
- ▶ Se agrega a los 2,5 mL de reactivo 10, 20, 30 hasta 60 o 70µl de solución de BSA y se leen las absorbancias. El factor es la inversa de la pendiente de esa curva patrón. ($Abs * patrón = \mu g$ de proteínas en los μl usados).
- ▶ Los resultados se expresan como μg de proteínas por volumen (de sobrenadante por ej.)

Bio-Rad Protein Assay: (microensayo utilizado)

- ▶ Preparar 3 a 5 diluciones de la proteína estándar, la cual es representativa de la solución proteica a ser testada.
- ▶ Pipetear 800µl de cada muestra estándar en solución dentro de un tubo limpio. Trabajar por duplicado o triplicado.



- ▶ Adicionar 200µl de reactivo (Bradford) en cada tubo y agitar con vórtex.
- ▶ Incubar a temperatura ambiente entre 5 minutos y no mas de una hora.
- ▶ Medir la absorbancia a 595 nm

a) Estandarización de la curva de albúmina

- ▶ Partiendo de una solución de BSA a una concentración de 1mg/ml se realizaron diluciones seriadas decrecientes: 50µg/ml; 10 µg/ml; 5 µg/ml; 1 µg/ml y 0,5 µg/ml.
- ▶ El blanco utilizado estaba formado por 200µl de reactivo (Bradford) con 800µl de agua.
- ▶ A cada dilución antes mencionada se le agregaron 200 µl del reactivo (Bradford).
- ▶ Luego de no menos de 5 minutos y no más de 1 hs se leyeron las diluciones con el reactivo a 595 nm en espectrofotómetro para poder confeccionar la curva de referencia.

b) Tratamiento de las muestras

- ▶ Las muestras tratadas correspondieron a los días 5, 7, 10 y 14 de crecimiento respectivamente.
- ▶ Cada día de cultivo presentó muestras sin inductor (CuSO₄) y con el inductor Cu SO₄ a concentraciones de 0,5 mM o 1 mM de Cu SO₄. En todos los casos se trabajó por duplicado.
- ▶ Para este caso el blanco consistió en 800 µl de medio de cultivo sin inocular (extracto de malta-extracto de maíz-agua).

c) Electroforesis en poliacrilamida

Las proteínas procedentes de los filtrados fueron separadas por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) a 150 V por 45 min en geles con una concentración del 10% en poliacrilamida utilizando el sistema MiniProtean 3D de Biorad. Los resultados se visualizaron mediante tinción con plata (22) y se registraron mediante Scanner HP Deskjet F300 All-in-One series.



3.11 Aislamiento de RNA total

Para el aislamiento de RNA total se utilizaron modificaciones del protocolo de extracción de Chomczynski y Sacchi, 1987.

Protocolo para la extracción de RNAs en Hongos:

- ▶ Filtrar el micelio, lavarlo 2 veces con Tris 0,1 M, EDTA 0,02 M en frío.
- ▶ Colocar en un tubo eppendorf (estéril) una porción del micelio lavado.
- ▶ Agregar 500 µl de buffer de lisis (GuSNC 4 M, Tris 0,1 M, EDTA 0,02 M Tritón X 100 1%). Disgregar el micelio con varilla de plástico o vidrio estéril. Incubar 20 min. en frío.
- ▶ Purificar con 200 µl de Fenol saturado en TE, vórtex y centrifugar por 2 min. a 12000 rpm.
- ▶ Purificar con 200 µl de Cloroformo, vórtex y centrifugar por 2 minutos a 12000 rpm.
- ▶ Purificar con Acetato de Potasio 3 M, vórtex y centrifugar por 5 minutos a 12000 rpm.
- ▶ Precipitar con Isopropanol, igual volumen que tomamos de la fase acuosa, dejar 1 h en freezer y luego centrifugar 10 min. a máxima velocidad.
- ▶ Lavar con Etanol absoluto, secar bien y resuspender en agua estéril libre de RNasas.

Con el mismo protocolo de extracción arriba mencionado, se realizaron 2 tratamientos diferentes de purificación, uno de los cuales utilizó únicamente Fenol, y el otro tratamiento utilizó solamente Cloroformo.

Finalizadas las extracciones por los 2 tratamientos diferentes, las muestras fueron medidas en espectrofotómetro a 280 nm y 260 nm para evaluar la cantidad y calidad del RNA aislado. Para ello se diluyeron las mismas en agua estéril en una proporción de 1:10..

Para corroborar las mediciones espectrofotométricas de las muestras, las mismas fueron corridas en gel de agarosa al 0,8 % durante 45 minutos a 5 v/cm.



3.12 Obtención de DNAc a partir de mRNA por medio de RT

Para la obtención de la primera cadena de ADNc a partir de los mRNAs aislados como se detalla en puntos anteriores, se utilizó un protocolo basado en la actividad de la enzima MMLV siguiendo las indicaciones del fabricante con ligeras adaptaciones (Fermentas SRL).

Los tratamientos se realizaron para los días de cultivo; 5-7-10 y 14 en ausencia y en presencia de 1mM de CuSO₄, respectivamente.

El protocolo utilizado consta de 2 pasos:

- A) Digestión del ADN de las muestras
- B) Amplificación de mRNA por RT-PCR.

A) Digestión de ADN que pudiera quedar en la muestra:

- ▶ Colocar la muestra de RNA en agua o buffer (3ug) 1-8 µl.
- ▶ Buffer de reacción1 µl.
- ▶ Enzima RQ1 DNAsa 1u/µg de RNA.
- ▶ Adicionar agua libre de RNAsas hasta llegar a volumen final (Vf) de 10 µl.
- ▶ Incubar las muestras a 37 °C durante 30 min.
- ▶ Adicionar 1 µl de “solución de stop” para terminar la reacción.
- ▶ Incubar a 65 °C durante 10 min. para inactivar a la DNAsa.

B) Retrotranscripción

- ▶ Incubar las muestras a 70 °C durante 10 min.
- ▶ Inmediatamente colocar las muestras en hielo durante 3 min.
- ▶ Adicionar a cada muestra la master-mix de RT-PCR, la cual contiene: H₂O + RNA (10 µl); Oligo (dT) (1 µl); Buffer de reacción (4 µl); dNTP's 5 mM (4 µl); inhibidor de RNAsas “RNAsin” 40u/ µl (0.5 µl); MMLV (1 µl).
- ▶ Volumen final (Vf) de reacción: 20 µl.
- ▶ El ciclado utilizado fue el siguiente:



- ▶ 37 °C 5 min.
- ▶ 42 °C60 min.
- ▶ 70 °C10 min.

3.13 Amplificación de ADNc por PCR

Se realizó una amplificación por PCR con las muestras provenientes de la RT, para evidenciar la presencia de mRNA pertenecientes a la enzima Lacasa.

La master-mix y condiciones de ciclado utilizados fueron los siguientes:

- ▶ H₂O de PCR..... 10,87 µl.
- ▶ Buffer de reacción..... 2 µl.
- ▶ ClMg.....1,6 µl.
- ▶ dNTP´s 5mM.....1,43 µl.
- ▶ Primers: AS.....1 µl.
- S.....1 µl.
- ▶ Taq Pol.....0,1 µl.
- ▶ (*)Muestra.....2 µl.

(*)Para cada muestra de utilizaron 2 µl. de producto de RT-PCR

El ciclado utilizado en esta oportunidad fue el siguiente:

- ▶ 1 ciclo 94 °C.....4 min.
- ▶ 40 ciclos: 94 °C.....20 seg; 50 °C.....20 seg; 72 °C.....20 °C seg.
- ▶ 1 ciclo 72 °C.....4 min.

La secuencia de los cebadores fue la misma que se utilizó para amplificar el ADN.

Los resultados de la amplificación fueron corroborados por electroforesis en geles de agarosa a una concentración del 2% utilizando una cuba electroforética (Sub System 70 de Labnet International Inc.) y luego teñidos con Bromuro de Etidio (BrEt), corridos y fotografiados con cámara digital marca Olympus modelo X-760. Posteriormente fueron secuenciados



3.14 Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado con el programa GraphPad Prism versión 4.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com.



RESULTADOS

4.1 Análisis comparativo de la actividad oxidativa del hongo *Trametes villosa* en medios sólidos:

En los medios sólidos utilizados para el screening de los hongos se observa que la especie *Trametes villosa* (**Figura 5**) como la especie tomada de referencia *Pycnoporus sanguineus* presentan crecimiento y degradación en los colorantes utilizados, azul de bromofenol y verde de malaquita.

Ambas especies fueron cultivadas durante un período de 7 días, comenzando con las mediciones del crecimiento y de la degradación a partir del día 3 consecutivamente hasta concluir en el día 7.

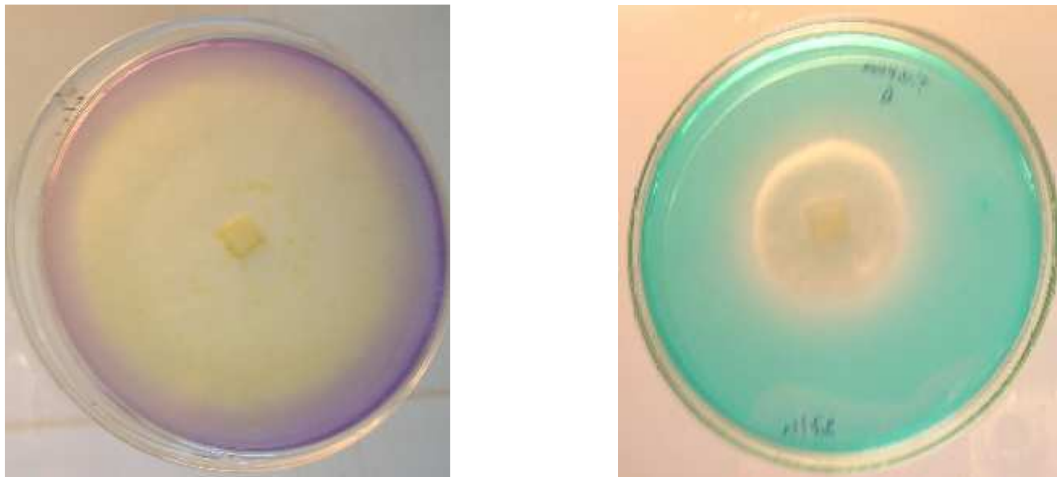


Figura 5: Se observa en la figura evidencia de crecimiento como también de degradación para el hongo *Trametes villosa* en el medio sólido con los colorantes Verde de Malaquita (der.) y Azul de Bromofenol (izq.)

Ensayos de crecimiento y degradación en AMG

La especie *Trametes villosa* en el medio AMG presentó un crecimiento con una tendencia casi lineal, en presencia del colorante Azul de Bromofenol (AB), como se observó también para el crecimiento en el medio sin color. (Control positivo) Mediante la utilización del programa GraphPadPrism (Two-way ANOVA test) se pudo observar que los valores obtenidos no son significativos, por lo que se podría decir que no existen diferencias para el crecimiento entre ellos.



En cuanto al crecimiento en el medio AMG con el colorante Verde de Malaquita (VM) se ha podido observar mediante la utilización del mismo programa estadístico, que las diferencias son significativas, es decir que existen diferencias para el crecimiento entre el control positivo y el medio con el colorante, siendo superior el crecimiento del control.

(Anexo Tabla A)

La degradación y el crecimiento en el colorante AB fueron iguales para el día 3, pero a partir del día 4 se observaron diferencias hasta el día 7, siendo menor la degradación que el crecimiento. No se observaron diferencias significativas para la degradación en el medio con VM con respecto a su crecimiento. (Figura 6)

Para *Pycnoporus sanguineus* en AMG, en presencia del colorante AB, el crecimiento resulto ligeramente menor al del hongo en medio sin colorante (Figura 7). pero los datos obtenidos mediante el test del programa GraphPadPrism nos demuestran que no existe diferencia alguna para el crecimiento en las condiciones analizadas

Para el mismo hongo en presencia del colorante VM con respecto al control positivo de crecimiento las diferencias observadas también, al igual que para *Trametes villosa*, son de un valor significativo por lo que existen diferencias para el parámetro analizado en estas condiciones. (Anexo Tabla B)

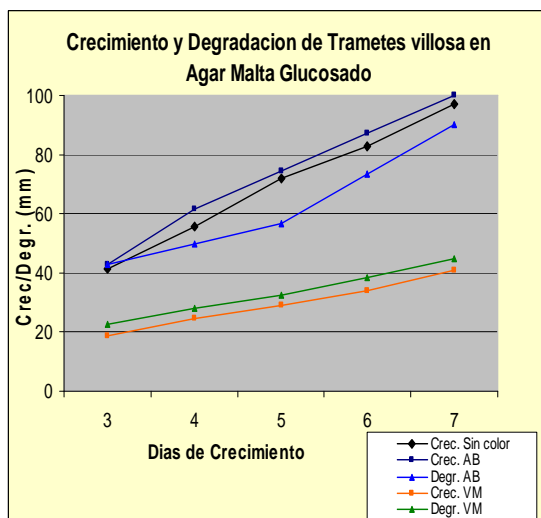


Figura 6: Se observan en el gráfico los valores obtenidos para el crecimiento y la degradación de *T. villosa* en el medio AMG a partir del día 3 hasta el día 7.

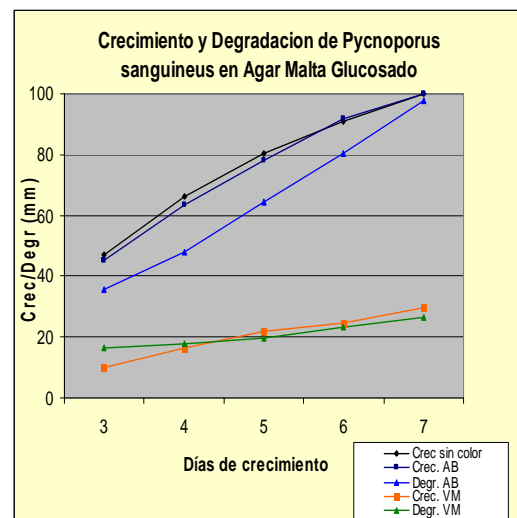


Figura 7: Se puede observar en el gráfico los valores obtenidos para *P. sanguineus* en el medio AMG desde el día 3 hasta el día 7.



Se realizó una comparación de los resultados obtenidos para el crecimiento y para la degradación en AB entre las dos especies y se observó, que presentan comportamientos muy similares para el medio y el colorante utilizado para estos dos parámetros analizados.

Cuando se realizó el mismo análisis entre las dos especies en presencia del colorante VM, el crecimiento no presentó diferencias notables, sin embargo la degradación mostró diferencias significativas a favor de *Trametes villosa*.

(Anexo Tabla C)

Ensayos de crecimiento y degradación en ASAB

El comportamiento de los hongos en este medio de cultivo fue inferior a lo observado en AMG.

La especie *Trametes villosa* demostró un crecimiento en el medio sin colorante un poco superior al 50% del total de la superficie de la placa de petri, y el crecimiento en presencia del colorante Azul de Bromofenol alcanzó una tasa aproximada del 50% de la placa.

Llevando estos datos al test Two-way ANOVA, vemos que no existen diferencias en el crecimiento entre el control y el medio con AB, salvo caso en el día 7, pero la diferencia observada no es muy considerable.

Para el colorante Verde de Malaquita el crecimiento fue notablemente inferior a lo observado en el control positivo, presentando una diferencia significativa entre ambos.

(Figura 8)

La degradación en presencia del Azul de Bromofenol, con respecto a su crecimiento, también fue inferior como lo fue en el medio AMG para *Trametes villosa*.

En presencia del colorante Verde de Malaquita, la degradación fue igual al crecimiento, siendo ambos muy bajos. **(Figura 9) (Anexo Tabla D)**

Para la especie *Pycnoporus sanguíneus* en este medio de cultivo conteniendo Azul de Bromofenol, el crecimiento se mostró superior al del hongo sin colorante, únicamente para los días 3 y 4 en los cuales se evidenció diferencias significativas entre ambos.

La degradación fue muy baja en relación a su crecimiento. Para el colorante VM el crecimiento también presentó grandes diferencias a favor del control positivo, pero en este caso se observó dicha diferencia en todos los días de medición.



En tanto la degradación presentó igualdad en sus valores en los primeros días, para luego en los días 6 y 7 presentar una pequeña diferencia en la relación crecimiento/degradación.

(Anexo Tabla E)

Comparando el comportamiento de las 2 especies en este medio de cultivo, tanto para el crecimiento en presencia del colorante AB como para el VM, no se han registrado diferencias significativas, los mismos datos se obtuvieron para la degradación en presencia de sendos colorantes entre estas 2 especies. (Anexo Tabla F)

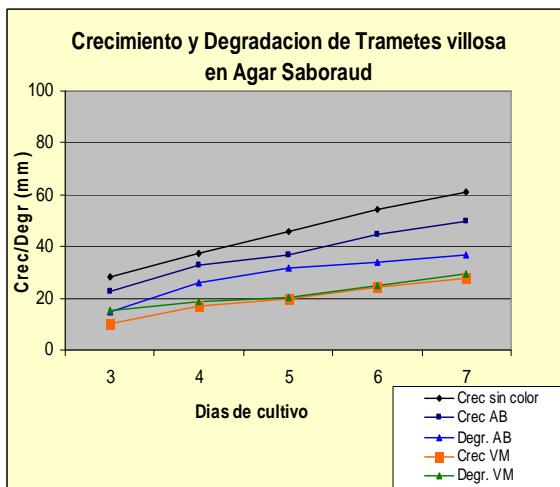


Figura 8: Crecimiento y degradación de *T. villosa* en ASAB.

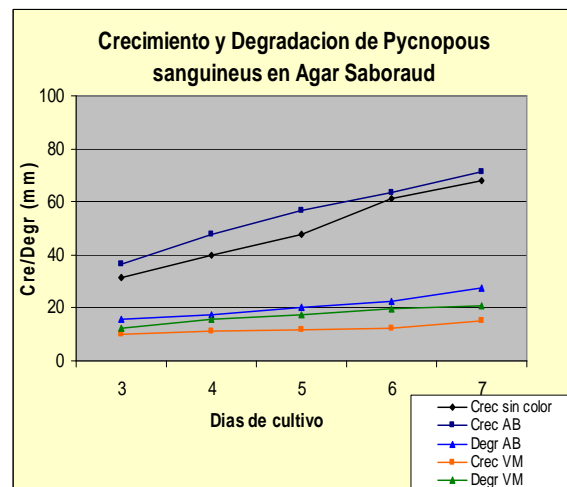


Figura 9: Valores obtenidos para el crecimiento y degradación de *P. sanguineus* en ASAB.

Ensayos de crecimiento y degradación en Licor negro (LN)

En el ensayo realizado con el efluente licor negro (LN) se pudo observar en la especie *T. villosa* que tanto el crecimiento como la degradación solo tuvieron lugar en el medio de cultivo en condiciones ácidas ($\text{pH} = 4,7$), y el crecimiento presentó diferencias con respecto a la degradación en casi todos los días, menos en el día 5 y el día 12 en los cuales fueron iguales; y en condiciones básicas ($\text{pH} = 11$) no se pudo observar crecimiento alguno y tampoco actividad degradativa. (Figura 10)

Sin embargo la especie *P. sanguineus* ha demostrado en el medio ácido posee capacidad de crecimiento y degradación, y solo presentaron diferencias entre los días 7 y 11 entre estos dos parámetros en estas condiciones de cultivo. (Anexo Tabla G) (Figura 11)

En el medio de cultivo en condiciones de alcalinidad, tanto el crecimiento como la degradación fueron inferiores a lo observado en medio ácido, demostrando diferencias para todos los días entre ambos parámetros.



El comportamiento del crecimiento y la degradación entre las especies en el medio ácido fue muy similar, pero se pudo observar que la especie *P. sanguineus* presento mejores resultados en estas condiciones y las diferencias entre ambas especies son ligeramente significativas. (Anexo Tabla G)

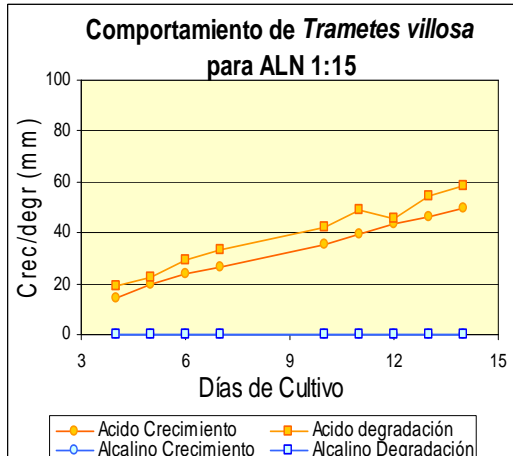


Figura 10: Se observa el crecimiento y la degradación de *T. villosa* en LN a pH 4.7

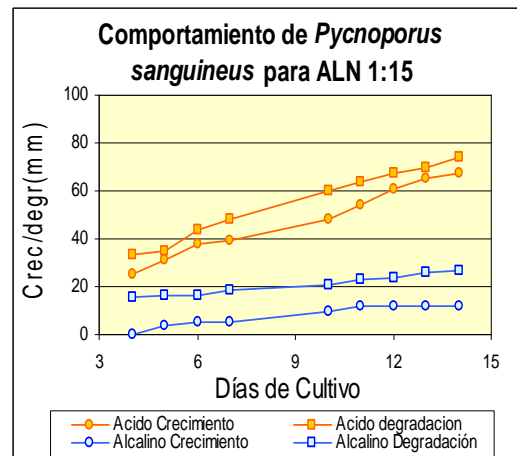


Figura 11: Se observa crecimiento y degradación de *P. sanguineus* en LN en pH 4.7 y pH 11

4.2 Efecto del Cu sobre la Actividad Enzimática de Lacasa

Podemos observar la actividad de la enzima Lacasa del hongo *T. villosa* teniendo en cuenta los diferentes días de cultivo.

Se puede observar un claro aumento de actividad correlacionándose con el tiempo hasta el día 10 en el cual se observa el máximo valor para dicha actividad, para luego decaer en el día 14 hacia un valor aproximado al observado en el día 7 de cultivo.

En presencia del CuSO_4 como inductor de la actividad enzimática, se registró un incremento constante de actividad enzimática, alcanzando valores entre 10 y 200 veces superiores al obtenido en condiciones sin inductor a iguales tiempos de cultivo.

Los resultados de las actividades enzimáticas (UE/L) correspondientes a los días 5, 7, 10 y 14 se muestran en la **figura 12**.

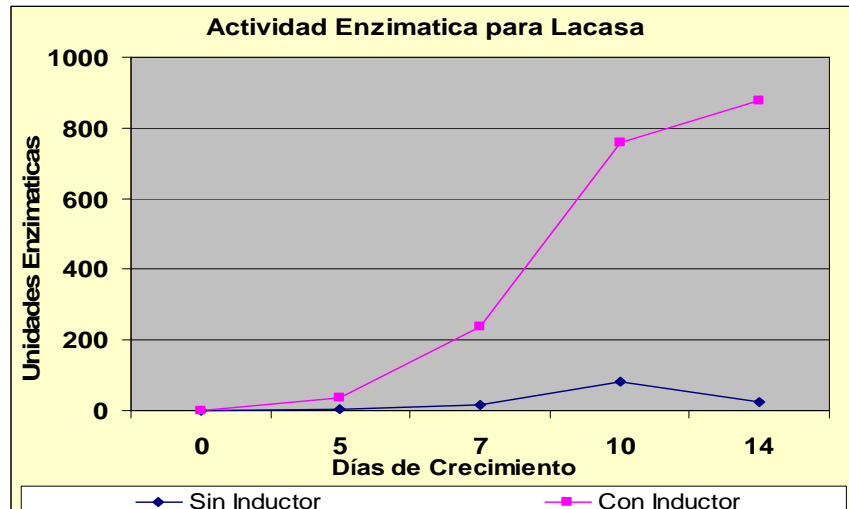


Figura 12: Se observan los gráficos correspondientes a la actividad enzimática de Lacasa en función del tiempo en presencia y ausencia del inductor.

Para analizar la posibilidad la existencia de isoenzimas de diferentes pesos moleculares se realizaron estudios en geles de poliacrilamida no desnaturalizante (denominados zimogramas) (**Figura 13**) observándose una única banda con actividad lacasa

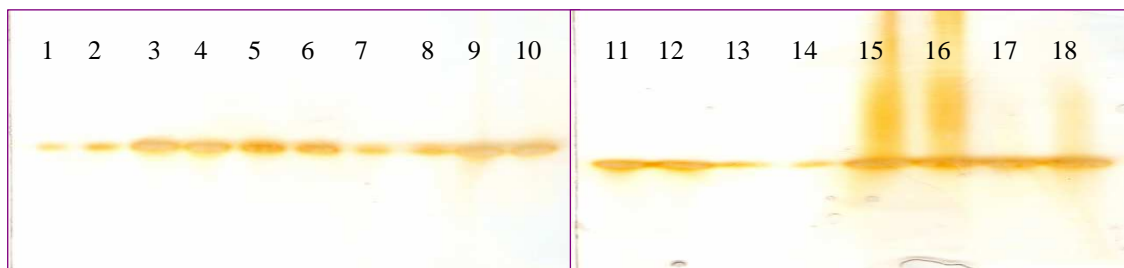


Figura 13: Muestras de 7 días de cultivo: 1, 2 sin Cu; 3, 4 con 1mM de Cu. Muestras de 10 días de cultivo: 7, 8 sin Cu; 9, 10 con 0.5mM de Cu; 11, 12 con 1 mM de Cu. Muestras de 14 días de cultivo: carriles 13, 14 sin Cu; 15, 16 con 0.5mM de Cu; 17, 18 con 1mM de Cu.

4.3 Efecto del Cu sobre los niveles de mRNA de lacasa

Para poder analizar los mRNA del hongo se utilizaron dos alternativas de extracción del método propuesto por Chomczynski y Sacchi, (1987).



Los resultados obtenidos por los dos tratamientos de purificación de ARNs totales fueron muy buenos, pudiéndose diferenciar claramente que la calidad del material extraído mediante el método que utiliza solo Cloroformo para dicho propósito es superior a su par el cual utiliza al Fenol para la purificación.

Estos resultados avalan al método propuesto por Chomczynski y Sacchi, 1987.

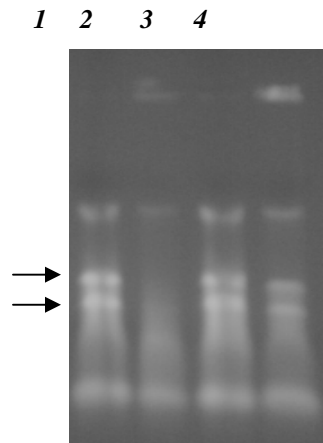


Figura 14: Aislamiento de RNAs. La fotografía muestra los tratamientos 1 y 3 correspondientes a la purificación con Cloroformo y los tratamientos 2 y 4 con Fenol. Las flechas indican las subunidades ribosómicas 28 S y 18 S respectivamente.

Para la técnica de RT-PCR se utilizaron las muestras de RNAs totales extraídas por el método que dio mejor resultado, mencionado anteriormente.

Dichas muestras correspondieron a los días 5, 7, 10 y 14 de cultivo, las cuales se ensayaron sin CuSO_4 como inductor, y con 1mM de CuSO_4 como inductor de la actividad enzimática de Lacasa. (**Figura 15**)

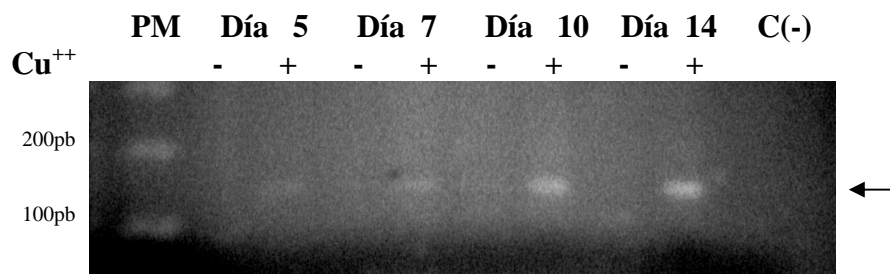


Figura 15: RT-PCR para un fragmento del gen lacasa. De izquierda a derecha, el marcador de peso molecular (PM), luego las 2 muestras correspondientes al día 5 de cultivo y en esa secuencia las del día 7, 10 y 14 respectivamente. La última calle del gel corresponde al control negativo (C(-)). La flecha nos indica un amplicón de unos 150 pb aprox. el cual podría corresponder al mRNA de lacasa.



4.4 Extracción de ADN y amplificación de un fragmento del gen para lacasa

Para poder corroborar que el fragmento amplificado por medio de la técnica de RT-PCR corresponde al mRNA de la enzima lacasa, se procedió a la extracción del ADN con el fin de secuenciar el fragmento de interés.

Los resultados obtenidos en cuanto a la cantidad y calidad del material genético extraído son muy satisfactorios, según lo evidenciado en gel de agarosa y los datos obtenidos a través del análisis de las muestras en el espectrofotómetro. (Figura 16)

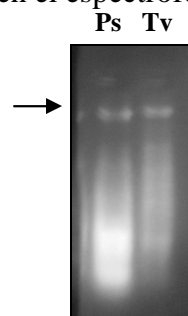


Figura 16: Extracción de ADN. El ADN para *Pycnoporus sanguineus* (Ps) y *Trametes villosa* (Tv) fue extraído como se describe en Materiales y Métodos, separado por electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con Bromuro de etidio (BrEt) y fotografiado con cámara digital bajo luz UV. La flecha indica el ADN genómico.

El ADN fue amplificado mediante el uso de cebadores degenerados, secuenciada y analizada mediante el programa BLASTn.

La secuencia obtenida al realizar la PCR fue la siguiente:

**TCGTGACCAGTTGCCCATCTTCGCTCGGGNAATTCGTTTCCT
GTCACAATTTCCGGTTCCTGACCAGGCN GGTAAGNGCGCCT
CGTANNATTTCNNTNTCCNAATNTGACNCACGNNTGT**

El alineamiento indica que existe entre un 79% y 80% de homología con la secuencias de genes lacasa provenientes de otros hongos de pudrición. (Figura 17)



Sequences producing significant alignments:
headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<input checked="" type="checkbox"/> AF414807.1	Trametes pubescens laccase 2 (lap2) gene, complete cds	56.5	56.5	59%	2e-05	80%
<input checked="" type="checkbox"/> M60561.1	C.hirsutus ligninolytic phenoloxidase gene, complete cds	52.8	52.8	60%	3e-04	80%
<input checked="" type="checkbox"/> M60560.1	C.hirsutus ligninolytic phenoloxidase gene, complete cds	52.8	52.8	60%	3e-04	80%
<input checked="" type="checkbox"/> AY204503.1	Trametes versicolor putative laccase gene, partial cds	51.0	51.0	59%	0.001	79%
<input checked="" type="checkbox"/> L49376.1	Trametes villosa (clone LCC1) laccase gene, exons 1-9, complete cds	51.0	51.0	59%	0.001	79%
<input checked="" type="checkbox"/> D13372.1	Coriolus versicolor CVL3 gene for laccase, complete cds	51.0	51.0	59%	0.001	79%

Figura 17: Resultado del alineamiento utilizando el programa BLASTn.

4.6 Medición de proteínas totales

Al analizar los niveles de proteínas totales obtenidas (**Figura 18**), se produjo un incremento en la cantidad de proteínas totales producidas bajo condiciones de estimulación con CuSO_4 como inductor en contraposición a lo observado en ausencia del mismo para el hongo *Trametes villosa*.

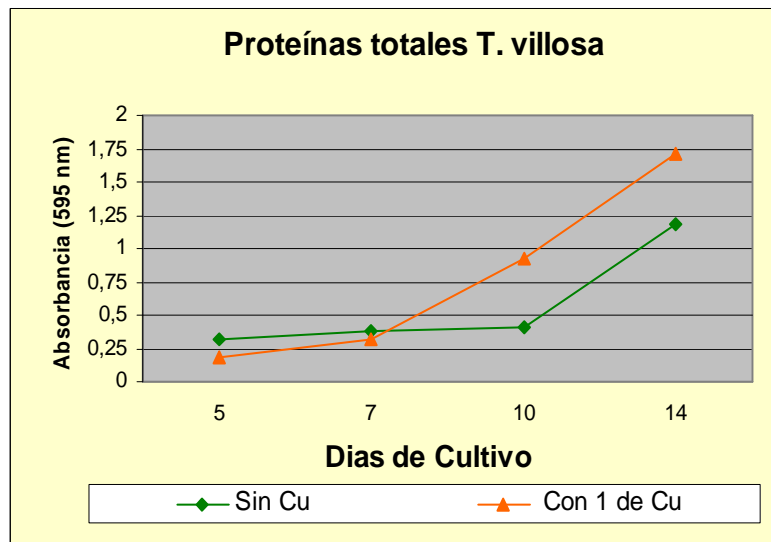
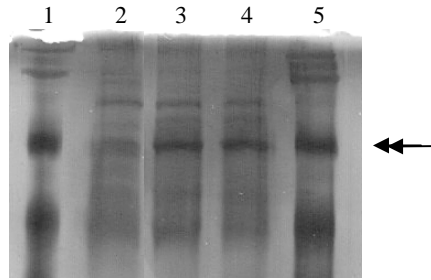


Figura 14: Medición de proteínas totales. En la figura se observa la producción de proteínas totales en *T. Villosa* bajo el efecto del Cu SO_4 utilizado como posible inductor de la actividad enzimática de lacasa en contraposición a los valores obtenidos en ausencia al inductor.

Los ensayos de determinación de perfil proteico en geles de SDS-PAGE (**figura 19**) de los filtrados realizados sin CuSO_4 y con 1 mM de Cu. Se colocaron volúmenes variables de manera de que todas las muestras poseen 20 μg de proteínas, observándose un aumento en



la intensidad la banda correspondiente a 78 kDa aproximadamente, la cual va aumentando conjuntamente con la concentración de CuSO_4 .



Cultivos de 14 días: carril 1 y 5: ladder. Carril 2 sin Cu; carril 3 y 4 con 1 mM de CuSO_4 . La flecha indica la banda correspondiente a 78 kDa aproximadamente.



DISCUSIÓN

Ha quedado demostrado que la utilización de colorantes poliméricos es una herramienta muy noble y a la vez sencilla a la hora de evaluar el crecimiento y la capacidad degradativa de los hongos de pudrición blanca utilizados en este trabajo.

Se pudo observar claramente que tanto *Trametes villosa* como *Pycnoporus sanguíneus* presentaron una buena tasa de crecimiento como así también de degradación en el colorante azul de bromofenol, sin embargo esto no ocurrió en presencia del verde de malaquita, por lo que los valores obtenidos para dichos parámetros en presencia de dicho colorante fueron inferiores a lo observado en ambos medios ensayados con sendos colorantes.

Los resultados obtenidos se asemejan a lo obtenido en trabajos anteriores llevados a cabo en el laboratorio en otras especies de hongos de pudrición blanca, *Ganoderma applanatum*, (Shimizu 2006) y *Peniophora* (Velez Rueda 2007); como así también trabajos llevados a cabo por Levin *et al* demostraron que el colorante verde de malaquita es inhibidor total o parcial del crecimiento en hongos.

En cuanto al ensayo llevado a cabo para ambas especies de hongos en presencia en el medio de cultivo del efluente proveniente de la producción del papel (método Kraft), pudimos evidenciar un cambio de coloración, lo que podría ser considerado como actividad lignolítica de los mismos, solamente en condiciones ácidas para ambos y únicamente *Pycnoporus sanguíneus* mostró actividad en condiciones de alcalinidad.

Esto podría ser evaluado mediante la determinación del cambio de absorbancia a la longitud de onda de absorción de la lignina para poder verificar su oxidación, como fue propuesto por Lara *et al*, 2003.

En contraposición a los resultados obtenidos en nuestros ensayos, trabajos llevados a cabo por Gómez-Dorado *et al* 2005 no han podido correlacionar el efecto del CuSO₄ como inductor de la actividad enzimática de lacasa en el hongo *Trametes versicolor*, atribuyendo dicha observación a la naturaleza del efluente utilizado en su trabajo además de la presencia de otras enzimas con actividad oxidativa.

Para la medición de la actividad enzimática se han utilizado los sobrenadantes de los medios de cultivos líquidos conservados a -20 °C, obtenidos previamente por filtración de los cuales se han obtenido excelentes resultados sin presentarse inconveniente alguno.



La técnica de utilización de sobrenadantes congelados fue puesta también en práctica por **Mouso et al 2003**, obteniéndose resultados satisfactorios análogos a los obtenidos en el presente trabajo

En cuanto a la actividad enzimática de *Trametes villosa*, se pudo apreciar un marcado aumento en presencia del CuSO_4 en relación a los mismos días de crecimiento del hongo en ausencia CuSO_4 . Estos resultados se corresponden con los obtenidos en trabajos realizados por **Mouso et al 2003**, en el cual utilizaron CuSO_4 como inductor de la actividad enzimática en el hongo de pudrición blanca *Stereum hirsutum*.

Otros resultados concordantes en cuanto al aumento de la actividad enzimática de lacasa también ha sido reportado en el trabajo llevado a cabo por **Levin et al 2002** en el hongo *Trametes trogii*.

En contraposición a los resultados obtenidos en nuestros ensayos, trabajos llevados a cabo por **Gómez-Dorado et al 2005**, no han podido correlacionar el efecto del CuSO_4 como inductor de la actividad enzimática de lacasa en el hongo *Trametes versicolor*, atribuyendo dicha observación a la naturaleza del efluente utilizado en su trabajo además de la presencia de otras enzimas con actividad oxidativa. También podemos destacar en el trabajo realizado por **Gómez-Dorado et al 2005**, que el CuSO_4 actúa no solo estimulando la actividad de lacasa en otros hongos sino que también, en este trabajo en particular, aumenta la producción de manganeso peroxidasa (MnP), otra de las enzimas lignolíticas presente en el sistema enzimático extracelular de los hongos de pudrición blanca.

Se han desarrollado trabajos que demuestran que en determinadas especies de hongos de pudrición blanca se hallan isoenzimas para lacasa, lo que refleja la importancia, la diversidad génica y fisiológica encontrada en diferentes géneros y en diferentes especies pertenecientes a un mismo género, incluso entre diferentes cepas de una misma especie, hecho que también podría estar reflejado en la forma de respuesta diferencial ante iones metálicos.

En base a los resultados obtenidos en el zimograma realizado en N/D SDS-PAGE, se encontró solamente una banda correspondiente a la actividad de la enzima lacasa, en *Trametes villosa*.

En contraparte a lo obtenido en nuestro trabajo, se puede observar que en el trabajo llevado a cabo por **Yaver et al 1995**, se han podido aislar dos isoenzimas correspondientes a lacasa, de 63 kDa, una de expresión constitutiva y la otra de expresión inducible.



En otro trabajo realizado por **Moon-Jeong Han et al 2005**, en *Trametes versicolor*, también han podido aislar una lacasa de un tamaño aproximado a los 97 kDa.

En cuanto al método de extracción de RNAs utilizado, basado en el poder caotrópico y de inactivación de nucleasas del Tiocinato de Guanidinio (GuSCN), se ha podido obtener muy buenos resultados en cuanto a la cantidad y calidad del material extraído.

Similares resultados han obtenido **Bomm et al 1989** al utilizar este poderoso agente en la extracción de RNAs que utiliza pequeñas cantidades de muestras de diversos orígenes y características.

Prosiguiendo con el esquema planteado en el trabajo se llevo a cabo la RT-PCR, intentando diferenciar los niveles de producción de mensajeros. Si bien esta técnica no es cuantitativa, se han realizado modificaciones en las cantidades de RNA de partida para lograr un método semicuantitativo. Para ello se han utilizado los cebadores degenerados descritos por **D'souza et al 1996**, que hibridan sobre una región conservada de unión al cobre para hongos de pudrición blanca. Para validar esta metodología se amplificaron muestras de ADN genómico con estos cebadores y se secuenciaron, mostrando los resultados una alta identidad con secuencias de lacasas de otras cepas de *T. villosa* (Codigo GenBank L49376), y teniendo en cuenta la presencia de un intrón y el proceso de splicing por el cual atraviesan los mRNA (**Yaver et al., 1995**), el resultado de la amplificación luego de la RT sería un fragmento de aproximadamente 150 pb, coincidentemente con los resultados obtenidos.

Esto se podría corroborar la existencia de una región intrónica en este hongo de unos 50 pb dentro de la región conservada propuesta por **D'souza et al (1996)**.

Este trabajo se ha planteado tratando de comprender el papel de Cu^{++} en la secreción de la enzima lacasa, analizando los posibles puntos de acción de los metales en el flujo de la información génica relacionada con la producción enzimática. Existen evidencias de la presencia de promotores sensibles a metales en genes de enzimas lignolíticas (**Yaver et al., 1995**). Sin embargo, los metales también pueden actuar estabilizando el mensajero o activando el procesamiento, tráfico y plegamiento proteico (**Lodish et al., 2002**). Nosotros demostramos a través de estos resultados que el Cu^{++} produce un aumento en la actividad de lacasa en *Trametes villosa*, y que este aumento de actividad podría deberse a un aumento en la cantidad de la proteína producida (**figura 19**) y del mensajero de lacasa (**figura 15**), quedando aun algunos puntos por esclarecer y confirmar a través de ensayos



mas específicos realizados mediante RT-PCR tiempo real y western blot, así como la comprobación mediante ensayos del gen reportador de la actividad del metal sobre el presunto promotor de metales divalentes del gen *lacase*, pero claramente son un punto de partida para profundizar en la comprensión del mecanismo de producción de lacasa en los hongos de pudrición. (Figura 20)

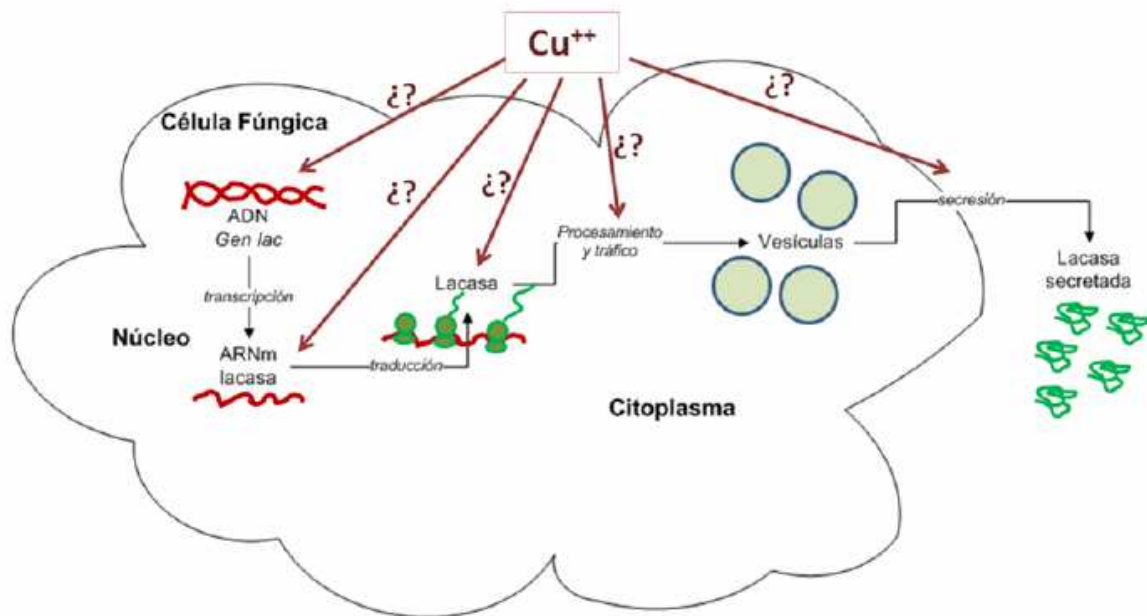


Figura 20: Posibles puntos de regulación mediante Cu^{++} sobre el flujo de la información génica.

Podemos usar nuestros resultados como punto de partida para investigaciones futuras en la utilización del Cu^{++} como inductor de la actividad enzimática de los hongos de pudrición blanca y analizar posteriormente los parámetros a ser tenidos en cuenta en el escalado para una futura aplicación biotecnológica.



CONCLUSIONES

- El hongo *Trametes villosa* demostró una buena capacidad de crecimiento y de degradación en los medios de cultivos primarios (AMG y ASAB) utilizándolos colorantes azul de bromofenol y verde de malaquita.
- El hongo *Trametes villosa* presentó buena capacidad de crecimiento y degradación en presencia del efluente LN 1:15 en medio en condiciones ácidas, sin observarse efecto en medio alcalino.
- La lacasa producida por el hongo *Trametes villosa* incrementa su actividad en presencia 1mM de CuSO₄.
- La electroforesis en gel de poliacrilamida demostró la presencia de una sola banda que podría pertenecer a lacasa en *Trametes villosa* y que aumenta en los cultivos estimulados con Cu⁺⁺
- Los estudios realizados en ND-PAGE (zimograma) indican la ausencia de isoenzimas de diferente peso molecular para el hongo *Trametes villosa*.
- El agregado de Cu⁺⁺ produce un incremento en las proteínas totales secretadas en cultivos del hongo *Trametes villosa*.
- La utilización de cebadores degenerados para las regiones conservadas de unión al cobre de lacasas, permitió la amplificación de un fragmento de 200 pb de alta homología con fragmentos génicos de genes lacasa descriptos.
- La utilización de la técnica de RT-PCR permitió la amplificación de un producto de 150 pb correspondiente a un fragmento del mensajero para lacasa que se incrementa al agregar Cu⁺⁺ al medio de cultivo.



Conclusión general: El agregado de Cu^{++} al medio de cultivos del hongo *Trametes villosa* causa un incremento de la actividad enzimática de lacasa que podría estar atribuido al aumento en la producción proteica y a un aumento en la cantidad de mensajero, sin poderse distinguir si este efecto se debe a una mayor transcripción o a una mayor estabilidad del mismo.



ANEXO I

DATOS ESTADÍSTICOS

Medio Agar Malta Glucosado (AMG)

Tabla A: Crecimiento y de *Trametes villosa* en medio AMG (control positivo) comparado en presencia del colorante Azul de Bromofenol y Verde de Malaquita, y degradación en relación al crecimiento en dichos colorantes.

Sin color vs. AB crec				
Dias de Crecimiento	Sin color	AB crec	Difference	95% CI of diff.
3.000	28.00	22.50	-5.500	-20.03 to 9.033
4.000	37.50	32.50	-5.000	-19.53 to 9.533
5.000	45.50	37.00	-8.500	-23.03 to 6.033
6.000	54.50	44.50	-10.00	-24.53 to 4.533
7.000	61.00	49.50	-11.50	-26.03 to 3.033
Dias de Crecimiento	Difference	t	P value	Summary
3.000	-5.500	1.410	P > 0.05	ns
4.000	-5.000	1.282	P > 0.05	ns
5.000	-8.500	2.179	P > 0.05	ns
6.000	-10.00	2.563	P > 0.05	ns
7.000	-11.50	2.948	P < 0.05	*

Sin Color vs. VM crec				
Dias de Cultivo	Sin Color	VM crec	Difference	95% CI of diff.
3.000	41.50	18.50	-23.00	-29.64 to -16.36
4.000	55.50	24.50	-31.00	-37.64 to -24.36
5.000	72.00	29.00	-43.00	-49.64 to -36.36
6.000	83.00	34.00	-49.00	-55.64 to -42.36
7.000	97.00	41.00	-56.00	-62.64 to -49.36
Dias de Cultivo	Difference	t	P value	Summary
3.000	-23.00	12.90	P<0.001	***
4.000	-31.00	17.38	P<0.001	***
5.000	-43.00	24.11	P<0.001	***
6.000	-49.00	27.48	P<0.001	***
7.000	-56.00	31.40	P<0.001	***



AB crec vs. AB degr				
Dias de Cultivo	AB crec	AB degr	Difference	95% CI of diff.
3.000	43.00	43.00	0.0000	-6.643 to 6.643
4.000	61.50	50.00	-11.50	-18.14 to -4.857
5.000	74.50	56.50	-18.00	-24.64 to -11.36
6.000	87.00	73.50	-13.50	-20.14 to -6.857
7.000	100.0	90.00	-10.00	-16.64 to -3.357
Dias de Cultivo	Difference	t	P value	Summary
3.000	0.0000	0.0000	P > 0.05	ns
4.000	-11.50	6.449	P<0.001	***
5.000	-18.00	10.09	P<0.001	***
6.000	-13.50	7.570	P<0.001	***
7.000	-10.00	5.608	P<0.001	***

VM crec vs. VM degr				
Dias de Cultivo	VM crec	VM degr	Difference	95% CI of diff.
3.000	18.50	22.50	4.000	-2.643 to 10.64
4.000	24.50	28.00	3.500	-3.143 to 10.14
5.000	29.00	32.50	3.500	-3.143 to 10.14
6.000	34.00	38.50	4.500	-2.143 to 11.14
7.000	41.00	45.00	4.000	-2.643 to 10.64
Dias de Cultivo	Difference	t	P value	Summary
3.000	4.000	2.243	P > 0.05	ns
4.000	3.500	1.963	P > 0.05	ns
5.000	3.500	1.963	P > 0.05	ns
6.000	4.500	2.523	P > 0.05	ns
7.000	4.000	2.243	P > 0.05	ns



Tabla B: Crecimiento de *Pycnoporus sanguíneus* en medio AMG (control positivo) comparado al crecimiento del mismo hongo en presencia del colorante Azul de Bromofenol y con el colorante Verde de Malaquita

Sin Color vs. AB crec				
Dias de Crecimiento	Sin Color	AB crec	Difference	95% CI of diff.
3.000	47.00	45.00	-2.000	-8.767 to 4.767
4.000	66.00	63.50	-2.500	-9.267 to 4.267
5.000	80.50	78.00	-2.500	-9.267 to 4.267
6.000	91.00	92.00	1.000	-5.767 to 7.767
7.000	100.0	100.0	0.0000	-6.767 to 6.767
Dias de Crecimiento	Difference	t	P value	Summary
3.000	-2.000	1.101	P > 0.05	ns
4.000	-2.500	1.376	P > 0.05	ns
5.000	-2.500	1.376	P > 0.05	ns
6.000	1.000	0.5505	P > 0.05	ns
7.000	0.0000	0.0000	P > 0.05	ns

Sin Color vs. VM crec				
Dias de Crecimiento	Sin Color	VM crec	Difference	95% CI of diff.
3.000	47.00	10.00	-37.00	-43.77 to -30.23
4.000	66.00	16.50	-49.50	-56.27 to -42.73
5.000	80.50	22.00	-58.50	-65.27 to -51.73
6.000	91.00	24.50	-66.50	-73.27 to -59.73
7.000	100.0	29.50	-70.50	-77.27 to -63.73
Dias de Crecimiento	Difference	t	P value	Summary
3.000	-37.00	20.37	P<0.001	***
4.000	-49.50	27.25	P<0.001	***
5.000	-58.50	32.20	P<0.001	***
6.000	-66.50	36.61	P<0.001	***
7.000	-70.50	38.81	P<0.001	***



Tabla C: Crecimiento y degradación entre las dos especies en el medio AMG en presencia de los colorantes Azul de Bromofenol y Verde de Malaquita.

Crec AB (Tv) vs. Crec AB (Py)				
Column Factor	Crec AB (Tv)	Crec AB (Py)	Difference	95% CI of diff.
3.000	43.00	45.00	2.000	-26.85 to 30.85
4.000	61.50	63.50	2.000	-26.85 to 30.85
5.000	74.50	78.00	3.500	-25.35 to 32.35
6.000	87.00	92.00	5.000	-23.85 to 33.85
7.000	100.0	100.0	0.0000	-28.85 to 28.85
Column Factor	Difference	t	P value	Summary
3.000	2.000	0.6880	P > 0.05	ns
4.000	2.000	0.6880	P > 0.05	ns
5.000	3.500	1.204	P > 0.05	ns
6.000	5.000	1.720	P > 0.05	ns
7.000	0.0000	0.0000	P > 0.05	ns

Crec VM (Tv) vs. Crec VM (Ps)				
Column Factor	Crec VM (Tv)	Crec VM (Ps)	Difference	95% CI of diff.
3.000	18.50	10.00	-8.500	-24.66 to 7.656
4.000	24.50	16.50	-8.000	-24.16 to 8.156
5.000	29.00	22.00	-7.000	-23.16 to 9.156
6.000	34.00	24.50	-9.500	-25.66 to 6.656
7.000	41.00	29.50	-11.50	-27.66 to 4.656
Column Factor	Difference	t	P value	Summary
3.000	-8.500	5.222	P > 0.05	ns
4.000	-8.000	4.914	P > 0.05	ns
5.000	-7.000	4.300	P > 0.05	ns
6.000	-9.500	5.836	P > 0.05	ns
7.000	-11.50	7.064	P > 0.05	ns



Degr AB (Tv) vs. Degr AB (Ps)				
Column Factor	Degr AB (Tv)	Degr AB (Ps)	Difference	95% CI of diff.
3.000	43.00	35.50	-7.500	-38.89 to 23.89
4.000	50.00	48.00	-2.000	-33.39 to 29.39
5.000	56.50	64.50	8.000	-23.39 to 39.39
6.000	73.50	80.50	7.000	-24.39 to 38.39
7.000	90.00	97.50	7.500	-23.89 to 38.89
Column Factor	Difference	t	P value	Summary
3.000	-7.500	2.372	P > 0.05	ns
4.000	-2.000	0.6325	P > 0.05	ns
5.000	8.000	2.530	P > 0.05	ns
6.000	7.000	2.214	P > 0.05	ns
7.000	7.500	2.372	P > 0.05	ns

Degr VM (Tv) vs. Degr VM (Ps)				
Column Factor	Degr VM (Tv)	Degr VM (Ps)	Difference	95% CI of diff.
3.000	22.50	16.50	-6.000	-8.219 to -3.781
4.000	28.00	18.00	-10.00	-12.22 to -7.781
5.000	32.50	19.50	-13.00	-15.22 to -10.78
6.000	38.50	23.50	-15.00	-17.22 to -12.78
7.000	45.00	26.50	-18.50	-20.72 to -16.28
Column Factor	Difference	t	P value	Summary
3.000	-6.000	26.83	P<0.01	**
4.000	-10.00	44.72	P<0.01	**
5.000	-13.00	58.14	P<0.01	**
6.000	-15.00	67.08	P<0.01	**
7.000	-18.50	82.73	P<0.001	***



Medio Agar Saboraud (ASAB)

Tabla D: Crecimiento y degradación de *T villosa* en ASAB en presencia de los colorantes Azul de Bromofenol y Verde de Malaquita, en relación al control positivo (Sin color) y al crecimiento respectivamente.

Sin color vs. AB crec				
Dias de Crecimiento	Sin color	AB crec	Difference	95% CI of diff.
3.000	28.00	22.50	-5.500	-20.03 to 9.033
4.000	37.50	32.50	-5.000	-19.53 to 9.533
5.000	45.50	37.00	-8.500	-23.03 to 6.033
6.000	54.50	44.50	-10.00	-24.53 to 4.533
7.000	61.00	49.50	-11.50	-26.03 to 3.033
Dias de Crecimiento	Difference	t	P value	Summary
3.000	-5.500	1.410	P > 0.05	ns
4.000	-5.000	1.282	P > 0.05	ns
5.000	-8.500	2.179	P > 0.05	ns
6.000	-10.00	2.563	P > 0.05	ns
7.000	-11.50	2.948	P < 0.05	*

Sin color vs. VM crec				
Dias de Crecimiento	Sin color	VM crec	Difference	95% CI of diff.
3.000	28.00	10.00	-18.00	-32.53 to -3.467
4.000	37.50	17.00	-20.50	-35.03 to -5.967
5.000	45.50	19.50	-26.00	-40.53 to -11.47
6.000	54.50	24.50	-30.00	-44.53 to -15.47
7.000	61.00	27.50	-33.50	-48.03 to -18.97
Dias de Crecimiento	Difference	t	P value	Summary
3.000	-18.00	4.614	P<0.001	***
4.000	-20.50	5.255	P<0.001	***
5.000	-26.00	6.664	P<0.001	***
6.000	-30.00	7.690	P<0.001	***
7.000	-33.50	8.587	P<0.001	***



AB crec vs. AB deg				
Días de Crecimiento	AB crec	AB deg	Difference	95% CI of diff.
3.000	22.50	22.50	0.0000	-14.53 to 14.53
4.000	32.50	32.50	0.0000	-14.53 to 14.53
5.000	37.00	37.00	0.0000	-14.53 to 14.53
6.000	44.50	44.50	0.0000	-14.53 to 14.53
7.000	49.50	49.50	0.0000	-14.53 to 14.53
Días de Crecimiento	Difference	t	P value	Summary
3.000	0.0000	0.0000	P > 0.05	ns
4.000	0.0000	0.0000	P > 0.05	ns
5.000	0.0000	0.0000	P > 0.05	ns
6.000	0.0000	0.0000	P > 0.05	ns
7.000	0.0000	0.0000	P > 0.05	ns

VM crec vs. VM degr				
Días de Crecimiento	VM crec	VM degr	Difference	95% CI of diff.
3.000	10.00	15.00	5.000	-9.533 to 19.53
4.000	17.00	18.50	1.500	-13.03 to 16.03
5.000	19.50	20.50	1.000	-13.53 to 15.53
6.000	24.50	25.00	0.5000	-14.03 to 15.03
7.000	27.50	29.50	2.000	-12.53 to 16.53
Días de Crecimiento	Difference	t	P value	Summary
3.000	5.000	1.282	P > 0.05	ns
4.000	1.500	0.3845	P > 0.05	ns
5.000	1.000	0.2563	P > 0.05	ns
6.000	0.5000	0.1282	P > 0.05	ns
7.000	2.000	0.5127	P > 0.05	ns



Tabla E : Crecimiento y degradación de *P sanguíneus* en ASAB en presencia de los colorantes Azul de Bromofenol y Verde de Malaquita, en relación al control positivo (Sin color) y al crecimiento respectivamente

Sin Color vs. AB crec				
Dias de Crecimiento	Sin Color	AB crec	Difference	95% CI of diff.
3.000	31.50	36.50	5.000	-2.580 to 12.58
4.000	40.00	48.00	8.000	0.4205 to 15.58
5.000	47.50	56.50	9.000	1.420 to 16.58
6.000	61.00	63.50	2.500	-5.080 to 10.08
7.000	68.00	71.50	3.500	-4.080 to 11.08
Dias de Crecimiento	Difference	t	P value	Summary
3.000	5.000	2.457	P > 0.05	ns
4.000	8.000	3.932	P < 0.01	**
5.000	9.000	4.423	P < 0.001	***
6.000	2.500	1.229	P > 0.05	ns
7.000	3.500	1.720	P > 0.05	ns

Sin Color vs. VM crev				
Dias de Crecimiento	Sin Color	VM crev	Difference	95% CI of diff.
3.000	31.50	10.00	-21.50	-29.08 to -13.92
4.000	40.00	11.00	-29.00	-36.58 to -21.42
5.000	47.50	12.00	-35.50	-43.08 to -27.92
6.000	61.00	12.50	-48.50	-56.08 to -40.92
7.000	68.00	15.00	-53.00	-60.58 to -45.42
Dias de Crecimiento	Difference	t	P value	Summary
3.000	-21.50	10.57	P < 0.001	***
4.000	-29.00	14.25	P < 0.001	***
5.000	-35.50	17.45	P < 0.001	***
6.000	-48.50	23.84	P < 0.001	***
7.000	-53.00	26.05	P < 0.001	***



AB crec vs. AB degr				
Días de Crecimiento	AB crec	AB degr	Difference	95% CI of diff.
3.000	36.50	15.50	-21.00	-28.58 to -13.42
4.000	48.00	17.50	-30.50	-38.08 to -22.92
5.000	56.50	20.00	-36.50	-44.08 to -28.92
6.000	63.50	22.50	-41.00	-48.58 to -33.42
7.000	71.50	27.50	-44.00	-51.58 to -36.42
Días de Crecimiento	Difference	t	P value	Summary
3.000	-21.00	10.32	P<0.001	***
4.000	-30.50	14.99	P<0.001	***
5.000	-36.50	17.94	P<0.001	***
6.000	-41.00	20.15	P<0.001	***
7.000	-44.00	21.62	P<0.001	***

VM crev vs. VM degr				
Días de Crecimiento	VM crev	VM degr	Difference	95% CI of diff.
3.000	10.00	12.50	2.500	-5.080 to 10.08
4.000	11.00	15.50	4.500	-3.080 to 12.08
5.000	12.00	17.50	5.500	-2.080 to 13.08
6.000	12.50	19.50	7.000	-0.5795 to 14.58
7.000	15.00	21.00	6.000	-1.580 to 13.58
Días de Crecimiento	Difference	t	P value	Summary
3.000	2.500	1.229	P > 0.05	ns
4.000	4.500	2.212	P > 0.05	ns
5.000	5.500	2.703	P > 0.05	ns
6.000	7.000	3.440	P < 0.05	*
7.000	6.000	2.949	P < 0.05	*

Tabla F: Crecimiento y degradación entre las dos especies en el medio ASAB en presencia de los colorantes Azul de Bromofenol y Verde de Malaquita.



Crec AB (Tv) vs. Crec AB (Ps)				
Column Factor	Crec AB (Tv)	Crec AB (Ps)	Difference	95% CI of diff.
3.000	22.50	36.50	14.00	-51.98 to 79.98
4.000	32.50	48.00	15.50	-50.48 to 81.48
5.000	37.00	56.50	19.50	-46.48 to 85.48
6.000	44.50	63.50	19.00	-46.98 to 84.98
7.000	49.50	71.50	22.00	-43.98 to 87.98
Column Factor	Difference	t	P value	Summary
3.000	14.00	2.106	P > 0.05	ns
4.000	15.50	2.331	P > 0.05	ns
5.000	19.50	2.933	P > 0.05	ns
6.000	19.00	2.858	P > 0.05	ns
7.000	22.00	3.309	P > 0.05	ns

Degr AB (Tv) vs. Degr AB (Ps)				
Column Factor	Degr AB (Tv)	Degr AB (Ps)	Difference	95% CI of diff.
3.000	22.50	15.50	-7.000	-51.61 to 37.61
4.000	32.50	17.50	-15.00	-59.61 to 29.61
5.000	37.00	20.00	-17.00	-61.61 to 27.61
6.000	44.50	22.50	-22.00	-66.61 to 22.61
7.000	49.50	27.50	-22.00	-66.61 to 22.61
Column Factor	Difference	t	P value	Summary
3.000	-7.000	1.557	P > 0.05	ns
4.000	-15.00	3.337	P > 0.05	ns
5.000	-17.00	3.782	P > 0.05	ns
6.000	-22.00	4.895	P > 0.05	ns
7.000	-22.00	4.895	P > 0.05	ns



Crec VM (Ts) vs. Crec VM (Ps)				
Column Factor	Crec VM (Ts)	Crec VM (Ps)	Difference	95% CI of diff.
3.000	10.00	10.00	0.0000	-47.08 to 47.08
4.000	17.00	11.00	-6.000	-53.08 to 41.08
5.000	19.50	12.00	-7.500	-54.58 to 39.58
6.000	24.50	12.50	-12.00	-59.08 to 35.08
7.000	27.50	15.00	-12.50	-59.58 to 34.58
Column Factor	Difference	t	P value	Summary
3.000	0.0000	0.0000	P > 0.05	ns
4.000	-6.000	1.265	P > 0.05	ns
5.000	-7.500	1.581	P > 0.05	ns
6.000	-12.00	2.530	P > 0.05	ns
7.000	-12.50	2.635	P > 0.05	ns

Degr VM (Ts) vs. Degr VM (Ps)				
Column Factor	Degr VM (Ts)	Degr VM (Ps)	Difference	95% CI of diff.
3.000	15.00	12.50	-2.500	-42.51 to 37.51
4.000	18.50	15.50	-3.000	-43.01 to 37.01
5.000	20.50	17.50	-3.000	-43.01 to 37.01
6.000	25.00	19.50	-5.500	-45.51 to 34.51
7.000	29.50	21.00	-8.500	-48.51 to 31.51
Column Factor	Difference	t	P value	Summary
3.000	-2.500	0.6202	P > 0.05	ns
4.000	-3.000	0.7442	P > 0.05	ns
5.000	-3.000	0.7442	P > 0.05	ns
6.000	-5.500	1.364	P > 0.05	ns
7.000	-8.500	2.109	P > 0.05	ns



Tabla G: Crecimiento y degradación de *T.villosa* y *P. sanguíneus* en medio de cultivo con el efluente licor negro en condiciones de pH = 4.7 (ácido) y pH = 11 (alcalino).

P. sanguíneus

Crec Acido vs. Degr Acido				
Dias de Cultivo	Crec Acido	Degr Acido	Difference	95% CI of diff.
4.000	14.50	19.00	4.500	-0.6223 to 9.622
5.000	19.50	22.50	3.000	-2.122 to 8.122
6.000	24.00	29.00	5.000	-0.1223 to 10.12
7.000	26.50	33.00	6.500	1.378 to 11.62
10.00	35.50	42.50	7.000	1.878 to 12.12
11.00	39.50	49.00	9.500	4.378 to 14.62
12.00	43.50	45.50	2.000	-3.122 to 7.122
13.00	46.50	54.50	8.000	2.878 to 13.12
14.00	49.50	58.50	9.000	3.878 to 14.12
Dias de Cultivo	Difference	t	P value	Summary
4.000	4.500	3.171	P < 0.05	*
5.000	3.000	2.114	P > 0.05	ns
6.000	5.000	3.523	P < 0.05	*
7.000	6.500	4.580	P < 0.001	***
10.00	7.000	4.933	P < 0.001	***
11.00	9.500	6.694	P < 0.001	***
12.00	2.000	1.409	P > 0.05	ns
13.00	8.000	5.637	P < 0.001	***
14.00	9.000	6.342	P < 0.001	***



Crec Alcalino vs. Degr Alcalino				
Dias de Cultivo	Crec Alcalino	Degr Alcalino	Difference	95% CI of diff.
4.000	0.0000	15.50	15.50	5.969 to 25.03
5.000	4.000	16.50	12.50	2.969 to 22.03
6.000	5.000	16.50	11.50	1.969 to 21.03
7.000	5.500	18.50	13.00	3.469 to 22.53
10.00	10.00	21.00	11.00	1.469 to 20.53
11.00	11.50	23.00	11.50	1.969 to 21.03
12.00	11.50	23.50	12.00	2.469 to 21.53
13.00	11.50	26.00	14.50	4.969 to 24.03
14.00	12.00	27.00	15.00	5.469 to 24.53
Dias de Cultivo	Difference	t	P value	Summary
4.000	15.50	5.870	P<0.001	***
5.000	12.50	4.734	P<0.001	***
6.000	11.50	4.355	P<0.001	***
7.000	13.00	4.923	P<0.001	***
10.00	11.00	4.166	P<0.01	**
11.00	11.50	4.355	P<0.001	***
12.00	12.00	4.545	P<0.001	***
13.00	14.50	5.491	P<0.001	***
14.00	15.00	5.681	P<0.001	***

T. villosa

Crec Acido vs. Degr Acido				
Dias de Cultivo	Crec Acido	Degr Acido	Difference	95% CI of diff.
4.000	14.50	19.00	4.500	-0.6223 to 9.622
5.000	19.50	22.50	3.000	-2.122 to 8.122
6.000	24.00	29.00	5.000	-0.1223 to 10.12
7.000	26.50	33.00	6.500	1.378 to 11.62
10.00	35.50	42.50	7.000	1.878 to 12.12
11.00	39.50	49.00	9.500	4.378 to 14.62
12.00	43.50	45.50	2.000	-3.122 to 7.122
13.00	46.50	54.50	8.000	2.878 to 13.12
14.00	49.50	58.50	9.000	3.878 to 14.12



Dias de Cultivo	Difference	t	P value	Summary
4.000	4.500	3.171	P < 0.05	*
5.000	3.000	2.114	P > 0.05	ns
6.000	5.000	3.523	P < 0.05	*
7.000	6.500	4.580	P < 0.001	***
10.00	7.000	4.933	P < 0.001	***
11.00	9.500	6.694	P < 0.001	***
12.00	2.000	1.409	P > 0.05	ns
13.00	8.000	5.637	P < 0.001	***
14.00	9.000	6.342	P < 0.001	***

Tabla H: Comparación entre el crecimiento y la degradación de *T.villosa* y *P. sanguineus* en medio ácido (pH = 4.7).

Column Factor	Crec Acido (Tv)	Crec Acido (Ps)	Difference	95% CI of diff.
Crec Acido (Tv) vs. Crec Acido (Ps)				
4.000	14.50	25.50	11.00	-3.568 to 25.57
5.000	19.50	31.00	11.50	-3.068 to 26.07
6.000	24.00	38.00	14.00	-0.5682 to 28.57
7.000	26.50	39.00	12.50	-2.068 to 27.07
10.00	35.50	48.00	12.50	-2.068 to 27.07
11.00	39.50	54.00	14.50	-0.06824 to 29.07
12.00	43.50	60.50	17.00	2.432 to 31.57
13.00	46.50	65.00	18.50	3.932 to 33.07
14.00	49.50	67.50	18.00	3.432 to 32.57



Column Factor	Difference	t	P value	Summary
4.000	11.00	6.633	P < 0.05	*
5.000	11.50	6.935	P < 0.05	*
6.000	14.00	8.442	P < 0.01	**
7.000	12.50	7.538	P < 0.05	*
10.00	12.50	7.538	P < 0.05	*
11.00	14.50	8.744	P < 0.01	**
12.00	17.00	10.25	P < 0.01	**
13.00	18.50	11.16	P < 0.01	**
14.00	18.00	10.85	P < 0.01	**

Degr Acido (Tv) vs. Degr Acido (Ps)				
Column Factor	Degr Acido (Tv)	Degr Acido (Ps)	Difference	95% CI of diff.
4.000	19.00	33.00	14.00	-0.5682 to 28.57
5.000	22.50	35.00	12.50	-2.068 to 27.07
6.000	29.00	43.50	14.50	-0.06824 to 29.07
7.000	33.00	48.00	15.00	0.4318 to 29.57
10.00	42.50	60.00	17.50	2.932 to 32.07
11.00	49.00	64.00	15.00	0.4318 to 29.57
12.00	45.50	67.50	22.00	7.432 to 36.57
13.00	54.50	70.00	15.50	0.9318 to 30.07
14.00	58.50	74.00	15.50	0.9318 to 30.07



Column Factor	Difference	t	P value	Summary
4.000	14.00	8.442	P<0.01	**
5.000	12.50	7.538	P < 0.05	*
6.000	14.50	8.744	P<0.01	**
7.000	15.00	9.045	P<0.01	**
10.00	17.50	10.55	P<0.01	**
11.00	15.00	9.045	P<0.01	**
12.00	22.00	13.27	P<0.01	**
13.00	15.50	9.347	P<0.01	**
14.00	15.50	9.347	P<0.01	**



ANEXO II

PROTOCOLOS

Preparación de geles SDS-PAGE

8% Gel de separación

30% Acrilamida	6,665 ml
4 X Running Buffer*	6,25 ml
H ₂ O Milli-Q	11,70 ml
10% SDS	125 ul
.....	
10% APS (0,1g/ml)	13,33 ul
TEMED	250 ul
.....	
V _f =	25 ml

Nota:

* **4 X Running buffer:** 1,5 M Tris-HCl pH 8,8

4% Stacking gel

30% Acrilamida	0,65 ml
4 X Stacking gel buffer**	1,25 ml
H ₂ O Milli-Q	3,1 ml
10% SDS	50 ul
.....	
APS (0,02g/250 ul)	125 ul
TEMED	3,75 ul
.....	
V _f =	5 ml

Nota:

** **4 X Stacking gel buffer:** 0,5 M Tris-HCl pH 6,8



Preparación de 30% Acrilamida

1. Pesar 1,6g de *bis-acrilamida* y disolver en 100 ml de agua Milli-Q.
2. Pesar 30g de *acrilamida* y adicionar a la solución anterior. En caso de no disolver adicionar 50 ml de agua Milli-Q.
3. Pesar 30g de *acrilamida*, disolver y completar para $V_f = 200$ ml.

Protocolo de Tinción de geles SDS-PAGE con Nitrato de plata

1. Lavar con agua Milli-Q** por 1 min. Retirar el agua.
2. Adicionar una Solución I: 50% MetOH, 10% Ácido Acético; e incubar por 30 min. $V_f = 150$ ml. Retirar solución I.
3. Adicionar una Solución II: 30% EtOH; incubar por 15 min. $V_f = 200$ ml.
4. Lavar con agua Milli-Q por 1 min.
5. Adicionar Solución III: 0,8 ml de 5% Tiosulfato**** de sódio en 199,2 ml de agua Milli-Q***. Incubar por 1:30 min.
6. Lavar con agua Milli-Q por 30 seg.
7. Sumergir el gel en una Solución IV: 0,6 g de nitrato de plata en 300 ml de agua Milli-Q. Incubar por 25 min. Retirar solución IV.
8. Lavar con agua Milli-Q por 1 min. Retirar.
9. Adicionar Solución V: 12 g de Carbonato de sódio, 4 ml Tiosulfato de sódio, 100 ul de Formaldehído 37%*. $V_f = 200$ ml. Incubar hasta aparecer bandas.
10. Adicionar un Solución VI: 10% Ácido acético. $V_f = 200$ ml. Incubar por 10 min.
11. Lavar con agua Milli-Q por 1 min.
12. Los geles pueden ser almacenados en 50% de Glicerol en bolsas plásticas selladas herméticamente.



Notas:

- * *Adicionar inmediatamente antes de revelar las bandas. Mezclar bien la solución.*
- ** *Agua Milli-Q es equivalente a agua PCR, en ultima instancia utilizar agua destilada.*
- *** *Reservar 4 ml de la Solución III para utilizarla en la Solución V (Revelador).*
- **** *Prepara una solución madre de 5% de Tiosulfato de sodio. De esta tomar 0,8 ml para preparar la Solución III.*



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Addler E.** (1977). Newer views of lignin formation. *Tappi* 40: 294-301.
- Agematu H.; Shibamoto N.; Nishida H.; Okamoto R.; Shin T.; Murao S.** (1993). Oxidative decarboxylation of 4-hydroximandelic acid and 2-(-4-hydroxyphenyl)glycine by laccase from *Trachyderma tsunodae* and *Myrothecium verrucaria*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57:1877-1881
- Ainsworth C.C; Sparrow F.K.; Susman A.S.** (1973) *The fungi, IVB. A taxonomic review with keys: Basidiomycetes and lower fungi.* Academic press, New York and London.
- Aust S.D.; Bumpus J.A.** (1987). Biodegradation of the Halogenated Hydrocarbons: EPA Environmental Research Brief 1-5.
- Aust S.D.** (1990). Degradation of environmental pollutants. *Microb Ecol* 20:197-209
- Banci L.** (1997). Structural properties of peroxidases. *J. Biotechnol.* 53:253-263.
- Barr D.P., Aust S.D.** (1994). Mechanisms white-rot fungi use to degrade pollutants. *Environ Sci Technol*; 28:78-87.
- Barr D.P.; Aust S.D.** (1994). Pollutant Degradation by white- rot Fungi: Reviews of Environmental Contamination and Toxicology vol. 138: 49-73.
- Becker H.G.; Sinitsyn A.P.** (1993). Mn peroxidase from *Pleurotus ostreatus*: the action on the lignin. *Biotechnol Lett*; 15:289-294.
- Beydilli M.I.; Pavlostathis S.G.; Tincher W.C.** (1998). Decolorization and toxicity screening of selected reactive azo dyes under methanogenic conditions. *Water Sci Technol*; 38:225-232.
- Bohmer S.; Messner K.; Srebotnik E.** (1998). Oxidation of phenantrene by fungal laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole and unsaturated lipids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244:233-238.
- Bollag J. M.; Leonowicz A.** (1984). Comparative studies of extracellular fungal laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:849-854.
- Boom R.; Sol C.J.A.; Salimans M.M.M.; Jansen C.L.; Wertheim-Van Dillen P.M.E; Van Der Noordaa J.** (1989). Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, Mar. 1990, p. 495-503. American Society for Microbiology.



- Boominathan K.; Reddy C.A.** (1992) Fungal degradation of lignin: biotechnological applications. *In*. Handbook of applied mycology. Vol 4, pp. 763-822. *Edited by* D.K. Arora, R.P Elander, and K.G. Mukerji. Marcel Dekker, New York.
- Borchert M.; Libra J.A.** (2001). Decolorization of reactive dyes by the white rot fungus *Trametes versicolor* in sequencing batch reactors. *Biotechnol Bioeng*; 75:313-321.
- Borém, A.** (2005) Biotecnología e meio ambiente. Cap. 5 p 95-96
- Bourbonnais R.; Paice M. G.** (1990). Oxidation of non-phenolic substrates: an expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett.* 267:99-102.
- Bourbonnais R.; Paice M. G.; Reid I. D.; Lanthier P.; Yaguchi M.** (1995). Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1876-1880.
- Bumpus J.A.; Tien M.; Wright D.S.; Aust A.D.** (1985). Oxidation of persistent environmental pollutants by white rot fungus. *Science* 228:1434-1436.
- Bumpus J.A.; Aust S.D.** (1986) Biodegradation of environmental pollutants by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of the lignin degrading system. *Bioessays* 6:166-170
- Blanchette R.A.** (1991) *Annu. Rev. Phytopathol.* 29:381
- Casal I, Garcia JL, Guisán JM, Martínez-Zapater JM, Rojo F** (2004) Biotecnología en pocas palabras: Biotecnología y medio ambiente. SEBIOT editorial, Sociedad Española de Biotecnología, Madrid.
- Cochrane V.W.** (1958) *Physiology of the fungi.* John Wiley and Sons Inc., New York, New Cork
- Collins P.J.; Dobson A.D.W.** (1997). Regulation of lacase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Appl Environ Microbiol* 66:925-929.
- Collins, P.; Dobson, A.W.** (1997). Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3444–3450.
- Coulibaly L.; Naveau H.; Agathos S.N.** (2002). A tanks-in-series bioreactor to simulate macromolecule-laden wastewater pretreatment under sewer conditions by *Aspergillus niger*. *Wat. Res.* 36: 3941-3948.
- Crawford R.L.** (1981) *Lignin biodegradation and transformation.* John Wiley and Sons, New York, 154 pp



- Cripps C.; Bumpus J.A.; Aust S.D.** (1990). Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol*; 56:1114-1118.
- Daniel G.** (1994) *FEMS Microbiol. Rev.* **13:199** **Dávila G.; Vázquez-Duhalt R.** (2006). Enzimas lignolíticas fungicas para fines ambientales. *Mensaje Bioquímico*, Vol XXX.
- D'Souza T. M; Boominathan K; Reddy C. A.** (1996) Isolation of lacasse gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3739-3744.
- Dix N.J.; Webster J.** (1995) *Fungal Ecology*. Chapman and Hall, London, 549 pp.
- Eriksson K.E.; Blanchette R.A.; Ander P.** (1990) *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*. Springer. Berlín. New York, p. 20
- Eriksson K-E.L.; Blanchette R.A.; Ander P.** (1990) *Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood components*. Springer-Verlag, Berlin, 407 pp.
- es.wikipedia.org/wiki/Contaminación)
- Feijoo G.; Lema J.M.** (1995). Treatment of forest industry effluents with toxic and recalcitrant compounds by the white rot fungi. *Afinidad*. 52:171-180
- Fengel D.; Wegener G.** (1989) *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Walter de Gruyter, Berlin.
- Fernando T.; Aust S.D.; Bumpus J.A.** (1989). Effects of Culture Parameters on DDT [1,1,1-trichloro-2,2-bis (4-chlorophenyl) ethane] Biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*: *Chemosphere* vol. 19:1387-1398.
- Field J.A.; de Jong E.; Feijoo Costa G.; de Bont J.A.M.** (1993) Screening for ligninolytic fungi applicable to the degradation of xenobiotics. *TiBtech*.14: 44-49.
- Freitag M.; Morrell J.J.** (1992). Decolorization of the polymeric dye R-478 by wood-inhabiting fungi. *Can J Microbiol*; 38:811-822.
- Fritsche W.; Hofrichter M.** (1999) Aerobic degradation by microorganisms. En: *Advances in biochemical engineering biotechnology*. T. Scheper (Ed.), Springer-Verlag, Vol. 63. Biotransformations.
- Galhaup C.; Haltrich D.** (2001). Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56: 225-232.
- Gianfreda L.; Xu F.; Bollag J. M.** (1999). Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Biorem. J.* 3:1-25.



- Glenn J.K.; Gold M.H.** (1983). Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol*; 45:1741-1747.
- Glenn J. K.; Morgan M. A.; Mayfield M. B.; Kuwahara M.; Gold, M. H.** (1983). An extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114:1077-1083.
- Glenn J. K.; 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.
- Gómez-Dorado C.; Martínez-Salgado M.; Nieto- Mosquera D.; Pedrosa- Rodríguez A.; Rodríguez-Vázquez R.; Rosas-Acosta J.** (2005). Estudio del efecto de dos inductores y un protector enzimático sobre la actividad de las enzimas Mn-Peroxidasa y Lacasa producidas por *Trametes versicolor* y su efecto en la decoloración de efluentes de la industria papelera. *UNIVERSITAS SCIENTARIUM. Revista de la Facultad de Ciencias.* Vol. 10, N° 2, 37-45. Laboratorio de Biotecnología Aplicada. Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Cra. 7ª No. 40-62 Bogotá, Colombia.
- Hatakka A.** (1994). Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol Rev*; 13:125-135.
- Have R.; Teunissen P. J. M.** (2001). Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white rot fungi. *Chem. Rev.* 101:3397-3413.
- Higuchi T.** (1990). Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. *Word. Sci. Technol* 24: 23-63.
- Hudson H.J.** (1986) *Fungal Biology*, Cambridge University Press. Cambridge, 298 pp.
- Jarosz-Wilkolazka A.; Kochmanska-Rdest J.; Malarczyk E.; Wardas W.; Leonowicz A.** (2002). Fungi and their ability to decolourize azo and anthraquinonic dyes. *Enzyme Microb Technol*; 30:566-572.
- Levin L.; Forchiassin F.; Ramos A. M.** (2002) Copper induction of lignin-modifying enzymes in the white-rot fungus *Trametes trogii*. *Laboratorio de Micología*



Experimental, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.

Johannes C.; Majcherczyk A.; Hüttermann A. (1996). Degradation of anthracene by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of different mediator compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 46:313-317.

Jones H.R. (1973). *Pollution Control and Chemical Recovery in the Pulp and Paper Industry*. Noyes Data Corp., New Jersey.

Kirk T. K.; Chang H. M. (1975). Decomposition of lignin by white-rot fungi. II. Characterization of heavily degraded lignins from decayed spruce. *Holzforschung* 29:56-64.

Kirk T.K.; Farrell R.L. (1987) Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology* 41, 465-505

Leonowicz A.; Edgehill R. U.; Bollag J. M. (1984). The effect of pH on the transformation of syringic and vanillic acids by the laccases of *Rhizoctonia praticola* and *Trametes versicolor*. *Arch. Microbiol.* 137:89-96.

Leonowicz A.; Cho N. S.; Luterek J.; Wilkolazka A.; Wojtas-Wasilewska M.; Matuszewska A.; Hofrichter M.; Wesenberg D.; Rogalski J. (2001). Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J. Basic. Microbiol.* 41:185-227.

Levin L.; Papinutti L.; Forchiassin F. (2003). Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. *Bioresource Technology*. 169-176. Elsevier.

Li K.; Helm R. F.; Eriksson K. E. L. (1998). Mechanistic studies of the oxidation of a non-phenolic lignin model compound by the laccase/1-hydroxybenzotriazole redox system. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 27:239-243.

Lilly V.M.; Barnett H.L.; (1951). *Physiology of the fungi*. McGraw-Hill Book Co., 1st ed. New York, New York.

Lobos S., Tello, M., Pollanco, R., Larrondo, L. F., Manubens, A., Salas, L., Vicuña, R. - Enzymology and molecular genetics of the ligninolytic system of the basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. - *Current Science*, vol. 81, No.8 pag 992-996, 25 October 2001.

Lovrien R.; Matulis D. (2005). Assay for total protein. *Curr Protoc Microbiol.* 2005 Oct;Appendix 3:Appendix 3^a. University of Minnesota, St. Paul, Minnesota, USA.



- Majcherczyk A.; Johannes C.; Hüttermann A.** (1999). Oxidation of aromatic alcohols by laccase from *Trametes versicolor* mediated by the 2,2'-azino-bis- (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) cation radical and dication. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 51: 267-276.
- Manchenko P.** (1994) **Handbook** of detection of enzymes on electrophoretic gels. CRC Press, **Inc**, Boca Raton, Florida, USA.
- Mansur M.; Suárez T.; González A.E.** (1998). Differential gene expression in the laccase gene family from Basidiomycete I-62 (CECT 20197). *Appl Environ Microbiol* 64:771-774.
- McMullan G.; Meehan C.; Connely A.; Kirby N.; Robinson T.; Nigam P.; et al.** (2001). Mini-review: microbial decolourisation and degradation of textile dyes. *Appl Microbiol. Biotechnol*; 56:81-87.
- Moon-Jeong Han; Hyoung-Tae Choi; Hong-Gyu Song** (2005). Purification and characterization of Laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*. *The Journal of Microbiology*, December 2005, p.555-560. The Microbiological Society of Korea.
- Mouso N.; Papinutti L.; Forchiassin F.** (2003). Efecto combinado del cobre y pH inicial del medio de cultivo sobre la producción de lacasa y manganeso peroxidasa por *Stereum hirsutum* (Willd) Pers. *Rev Iberoam Micol* 20:176-178.
- Nevel B., Wright R.** *Ciencias Ambientales*. (1999) Banco Mundial. La Contaminación Ambiental en la Argentina: Temas y Opciones para su Gestión. Editorial Prentice Hall.
- Palma C.; Moreira M.T.; Mielgo I.; Feijoo G.; Lema J.M.** (1999). Use of a fungal bioreactor as a post treatment step for continuous decolorisation of dyes. *Wat. Sci. Technol.* 40: 131-136.
- Pandey A.; Banerjee R.;** (2002) *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Volume 102-103, Issue 1-6, pps. 001-004. New Horizons in Biotechnology.
- Pasti-Grigsby M.B.; Paszczynski A.; Gosczyński S.; Crawford D.L.** (1992). Influence of aromatic substitution patterns on azo dye degradability by *Streptomyces sp.* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol*; 58:3605-3613.
- Paszczynski A.; Pasti-Grigsby M.B.; Gosczyński S.; Crawford R.L.; Crawford D.L.** (1992). Mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanilic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. *Appl Environ Microbiol*; 58:3598-3604.



- Pickard M. A.; Roman R.; Tinoco R.; Vazquez-Duhalt R.** (1999a). Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Corioloropsis gallica* UAMH 8260 laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3805-3809.
- Piontek K.; Antorini M.; Choinowski T.** (2002) Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers *J. Biol. Chem.* v277, p.37663-37669
- Pointing S.B.** (2001). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*; 57:20-33.
- Potthast A.; Rosenau T.; Chen C.L.; Gratzi J. S.** (1995). Selective enzymatic oxidation of aromatic methyl groups to aldehydes. *J. Org. Chem.* 60:4320-4321.
- Reinhamar B.** (1984) Laccase. En: *Copper proteins and copper enzymes*. R. Lontie (Ed.), CRC Press. Boca Raton, pp 1-35.
- Reyes P.; Pickard M. A.; Vazquez-Duhalt R.** (1999). Hydroxybenzotriazole increases the range of textile dye decolorization by immobilized laccase. *Biotechnol. Lett.* 21:875-880.
- Robinson T.; McMullan R.; Nigam P.** (2001^a) Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresour Technol*; 77:247-255.
- Rodríguez E.; Pickard M. A.; Vazquez-Duhalt R.** (1999). Industrial dye decolorization by laccase from ligninolytic fungi. *Curr. Microbiol.* 38:27-32.
- Schibner K.; Hofrichter M.; Fritsche W.** (1997). Mineralization of 2-amino-4,6-dinitrotoluene by manganese peroxidase of the white-rot fungus *Nematoloma frowardii*. *Biotechnol Lett*; 1339:23-30.
- Shah V.; Nerud F.** (2002). Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization. *Can. J. Microbiol.* 48:857-870.
- Shimada M.; Higuchi T.** (1983). Recent advances in lignin biodegradation research. En: *Recent advances in lignin biodegradation research*. T. Higuchi, H. M. Chang y T. K. Kirk (Eds.), Uni Publishers. Tokio, pp 195-208.
- Shimizu E.** (2006). Biodegradación de contaminantes de la industria papelera por el hongo *Ganoderma applanatum*. Tesina de grado para optar al título de Licenciado en Genética. Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales. UNAM.
- Sjostrom E.** (1981). *Wood chemistry*. Academic Press, Inc. p 223.



- Smith M.; Shnyreva A.; Wood D.A.; Thurston C.F.** (1998). Tandem organization and highly disparate expression of the two laccase genes *lcc1* and *lcc2* in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Microbiology* 144:1063–1069.
- Spandaro J.T.; Gold M.H.; Renganathan V.** (1992). Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol*; 58:2397-2401.
- Steven D.; Benson A. J.** (1993) The Fungus among Us: Use of White Rot Fungi to Biodegrade Environmental Pollutants. *Environmental Health Perspectives Volume 101*, n°3, p.
- Sutherland J.B.; Selby A.L.; Freeman J.P.; Evans F.E.; Cerniglia C.E.** (1991). Methabolism of Phenetrene by *Phanerochete chrysosporium*. *App and Environ Microb* 3310-3316.
- Tien M.; Kirk T,K.** (1983) Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochate chrysosporium* Burds. *Science* 221:661-663
- Tien M.; Kirk T.K.** (1984) Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O -requiring oxygenase. *Proc Natl Acad Sci* 81:2280-2284.
- Vandertol-Vanier H. A.; Vazquez-Duhalt R.; Tinoco R.; Pickard M. A.** (2002). Enhanced activity by poly (ethylene glycol) modification of *Coriolopsis gallica* laccase. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29:214-220.
- Velez Rueda J.O.** (2007) Caracterización bioquímica de la enzima lacasa de la cepa *Peniophora sp.* BAFC 633 para su potencial aplicación en procesos de biorremediación. Tesina de grado para optar al título de Licenciado en Genética. Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales. UNaM.
- Wesenberg D.; Kyriakides I.; Agathos N.S.** (2003). White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnonology Advances* 22:161.
- Willmott N.; Guthrie J.; Nelson G.** (1998)The biotechnology approach to colour removal from textile effluent. *J Soc Dyers Colour* 114:38-41.
- Wolfaardt F.; Taljaard J. L.; Jacobs A.; Male J. R.; Rabie C. J.** (2004). Assessment of wood-inhabiting Basidiomycetes for biokraft pulping of softwood chips. *Biosource Technology* 95:25-30.



www.conabio.gob.mx/ Las familias Polyporaceae sensu stricto y Albatrellaceae en México. (10-08-2008)

www.porquebiotecnologia.com.ar/doc/biotecnología/biotec.asp(10-08-2008)

Yadav J.S.; Reddy C.A. (1993). Degradation Benzene Toluene Ethylbenzene and Xylenes (BTEX) by the lignin degrading basidiomycete *Phanerochete chrysosporium* App and Environ Microb 756-762.

Yaver D.S.; Xu F.; Golightly E.J.; Brown K.M.; Brown S.H.; Rey M.W.; Schneider P.; Halkier T.; Mondorf K.; Dalboge H. (1996). Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. Appl. Environ. Microbiol. 62:834–841.

Zapata P. D; Cariaga Martinez A. E. (2007) El laboratorio de biología molecular. Editorial Universitaria de Misiones. Pag. 41-48.

Zissi U.; Lyberatos G. (2001). Partial degradation of *p*-aminobenzene by a defined mixed culture of *Bacillus subtilis* and *Stenotrophomonas maltophilia*. Biotechnol Bioeng; 72:49-54.

**Formulario de autorización de depósito de tesis/trabajo final integrador en la
Comunidad Ciencias Exactas, Químicas y Naturales del RIDUNaM
(Repositorio Institucional Digital de la UNaM)**

Por intermedio de la presente, el abajo firmante, AUTOR de la Tesis (Grado) titulada/o

Inducción con cobre de la enzima lacasa en el hongo de pudrición blanca *Trametes villosa* (sw.: Fr.) kreisel.

Da FE de la autoría y originalidad de la obra mencionada, que fue dirigida por, **Laura Lidia Villalba y Pedro Dario Zapata**, presentada y defendida en la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones (FCEQyN-UNaM), el (fecha) 17/10 /2008, Acta/Expdte. N°....., con el fin de obtener el título de Licenciado en Genética.

Tildar según corresponda

- Tesis de Posgrado
 Doctorado Maestría Trabajo Final Integrador
 Tesis de Grado

Derechos patrimoniales

Como autor, expreso mi conformidad en cuanto a la cesión gratuita de los derechos de reproducción y circulación de esta obra, en forma NO EXCLUSIVA, a la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales-UNaM. Dicha reproducción y circulación se podrá realizar, una o varias veces, en cualquier soporte, para todo el mundo, con fines sociales, educativos y científicos.





En virtud del carácter no exclusivo de esta cesión, el autor podrá reproducir y comunicar libremente la tesis o trabajo final integrador, a través de los medios que estime oportunos.

Condiciones de acceso en línea

- Autorizo el depósito de la tesis o trabajo final integrador en forma inmediata
 Autorizo el depósito del documento con embargo por el plazo de _____ meses a partir de la defensa de la misma.

Condiciones de uso de la tesis/TFI

Será puesta a disposición pública bajo las siguientes condiciones de uso:

	(BY) Atribución — Debe reconocer los créditos de la obra de la manera especificada por el autor o el licenciente (pero no de una manera que sugiera que tiene su apoyo o que apoyan el uso que hace de su obra).
	(NC) No Comercial — No puede utilizar esta obra para fines comerciales.
	(SA) Permite trabajos derivados — Siempre que se mantenga la misma licencia.
	Reconocimiento – NoComercial – CompartirIgual (by-nc-sa): No se permite un uso comercial de la obra original ni de las posibles obras derivadas, la distribución de las cuales se debe hacer con una licencia igual a la que regula la obra original.

Referencias:

CC (Licencias Creative Commons).

BY (Atribución).

NC (No comercial).

SA (Compartir igual).

Dados personales (llenar un cuadro por cada autor)

Apellido y Nombres	Preussler Cesar Adrian
--------------------	------------------------

Correo electrónico	cesarpreussler@yahoo.com
--------------------	--------------------------



Preussler Cesar Adrian